组成型雄烷受体激动剂TCPOBOP抑制青春期雌鼠乳腺导管发育

封静怡[1], 李心雨[1], 潘石甲[2], 陆子谕[1], 翟永功[2], 许鹏飞[1,3,4*]

(1. 武汉大学药学院, 组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 湖北 武汉 430071; 2. 北京师范大学生命科学学院, 抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875; 3. 武汉大学附属中南医院肝胆疾病研究院/移植中心, 湖北 武汉 430071; 4. 发育源性疾病湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430071)

摘要: 随着现代社会工业化进程的推进, 内分泌干扰物 (endocrine disrupting chemicals, EDCs) 在日常环境中的暴露日益增加, 这类物质可通过激活核受体干扰机体生理功能。组成型雄烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 作为核受体家族的重要成员, 是内源性物质解毒及外源性EDCs感知的关键调控因子, 参与药物代谢酶表达及能量代谢的调节。本研究采用CAR的特异性强效激动剂1,4-双[2-(3,5-二氯吡啶氧基)]苯 (TCPOBOP, TC), 探究外源性EDCs激活核受体对青春期雌性小鼠乳腺发育及雌激素稳态的影响。以3周龄雌性小鼠为模型, 按照0.5 mg·kg^{-1}的剂量经腹腔注射给予TC (每周两次), 观察乳腺组织发育形态并检测血清雌激素水平 (本实验所有动物实验获武汉大学动物实验中心机构动物护理和使用委员会的批准, 批准编号为WAEF-2023-0077)。结果表明, TC暴露通过激活CAR显著抑制了小鼠乳腺导管系统的发育进程。其作用机制涉及下调雌激素合成关键酶的表达, 同时促进雌激素代谢转化及失活, 最终导致体内雌激素水平降低。本研究揭示了TC激活核受体CAR抑制青春期雌鼠乳腺发育及扰乱雌激素稳态的作用与机制, 为深入理解EDCs通过核受体途径影响青春期女性乳腺发育及内分泌平衡提供了参考, 也为探索CAR在乳腺发育调控中的作用机制提供了新的研究线索。

关键词: 内分泌干扰物; 1,4-双[2-(3,5-二氯吡啶氧基)]苯; 组成型雄烷受体; 乳腺; 雌激素

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)12-3622-09

The constitutive androstane receptor agonist TCPOBOP inhibits mammary ductal development in pubertal female mice

FENG Jing-yi[1], LI Xin-yu[1], PAN Shi-jia[2], LU Zi-yu[1], ZHAI Yong-gong[2], XU Peng-fei[1,3,4*]

(*1. Ministry of Education Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 2. Beijing Key Laboratory of Resistance Gene Resources and Molecular Development, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; 3. Institute of Hepatobiliary Diseases/Hepatobiliary Diseases Research Center, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China; 4. Hubei Key Laboratory of Developmental Origins of Disease, Wuhan 430071, China*)

Abstract: With the advancement of industrialization in modern society, exposure to endocrine disrupting chemicals (EDCs) in daily environments is increasingly prevalent. These substances can interfere with physiological functions by activating nuclear receptors. The constitutive androstane receptor (CAR), a crucial member of the nuclear receptor family, serves as a key regulator in detoxifying endogenous substances and sensing exogenous EDCs, participating in the regulation of drug-metabolizing enzyme expression and energy metabolism. This study employed TCPOBOP (TC), a highly specific and potent agonist of CAR, to investigate the impact of

收稿日期: 2025-05-31; 修回日期: 2025-09-08.

基金项目: 国家重点研发计划 (2024YFC2815900); 国家自然科学基金资助项目 (82301823, 82373928); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2042025kf0062); 武汉市自然科学基金探索计划 (晨光计划) (2024040801020224).

*通讯作者 E-mail: pengfeixu@whu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0623

exogenous EDC-activated nuclear receptors on mammary gland development and estrogen homeostasis in pubertal female mice. Using 3-week-old female mice as models, TC was administered *via* intraperitoneal injection at 0.5 mg·kg^{-1} twice weekly. Mammary gland developmental morphology was observed, and serum estrogen levels were measured (all animal experiments conducted in this study were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Animal Experiment Center of Wuhan University, ethics number: WAEF-2023-0077). Results demonstrated that TC exposure significantly inhibited the developmental progression of the mammary ductal system through CAR activation. The underlying mechanism involved downregulating the expression of key estrogen-synthesizing enzymes while promoting estrogen metabolic conversion and inactivation, ultimately leading to reduced systemic estrogen levels. This study reveals the mechanism by which TC-activated nuclear receptor CAR suppresses mammary gland development and disrupts estrogen homeostasis in pubertal female mice. It provides insights for understanding how EDCs affect mammary development and endocrine balance in adolescent females *via* nuclear receptor pathways, and offers new research clues for exploring CAR's role in mammary development regulation.

Key words: endocrine disrupting chemical; TCPOBOP; constitutive androstane receptor; mammary gland; estrogen

组成型雄烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 是核受体家族的重要成员, 在肝脏和小肠组织中高表达, 参与调控肝脏药物代谢、蛋白转运和机体能量代谢过程[1-3]。作为配体激活型转录因子, CAR可被多种外源性化学物质 (如药物、环境污染物、工业化学物等) 及内源性物质 (如胆固醇代谢产物等) 激活[4-6]。通过调控下游靶基因转录, 影响机体的生殖、发育、炎症和代谢等生理功能。因此, CAR被认为是参与内源性化合物代谢、响应外源性化学物质的解毒剂与传感器[7], 也被认为是环境化合物干扰机体内分泌功能的潜在靶标, 参与内分泌及相关生理途径的紊乱过程[8]。目前围绕CAR的研究主要聚焦于药物代谢与能量代谢调控领域, 而有关其在乳腺发育及雌激素稳态中的作用尚未阐明。

