

# 金松双黄酮对砷致大鼠海马神经细胞衰老的 干预效应

陈诚,陈雄,张爱华

贵州医科大学,环境污染与疾病监控教育部重点实验室/公共卫生与健康学院,贵州贵阳 550025

#### 摘要:

[背景] 长期砷暴露人群除表现出典型的皮肤损害体征外,往往还伴随神经行为异常症状和 体征。

[目的] 探讨金松双黄酮对亚砷酸钠致大鼠神经细胞衰老的干预效应以及细胞周期相关转录 因子 E2F1 在其中可能的介导作用。

[方法] 采用 4 μmol·L<sup>-1</sup> 亚砷酸钠作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h,并分别使用 50 μg·mL<sup>-1</sup> 银杏叶提 取物 EGb761 及四种主要银杏叶双黄酮(异银杏双黄酮、7-去甲基银杏双黄酮、金松双黄酮和 银杏双黄酮)干预 24 h,采用 CCK-8 法测定细胞活性。将 32 只 180~200 g SPF 级大鼠随机分 为对照组、染砷组(10 mg·L<sup>-1</sup>)、银杏叶提取物干预组(10 mg·kg<sup>-1</sup>)和金松双黄酮干预组 (10 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 8 只,雌雄各半。采用自由饮水方式进行染毒,连续染毒 3 个月;干预在染 毒 2 个月后进行,采用灌胃的方式进行给药,干预 1 个月。采用 HE 染色法检测大鼠海马结构 的改变,采用尼氏染色法检测海马形态及神经细胞数量的改变。此外,分别采用 β-半乳糖苷 酶(SA-β-gal)染色法和 Western blotting 法检测海马神经细胞的衰老情况及 E2F1 的表达水平。

[结果] 与染砷组相比,银杏叶提取物和四种主要的银杏叶双黄酮均有不同程度的细胞活性恢复作用(均P<0.05),其中金松双黄酮相对于银杏叶提取物在拮抗亚砷酸钠神经细胞毒性方面具有更好的活性恢复作用(P<0.05)。HE 染色和尼氏染色结果表明:与对照组相比,染砷组大鼠海马神经细胞明显减少且突触结构异常,细胞发生肿胀、核皱缩,出现空泡现象;与染砷组大鼠比较,银杏叶提取物干预组和金松双黄酮干预组大鼠海马神经细胞明显增多且突触结构较正常。SA- $\beta$ -gal 染色结果表明:与对照组(2.88±0.84)相比,染砷组(15.75±3.01)的衰老细胞数量明显增加(P<0.05);与染砷组相比,银杏叶提取物干预组(9.38±1.92)和金松双黄酮干预组(7.75±2.38)衰老细胞数量明显下降(均P<0.05)。Western blotting 结果表明:与对照组(1.00±0.17)相比,染砷组(0.65±0.19)海马中 E2F1 蛋白表达明显降低(P<0.05);与染砷组相比,金松双黄酮干预组(0.68±0.19)相比,金松双黄酮(0.89±0.18)对 E2F1 表达水平的恢复效果较好(P<0.05)。相关性分析结果表明,E2F1 蛋白表达水平与海马神经细胞 SA- $\beta$ -gal 染色阳性率呈负相关(r=-0.518, P<0.05)。

[结论] 金松双黄酮是银杏叶提取物的有效活性成分,其可有效抑制亚砷酸钠诱导的海马神 经细胞衰老,E2F1 可能在其中发挥重要的介导作用。

关键词:亚砷酸钠;金松双黄酮;海马;神经细胞衰老

Effect of sciadopitysin on sodium arsenite-induced senescence of rat hippocampal neurons CHEN Cheng, CHEN Xiong, ZHANG Aihua (Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education/School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China) Abstract:

[Background] In addition to the typical signs of skin damage, long-term arsenic exposure is often accompanied by signs and symptoms of neurobehavioral abnormalities.

**[Objective]** To investigate potential intervention effect of sciadopitysin on senescence of neurons induced by sodium arsenite in rats and possible underlying mediating effect of cell cycle-related transcription factor E2F1.

[Methods] SH-SY5Y cells were treated with 4  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> sodium arsenite for 24 h and intervened



**基金项目** 喀斯特地区特色民族医药若干基础问题研

究项目(U1812403) **作者简介** 陈诚( 1995—),女,硕士生; E-mail: 774621297@qq.com

通信作者 陈雄,E-mail: sciceInat\_cx@163.com

伦理审批 已获取利益冲突 无申报收稿日期 2021-12-12录用日期 2022-03-15

文章编号 2095-9982(2022)05-0550-06 中图分类号 R114 文献标志码 A

▶引用

陈诚,陈雄,张爱华.金松双黄酮对砷致大鼠 海马神经细胞衰老的干预效应[J].环境与职 业医学,2022,39(5):550-555.

▶本文链接 www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21587

Funding This study was funded.

Correspondence to CHEN Xiong, E-mail: sciceInat\_cx@163.com

Ethics approval Obtained Competing interests None declared Received 2021-12-12 Accepted 2022-03-15

#### To cite

CHEN Cheng, CHEN Xiong, ZHANG Aihua. Effect of sciadopitysin on sodium arsenite-induced senescence of rat hippocampal neurons[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(5): 550-555.

Link to this article www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21587

550

with 50  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup> *Ginkgo biloba* extract (EGb761) or four major biflavonoids in *Ginkgo biloba* leaves (isoginkgetin, bilobetin, sciadopitysin, and ginkgetin) for 24 h respectively. Then, cell viability was measured by CCK-8 assay. Thirty-two 180-200 g SPF rats were randomly divided into a control group, an arsenic treatment group (10 mg·L<sup>-1</sup>), a *Ginkgo biloba* extract intervention group (10 mg·kg<sup>-1</sup>), and a sciadopitysin intervention group (10 mg·kg<sup>-1</sup>), 8 rats in each group, half male and half female. The rats were treated with sodium arsenite by free drinking water for 3 consecutive months, and the intervention treatment was conducted after 2 months of poisoning with drug intake by gavage for 1 month. HE staining was used to detect structural changes in the hippocampus, while Nissl's staining was used to detect changes in hippocampal morphology and neuron numbers. Moreover, senescence-associated β galactosidase (SA-β-gal) staining and Western blotting were used to detect senescence of hippocampal neurons and the expression level of E2F1, respectively.

**[Results]** Compared to the arsenic treatment group, EGb761 and the four biflavonoids in *Ginkgo biloba* leaves effectively antagonized the inhibitory effect of sodium arsenite on cell viability (all *Ps* < 0.05), and sciadopitysin showed better restoration of cellular viability than *Ginkgo biloba* extract (*P* < 0.05). The results of HE staining and Nissl's staining showed that the hippocampal neurons in the arsenic treatment group were reduced in cell count and the synaptic structure was abnormal, with swelling, nuclear shrinkage, and vacuole, compared with the control group. The results of SA-β-gal staining showed