1,4-双[2-(3,5-二氯吡啶氧基)]苯 (TCPOBOP, TC) 是一种亲脂性多卤代杂环化合物, 最初作为杀虫剂使用[9], 后续研究发现其可特异性激活CAR, 并被确认为小鼠CAR的药理性强效激动剂[10]。基于其亲脂特性, TC在肝脏和脂肪组织中的半衰期极长[11]。研究表明, 单次暴露TC 30天后仍可于上述组织中检出残留, 且其诱导的肝脏微粒体酶活性升高可持续140天[12]。TC暴露通过改变特定基因的表达水平触发多种致病反应, 具体表现为选择性诱导细胞色素P450酶系[13]、抑制细胞凋亡、促进肝细胞异常增殖及肝脏病灶发展, 最终导致肝肿大并增加肝脏肿瘤发生风险[14]。鉴于其作用的长期性以及CAR药理激活特性, TC已被视为内分泌干扰物, 可通过核受体途径干扰机体生理功能。目前, 有关TC影响肝脏代谢的研究已较充分, 但其对乳腺导管发育及雌激素稳态的作用尚未明确。

乳腺是受多种激素调控的外分泌器官, 由实质与间质两大部分构成[15]。实质部分包含腺泡细胞与导管上皮细胞, 负责乳汁合成、运输、分泌及排出。间质部分由脂肪细胞、成纤维细胞及免疫细胞组成, 具有能量储存、组织支持及免疫防御作用[16,17]。青春期是乳腺发育的重要阶段, 表现为乳腺基质和腺体组织生长、导管延伸和末端芽分支形态发生[18,19], 内分泌信号的相互作用在此过程中发挥着重要的生物学功能[20]。基于此, 乳腺对外源性环境因素的干扰十分敏感。当外源化合物通过核受体信号通路干扰内分泌激素的正常分泌时, 将导致机体内环境稳态失衡, 引发乳腺组织结构异常与生理功能障碍。因此, 探究外源性干扰物对乳腺发育的影响具有重要意义。

本研究利用TC处理青春期雌性小鼠, 研究核受体CAR激活对乳腺发育的不良影响及其作用机制, 探究CAR调控乳腺发育与雌激素稳态的分子机制, 为阐释环境毒物激活CAR影响哺乳动物乳腺发育提供线索, 为“环境毒物–核受体CAR-乳腺发育异常”的相关性研究提供理论支撑。

材料与方法

药品与试剂 TCPOBOP (美国Sigma-Aldrich公司, 批号:76150-91-9); 胭脂红 (上海阿拉丁生化科技公司, 批号: C110712); 逆转录试剂盒、实时荧光定量PCR试剂盒 (南京诺唯赞生物科技有限公司, 批号: Q312-02); 苏木精、伊红 (珠海贝索生物技术有限公司, 批号: BA4041、BA4024); 中性树脂 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 10004160); BrdU、DAPI染色液、雌二醇 (17-beta-estradiol, 17β-estradiol) 酶联免疫吸附检测试剂盒 (北京碧云天生物科技有限公司, 批号: ST1056、

C1006、PE223); 小鼠肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-alpha, TNF-α) 酶联免疫吸附检测试剂盒、小鼠白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 酶联免疫吸附检测试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: EK0525、EK0410); 雌激素受体α蛋白 (estrogen receptor alpha protein, ERα) 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, 批号: sc-787); anti-β-actin、磺基转移酶 1E1 (sulfotransferase 1E1, SULT1E1) 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 66009-1、12522-1-AP)。

仪器 酶标仪 (型号: MultiskanGO)、超微量紫外可见光光度计 (型号: NanoDrop One c) 均购自美国 Thermo Fisher 公司; 分析天平 (华志电子科技有限公司, 型号: PTX-FA210); 低温高速离心机 (德国 EPPENDORF 公司, 型号: Centrifuge 5425 R); 医用低温保存箱 (海尔医疗有限公司, 型号: DW-86L626); 医用冷藏箱 (美的医疗有限公司, 型号: MC-5L310); 荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司, 型号: CFX Connect); 基因扩增仪 (杭州博日科技有限公司, 型号: TC-XP-D); 荧光显微镜 (奥林巴斯株式会社, 型号: OlympusIX73 DP80); 组织轮转切片机 (武汉贝徕美生物科技有限公司, 型号: RM2245); 组织脱水机 (德国徕卡公司, 型号: ASP3003)。

实验动物 SPF 级雌性 3 周龄 C57BL/6J 小鼠购自湖北省疾病预防控制中心, 动物生产许可证号为 SCXK (鄂) 2020-0018。饲养于武汉大学实验动物中心, 动物使用许可证号为 SYXK (鄂) 2023-0102。在标准条件下饲养, 温度为 25 ± 2 ℃、相对湿度为 50% ± 5%。采用白炽灯实施 12 h 明暗交替式照明循环, 整个研究期间, 小鼠可自由进食饮水。动物实验经武汉大学动物实验中心机构动物护理和使用委员会的批准, 批准编号为 WAEF-2023-0077。

动物分组与处理 适应性饲养期结束后, 将 3 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组 (n = 10)。TC 处理组小鼠每周腹腔注射 TC (0.5 mg·kg^{-1}) 两次, 对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水同样每周两次, 持续 2 或 5 周。实验给药周期结束后, 小鼠禁食 12 h, 称取最终体重并进行组织收集。采用眼球摘除法收集血液样本, 收集第 4 对乳腺、肝脏和性腺白色脂肪组织并称重, 随后将样品液氮速冻后置于−80 ℃冰箱保存。

小鼠乳腺全组织染色 取出固定好的乳腺进行脱水处理, 依次放入浓度为 70%、90% 和 100% 的乙醇溶液中, 每次浸泡时长为 15 min。将脱水后组织转移至二甲苯中继续浸泡 15 min, 使组织呈现透明状态。随后依次置于浓度为 100%、90%、70%、50%、30% 的乙醇溶液中浸泡 15 min, 随后再放入超纯水中浸泡 15 min 以完成组织复水, 最后将乳腺组织置于胭脂红染液中浸泡 2 天。染色完成后, 将组织依次放入 70%、90% 和 100% 的乙醇溶液中浸泡 1 h, 随后置于二甲苯中浸泡 1 h 使组织再次达到透明状态。拍照观察后, 可将乳腺组织置于水杨酸甲酯中长期保存, 使用 Image J 软件量化乳腺导管系统图片。

小鼠乳腺 H&E 染色 乳腺组织经 4% 多聚甲醛固定, 脱水、透明、浸蜡、包埋后制备乳腺组织切片。经二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 用苏木精染液染色 5 min, 水洗后用 1% 盐酸酒精分化 3～5 s, 再用伊红染液染色 2 min。脱水、透明、封片后在显微镜下观察。

免疫荧光检测小鼠乳腺 ERα 表达 组织样本的石蜡切片在 0.5% Triton X-100 中透化 30 min, 随后在 3% 山羊血清中 37 ℃封闭 1 h。随后置于 1∶50 稀释的小鼠 ERα 单克隆抗体稀释液中 4 ℃孵育过夜。漂洗后再将切片置于含有 DAPI 的对应二抗稀释液中, 室温避光孵育 90 min, 避光清洗后固封并在荧光显微镜下观察。使用 Image J 软件测量每个像素的灰度值, 该值代表该点的荧光强度大小。针对特定区域的荧光强度计算公式为: 平均荧光强度 (mean) = 该区域荧光强度总和 (IntDen)/该区域面积 (area)。

小鼠乳腺 BrdU 免疫荧光染色 小鼠处死前 6 h 腹腔注射 BrdU (50 mg·kg^{-1}), 按照上述 H&E 染色步骤得到乳腺组织切片后, 使用 1 mol·L^{-1} 盐酸于 37 ℃孵育 30 min 变性, 0.1 mol·L^{-1} 硼酸钠室温中和 10 min。使用 3% 山羊血清室温封闭 30 min, 随后置于 1∶500 稀释的小鼠 BrdU 单克隆抗体中 4 ℃孵育过夜。漂洗后再将切片置于含有 DAPI 的对应二抗稀释液中, 室温避光孵育 90 min, 避光清洗后固封并在荧光显微镜下观察。针对特定区域的荧光强度计算公式为: 平均荧光强度 (mean) = 该区域荧光强度总和 (IntDen)/该区域面积 (area)。

酶联免疫吸附测定 (ELISA) 从小鼠的眼眶静脉丛采集血液, 将血液在 4 ℃下以 4 000 ×g 的离心力离心 10 min, 分离出血清。使用 ELISA 试剂盒测定小鼠血清中 17β-estradiol、TNF-α 和 IL-6 水平。使用酶标仪在 450 nm 测定其吸光度值, 并按照试剂盒说明书制作标准曲线并计算血清中 17β-estradiol、TNF-α、IL-6 含量。

实时荧光定量 PCR 检测 使用 TRNzol 提取小鼠各组织总 RNA 后, 按照 Vazyme 反转录试剂盒说明书进行逆转录得到 cDNA。按照 Vazyme ChamQ Blue Universal SYBP qPCR 试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 反应, 反应条件为预变性阶段: 95 ℃ 3 min, 循环反应: 95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s, 40 个循环。以β-actin 为

内参, 根据$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算目的基因的相对表达量。定量PCR的引物序列如表1所示。

Table 1 Gene-specific forward and reverse primer sequence. *Cyp3a11*: Cytochrome P450 3A11; *Cyp2b10*: Cytochrome P450 2b10; *Car*: Constitutive androstane receptor; *Sult1e1*: Sulfotransferase 1E1; *Sult2a1*: Sulfotransferase 2A1; *Ugt1a1*: Glucuronosyltransferase 1A1; *Cox-2*: Cyclooxygenase-2; *Il-1β*: Interleukin-1*β*; *Inos*: Inducible nitric oxide synthase; *Tnf-α*: Tumor necrosis factor-alpha

Target gene		Sequence (5'-3')
Cyp3a11	Forward	GGCAAGCCTGTTACTATGAAAG
	Reverse	ACTGAGAAGAGCAAAGGATCAA
Cyp2b10	Forward	TATGGAGATGTGTTCACAGTGC
	Reverse	CAGAGAGAATCTACGAAGGGTC
Car	Forward	GATCAGCTACAAGAGGAGATGG
	Reverse	TTGCATACAGAAACCGACTTTG
Sult1e1	Forward	CTCGCTGACATCATCCTCGC
	Reverse	GCGTTTTGTTGCCGTAGCA
Sult2a1	Forward	GAGGCTTTTGACAGTGTTTACC
	Reverse	TTATTGTGAGGATCCTGGGTTG
Ugt1a1	Forward	GCTTGCCTTCTTCCTGCTGCTC
	Reverse	GTCATGTCCTCGTTCGCTGAGATG
Il-1β	Forward	GCAACTGTTCCTGAACTCAACT
	Reverse	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
Cox-2	Forward	GTGAACAACATCCCCTTCCT
	Reverse	CCTTTTCCAGCACTTCTTTTG
Tnfα	Forward	ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC
	Reverse	GCTTGTCACTCGAATTTTGAGA
Aromatase	Forward	CAC ACCAGAGAACCAGGCTACAAG
	Reverse	TGAATGTTGCTTTTCCACCTCC
β-Actin	Forward	CGGTTCCGATGCCCTGAGGCTCTT
	Reverse	CGTCACACTTCATGATGGAATTGA

蛋白印迹法检测蛋白表达水平 细胞经预冷的PBS漂洗后, 用RIPA裂解液处理后提取总蛋白, 用BCA试剂盒对蛋白进行定量分析。将蛋白进行SDS-PAGE电泳凝胶分离, 转至PVDF膜。采用5%牛奶室温封闭1 h后, 加入一抗anti-*β*-actin (1∶5 000) 和anti-SULT1E1 (1∶1 000) 在4 ℃冰箱摇床中孵育过夜。转入与一抗匹配的二抗溶液在室温条件下进行1～2 h的孵育, 使用ECL化学发光检测液进行显色, 实验单独重复3次。

统计学分析 本研究所得数据, 借助GraphPad Prism 9.0等软件开展统计分析工作, 并基于分析结果绘制相应图表。采用独立样本*t*检验方法比较组间数据, 数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式表示。按照统计学标准, $P < 0.05$具有统计学差异。

结果

1 TC激活CAR抑制青春期小鼠乳腺导管的发育

青春期乳腺导管系统的发育是多种内分泌信号协同作用的复杂过程。为了明确TC激活CAR对青春期乳腺发育的影响, 本研究选用3周龄雌性C57BL/6J小鼠, 经腹腔注射给予0.5 mg·kg^{-1} TC (每周2次), 分别处理2及5周 (图1A)。结果表明, 与对照组相比, TC处理显著上调了小鼠雌激素主要产生器官卵巢及肾上腺组织中的*Car*及其靶基因细胞色素P450 2b10 (cytochrome P450 2b10, *Cyp2b10*) 的表达水平 (图1B、C), 证实TC暴露药理激活了小鼠体内CAR信号通路。通过小鼠第4对乳腺组织胭脂红染色分析, 发现TC处理明显减少了小鼠乳腺导管数量并抑制导管末端芽 (terminal endbuds, TEBs) 形成 (图1D～G)。以上结果表明, TC处理通过激活CAR抑制了青春期小鼠乳腺导管系统的生长发育。

2 TC暴露抑制小鼠乳腺导管上皮细胞的增殖

为了进一步研究TC对青春期雌鼠乳腺导管发育的影响, 对TC处理5周的小鼠乳腺组织进行H&E染色分析。结果显示, 对照组乳腺导管上皮细胞密集 (导管壁厚实、染色深), 而TC组导管上皮细胞显著稀疏 (导管壁变薄、染色浅), 说明TC处理后小鼠的乳腺导管上皮细胞密度显著降低 (图2A)。进一步通过BrdU荧光染色检测导管上皮细胞增殖活性, 发现TC处理组荧光强度明显减弱, 表明乳腺导管上皮细胞的增殖能力受到抑制 (图2B)。以上结果证实, TC暴露不仅整体抑制小鼠乳腺导管发育及分支形态发生, 同时直接阻碍乳腺导管上皮细胞的增殖进程。

3 TC通过降低青春期小鼠雌激素水平抑制乳腺发育

青春期乳腺发育受机体多种内分泌激素的共同调控, 其中雌激素对乳腺导管系统的延伸及腺泡芽的形成至关重要。为阐明TC抑制乳腺导管发育的生理机制, 对TC处理5周后小鼠血清雌激素水平进行检测。结果表明, TC处理组小鼠血清中雌二醇含量较对照组显著降低 (图3A)。在雌性哺乳动物中, 卵巢与肾上腺是分泌雌激素的主要器官, 其中卵巢颗粒细胞是合成雌二醇的重要场所[21]。因此, 进一步检测雌激素合成关键酶——芳香化酶 (aromatase) 在卵巢及肾上腺组织中的基因表达水平。结果表明, TC处理组小鼠卵巢及肾上腺组织中aromatase基因表达水平显著下调 (图3B)。并利用免疫荧光法结合定量分析检测ER*α*的表达含量发现, TC处理可显著降低中乳腺组织内ER*α*蛋白的表达。以上结果证实, 环境内分泌干扰物TC通过抑制芳香化酶介导的雌激素合成, 降低机体雌二醇水平并降低乳腺组织中ER*α*蛋白的表达与分布, 抑制组织对雌激素的响应, 进而干扰青春期小鼠乳腺导管发育。

4 TC暴露降低小鼠体内炎症水平

本实验室前期研究发现, TC暴露激活CAR能够

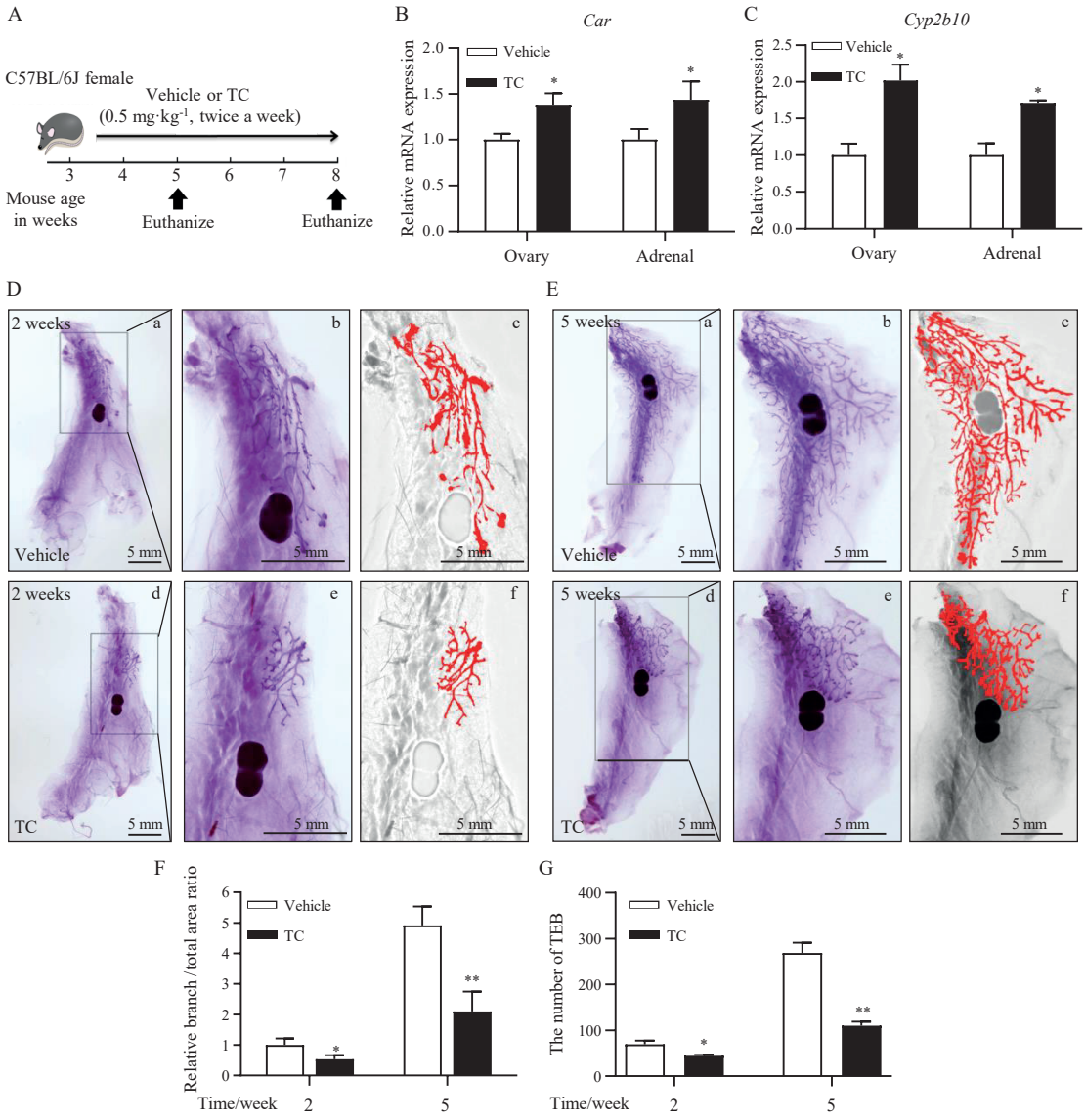


Figure 1 TCPOBOP (TC) activates CAR to inhibit mammary duct development in pubertal mice. A: Three-week-old female C57BL/6J mice were treated with vehicle or TC (0.5 mg·kg^{-1}, intraperitoneal injections, twice per week) for 2 or 5 weeks; B: Expression levels of *Car* gene in ovarian and adrenal tissues of mice treated with TC for 5 weeks; C: Expression levels of *Cyp2b10* gene in ovarian and adrenal tissues of mice treated with TC for 5 weeks; D: Schematic representation of whole-mount mammary gland staining in mice treated with TC for 2 weeks; E: Schematic representation of whole-mount mammary gland staining in mice treated with TC for 5 weeks. Scale bar: 5 mm; F: Quantitative analysis of mammary ductal structures in mice treated with TC for 2 and 5 weeks; G: Quantitative analysis of terminal end buds (TEBs) in mammary glands of mice treated with TC for 2 and 5 weeks. n = 8−10, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* vehicle

降低小鼠体重及脂肪组织重量, 抑制脂肪组织中脂质沉积[22]。鉴于肥胖状态可显著提升脂肪组织中TNF-α水平, 而TNF-α作为炎症因子已被证实可诱导脂肪成纤维细胞中aromatase的表达[23,24]。因此, 为了进一步研究TC暴露降低小鼠雌激素水平的生理机制, 对TC处理5周后小鼠血清中炎症因子水平进行检测。结果显示, TC暴露显著降低血清TNF-α含量 (图4A), 但对IL-6的水平并无显著影响 (图4B)。鉴于炎症反应涉及多组织信号网络调控, 同步检测小鼠肝脏、白色脂肪组织及乳腺组织中关键炎症因子的基因表达水平。结果显示, 处理组小鼠肝脏、脂肪和乳腺组织中环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, *Cox-2*) 和*Tnf-α*基因表达水平显著下调; 脂肪和乳腺组织中白细胞介素-1β (interleukin-1β, *Il-1β*) 及诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, *iNOS*) 表达显著降低 (图4C～E)。以上结果揭示, TC暴露通过系统性下调TNF-α等炎症因子水平, 削弱其对芳香化酶基因表达的诱导作用, 进而抑制卵巢雌激素合成, 最终导致循环

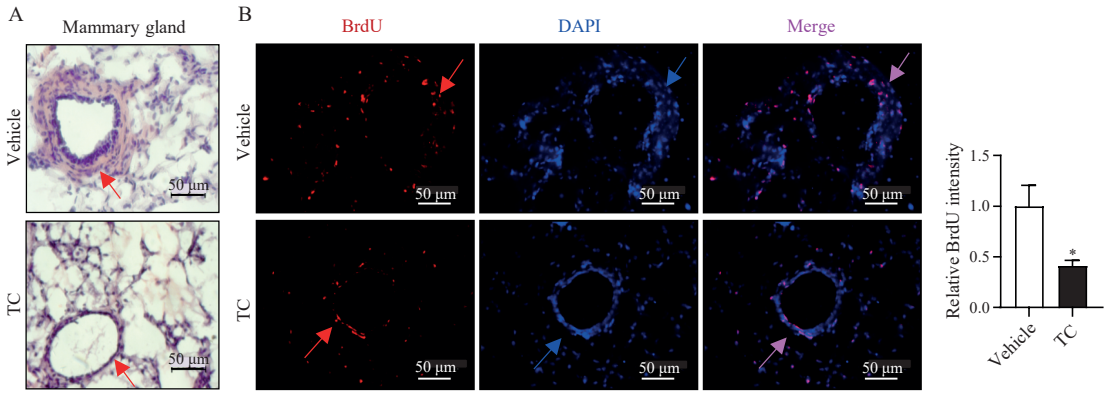


Figure 2 TC suppresses mammary ductal epithelial cell proliferation in mice *via* CAR activation. A: H&E staining of mammary duct tissue in mice treated with TC for 5 weeks; B: BrdU immunofluorescence staining of mammary duct tissue in mice treated with TC for 5 weeks and quantitative analysis. The arrows indicate the positive areas. Scale bar: 50 μm. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$ *vs* vehicle

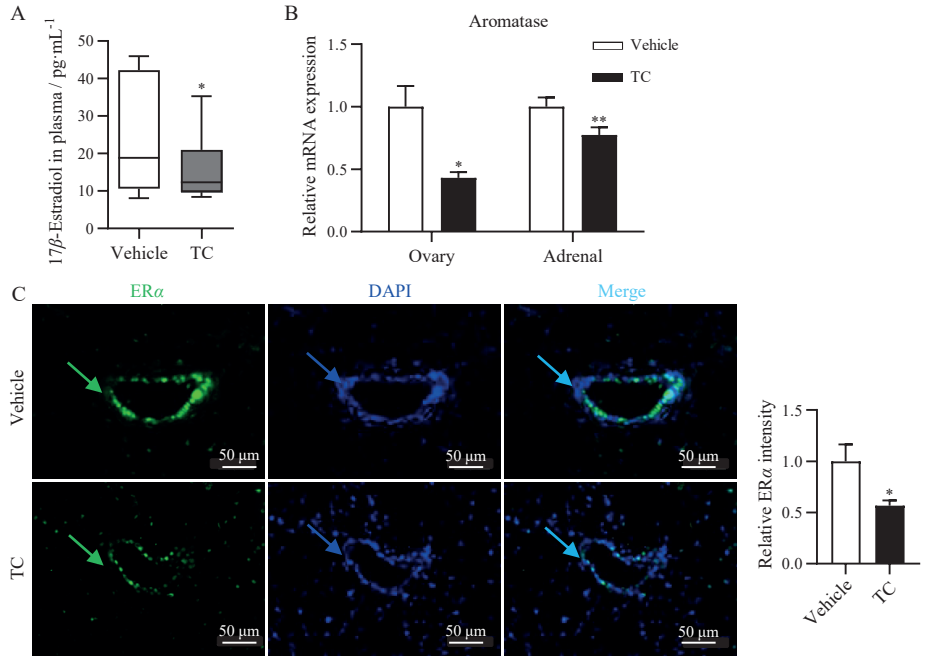


Figure 3 TC inhibits mammary gland development in adolescent mice by reducing estrogen levels. A: Serum 17β-estradiol levels in mice treated with TC for 5 weeks; B: Gene expression levels of aromatase in ovarian and adrenal tissues of mice after 5 weeks of treatment; C: ERα immunofluorescence staining of mammary duct tissue in mice treated with TC for 5 weeks and quantitative analysis. The arrows indicate the positive areas. Scale bar: 50 μm. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* vehicle

雌激素水平降低及乳腺发育障碍。

5 TC暴露促进肝脏中的雌激素灭活

为了全面探究TC对雌激素稳态的影响, 进一步探究雌激素代谢失活途径。检测TC处理2周及5周后小鼠肝脏雌激素代谢酶基因表达, 结果发现, 处理组小鼠肝脏中调控雌激素代谢相关酶 [细胞色素P450 3A11 (cytochrome P450 3A11, *Cyp3a11*)、磺基转移酶1E1 (sulfotransferase 1E1, *Sult1e1*)、磺基转移酶2A1 (sulfotransferase 2A1, *Sult2a1*)、葡萄糖醛酸转移酶1A1 (glucuronosyltransferase 1A1, *Ugt1a1*)] 的基因表达水平显著上调 (图5A～D)。进一步在蛋白水平对处理组小鼠肝脏中雌激素代谢酶SULT1E1进行研究, 与基因表达水平一致, TC暴露后小鼠肝脏中SULT1E1蛋白水平显著增加 (图5E)。综上表明, TC通过下调芳香化酶减少雌激素生成, 以及诱导SULT1E1等代谢酶加速雌激素清除, 共同导致循环雌激素水平降低, 最终抑制乳腺导管发育。

讨论

现代工业化学技术的快速发展显著增加了环境内

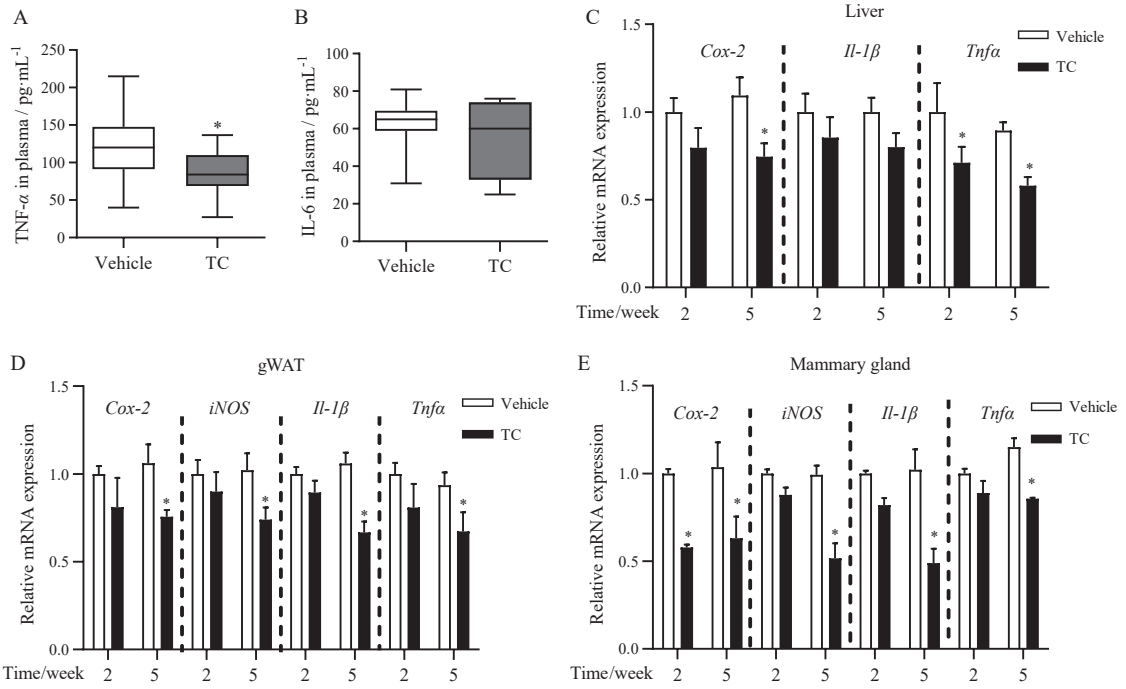


Figure 4 TC attenuates systemic inflammation in mice. A: Serum TNF-α concentration in mice after 5 weeks of TC treatment; B: Serum IL-6 concentration in mice after 5 weeks of TC treatment; C: Gene expression levels of inflammatory factors (*Cox-2*, *Il-1β*, and *Tnfα*) in mice liver after 2 or 5 weeks of TC treatment; D: Gene expression levels of inflammatory factors (*Cox-2*, *iNOS*, *Il-1β*, and *Tnfα*) in mice gonadal white adipose tissue (gWAT) after 2 or 5 weeks of TC treatment; E: Gene expression levels of inflammatory factors (*Cox-2*, *iNOS*, *Il-1β*, and *Tnfα*) in mice mammary gland after 2 or 5 weeks of TC treatment. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$ *vs* vehicle

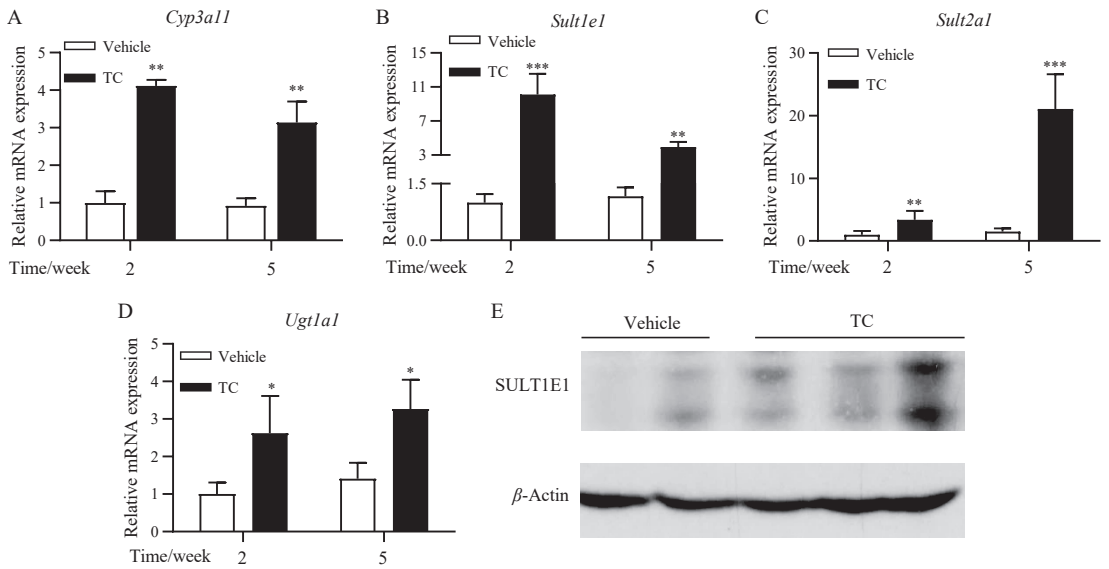


Figure 5 TC promotes estrogen inactivation in the liver. A: Gene expression levels of *Cyp3a11* in mice liver after 2 or 5 weeks of TC treatment; B: Gene expression levels of *Sult1e1* in mice liver after 2 or 5 weeks of TC treatment; C: Gene expression levels of *Sult2a1* in mice liver after 2 or 5 weeks of TC treatment; D: Gene expression levels of *Ugt1a1* in mice liver after 2 or 5 weeks of TC treatment; E: Protein levels of SULT1E1 in mice liver after 5 weeks of TC treatment. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* vehicle

分泌干扰物的暴露风险。多数EDCs (如有机磷杀虫剂、烷基酚类表面活性剂、邻苯二甲酸酯类增塑剂等)可作为核受体配体, 通过激活核受体通路干扰内分泌信号传导, 引发代谢调控紊乱, 进而对人类的生殖健康、免疫平衡及能量稳态产生持续性危害[25,26]。乳腺作为雌性哺乳动物重要的内分泌靶器官, 它的生长发育对于EDCs所致的激素紊乱高度敏感。青春期作为继胚胎期后的第二个敏感窗口期[27,28], 其特征性事件——

TEBs的形成与延伸对乳腺功能发育至关重要。TEBs是由乳腺导管上皮细胞快速生长, 在导管末端形成的球状或棒状结构, 其尚未分化且高度增殖的特性决定了它们对致癌物及化学物质具有特殊易感性[20,29]。本实验室前期研究结果表明, 给予环境毒物TC可以药理激活CAR抑制雌性青春期小鼠脂肪组织中的脂质累积[22], 抑制孕鼠的泌乳功能和乳脂稳态以及仔鼠正常生长发育[30-32]。在此基础上, 本研究继续沿用CAR激动剂TC, 系统探究核受体CAR调控青春期小鼠乳腺导管发育及雌激素稳态的作用机制。研究发现TC暴露激活CAR抑制乳腺导管的生长及乳腺上皮细胞的增殖, 并通过抑制雌激素合成酶的表达与促进雌激素代谢失活双重动态途径降低机体雌激素水平。

雌激素内源性的生物合成主要依赖于胆固醇代谢途径, 并在卵巢、脂肪组织及肾上腺多个器官的协同作用下共同完成。以卵巢颗粒细胞为核心合成场所, 胆固醇首先经细胞色素P450酶系催化为孕烯醇酮[33], 随后在aromatase的调控下反应转化为雌酮 (estrone, E1)[34,35]。17β-羟基类固醇脱氢酶可将E1还原为雌二醇(17β-estradiol, E2)。E2是体内含量最高、与雌激素受体亲和力最强的雌激素, 亦是调控乳腺导管系统发育的关键激素。本研究通过检测小鼠卵巢及肾上腺组织中基因表达水平发现, TC暴露抑制了雌激素合成酶aromatase基因的表达, 从而影响E1向雌二醇的转化, 降低血清中雌激素水平, 影响小鼠乳腺导管系统发育。已有研究表明, 肥胖所致炎症因子 (如TNF-α、COX-2)的异常升高可刺激芳香化酶表达, 促进脂肪组织中的雄激素向雌激素转化[37,38]。本研究发现TC暴露显著降低小鼠肝脏、脂肪及乳腺组织中的炎症因子水平, 中断其对aromatase的转录诱导作用, 进而抑制雌激素合成。该结果也与本课题组前期发现的CAR激动剂TC抑制小鼠脂肪组织脂质累积现象相关联[22], 脂质沉积的减少可降低肥胖相关炎症因子水平, 进一步削弱aromatase诱导效应, 降低机体雌激素水平。

雌激素的代谢失活途径始于CYPs介导的羟基化反应。随后, 通过关键酶儿茶酚-*O*-甲基转移酶 (catechol-*O*-methyl transferase , COMT) 去甲基化解毒。最后通过SULTs和UGTs分别介导硫酸化和葡萄糖醛酸化, 促进水溶性代谢物经肾或胆汁排泄[39,40]。本研究结果发现, TC暴露显著上调该代谢通路中关键酶的表达, 促进雌激素的代谢失活从而降低循环雌激素水平。鉴于CAR不仅参与多种CYP酶的表达调控, 还可调控药物代谢II相酶和转运体的表达, 因此关于TC诱导雌激素代谢酶表达的作用是否依赖于CAR的参与值得进一步探究。

综上所述, 本研究证实环境毒物TC激活核受体CAR, 抑制青春期雌性小鼠乳腺导管系统发育及乳腺上皮细胞增殖, 并通过抑制卵巢雌激素合成、促进肝脏雌激素代谢降低循环雌激素水平, 为内分泌干扰物通过核受体干扰乳腺发育及雌激素稳态的基础研究提供数据和参考。

作者贡献: 封静怡、潘石甲负责完成实验并撰写论文; 李心雨、陆子谕负责论文修改; 许鹏飞、翟永功负责指导论文; 许鹏飞负责论文框架确定和定稿。

利益冲突: 所有作者均声明不存在任何利益冲突。

References

[1] Bwayi MN, Garcia-Maldonado E, Chai SC, et al. Molecular basis of crosstalk in nuclear receptors: heterodimerization between PXR and CAR and the implication in gene regulation [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50: 3254-3275.

[2] Little M, Dutta M, Li H, et al. Understanding the physiological functions of the host xenobiotic-sensing nuclear receptors PXR and CAR on the gut microbiome using genetically modified mice [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 801-820.

[3] Xu P. Nuclear receptors in health and diseases [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 9153.

[4] Ashrap P, Zheng G, Wan Y, et al. Discovery of a widespread metabolic pathway within and among phenolic xenobiotics [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114: 6062-6067.

[5] Laurenzana EM, Coslo DM, Vigilar MV, et al. Activation of the constitutive androstane receptor by monophthalates [J]. Chem Res Toxicol, 2016, 29: 1651-1661.

[6] Rooney JP, Oshida K, Kumar R, et al. Chemical activation of the constitutive androstane receptor leads to activation of oxidant-induced Nrf2 [J]. Toxicol Sci, 2019, 167: 172-189.

[7] Yan J, Chen B, Lu J, et al. Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36: 62-70.

[8] Küblbeck J, Niskanen J, Honkakoski P. Metabolism-disrupting chemicals and the constitutive androstane receptor CAR [J]. Cells, 2020, 9: 2306.

[9] Wei P, Zhang J, Egan-Hafley M, et al. The nuclear receptor CAR mediates specific xenobiotic induction of drug metabolism [J]. Nature, 2000, 407: 920-923.

[10] Tzameli I, Pissios P, Schuetz EG, et al. The xenobiotic compound 1, 4-bis[2- (3, 5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20: 2951-2958.

[11] Skoda J, Dohnalova K, Chalupsky K, et al. Off-target lipid metabolism disruption by the mouse constitutive androstane receptor ligand TCPOBOP in humanized mice [J]. Biochem Pharmacol, 2022, 197: 114905.

[12] Smith G, Henderson CJ, Parker MG, et al. 1, 4-Bis[2- (3, 5-dichloropyridyloxy)]benzene, an extremely potent modulator of mouse hepatic cytochrome P-450 gene expression [J]. Biochem J, 1993, 289: 807-813.

[13] Dickins M. Induction of cytochromes P450 [J]. Curr Top Med Chem, 2004, 4: 1745-1766.

[14] Bhushan B, Stoops JW, Mars WM, et al. TCPOBOP-induced hepatomegaly and hepatocyte proliferation are attenuated by combined disruption of MET and EGFR signaling [J]. Hepatology, 2019, 69: 1702-1718.

[15] Musumeci G, Castrogiovanni P, Szychlinska MA, et al. Mammary gland: from embryogenesis to adult life [J]. Acta Histochem, 2015, 117: 379-385.

[16] Veltmaat JM. Prenatal mammary gland development in the mouse: research models and techniques for its study from past to present [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1501: 21-76.

[17] Hennighausen L, Robinson GW. Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland [J]. Genes Dev, 1998, 12: 449-455.

[18] McNally S, Stein T. Overview of mammary gland development: a comparison of mouse and human [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1501: 1-17.

[19] Macias H, Hinck L. Mammary gland development [J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2012, 1: 533-557.

[20] Macon MB, Fenton SE. Endocrine disruptors and the breast: early life effects and later life disease [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2013, 18: 43-61.

[21] Xiao C, Wang J, Zhang C. Synthesis, regulatory factors, and signaling pathways of estrogen in the ovary [J]. Reprod Sci, 2023, 30: 350-360.

[22] Xu P, Hong F, Wang J, et al. The CAR agonist TCPOBOP inhibits lipogenesis and promotes fibrosis in the mammary gland of adolescent female mice [J]. Toxicol Lett, 2018, 290: 29-35.

[23] Zhao Y, Nichols JE, Valdez R, et al. Tumor necrosis factor-alpha stimulates aromatase gene expression in human adipose stromal cells through use of an activating protein-1 binding site upstream of promoter 1.4 [J]. Mol Endocrinol, 1996, 10: 1350-1357.

[24] Brown KA. Metabolic pathways in obesity-related breast cancer [J]. Nat Rev Endocrinol, 2021, 17: 350-363.

[25] De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action [J]. J Environ Public Health, 2012, 2012: 713696.

[26] Yilmaz B, Terekeci H, Sandal S, et al. Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2020, 21: 127-147.

[27] Terry MB, Michels KB, Brody JG, et al. Environmental exposures during windows of susceptibility for breast cancer: a framework for prevention research [J]. Breast Cancer Res, 2019, 21: 96.

[28] Russo J, Russo IH. DNA labeling index and structure of the rat mammary gland as determinants of its susceptibility to carcinogenesis [J]. J Natl Cancer Inst, 1978, 61: 1451-1459.

[29] Russo IH, Russo J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a] anthracene [J]. J Natl Cancer Inst, 1978, 61: 1439-1449.

[30] Pan S, Guo Y, Yu W, et al. Constitutive androstane receptor agonist, TCPOBOP: maternal exposure impairs the growth and development of female offspring in mice [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 2602.

[31] Pan S, Guo Y, Yu W, et al. Environmental chemical TCPOBOP disrupts milk lipid homeostasis during pregnancy and lactation [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 249: 114463.

[32] Pan S, Yu W, Zhang J, et al. Environmental chemical TCPOBOP exposure alters milk liposomes and offspring growth trajectories in mice [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 272: 116061.

[33] Attar E, Tokunaga H, Imir G, et al. Prostaglandin E2 *via* steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94: 623-631.

[34] Attar E, Bulun SE. Aromatase and other steroidogenic genes in endometriosis: translational aspects [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12: 49-56.

[35] Starek-Świechowicz B, Budziszewska B, Starek A. Endogenous estrogens—breast cancer and chemoprevention [J]. Pharmacol Rep, 2021, 73: 1497-1512.

[36] Zhu BT, Conney AH. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives [J]. Carcinogenesis, 1998, 19: 1-27.

[37] Wang X, Simpson ER, Brown KA. Aromatase overexpression in dysfunctional adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer [J]. Steroid Biochem Mol Biol, 2015, 153: 35-44.

[38] Bhardwaj P, Au CC, Benito-Martin A, et al. Estrogens and breast cancer: mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression [J]. Steroid Biochem Mol Biol, 2019, 189: 161-170.

[39] Zhou X, Zhao Y, Wang J, et al. Resveratrol represses estrogen-induced mammary carcinogenesis through NRF2-UGT1A8-estrogen metabolic axis activation [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 155: 252-263.

[40] Treas J, Roy P, Singh KP. Chronic co-exposure to arsenic and estrogen potentiates genotoxic estrogen metabolic pathway and hypermethylation of DNA glycosylase MBD4 in human prostate epithelial cells [J]. Prostate, 2022, 82: 1273-1283.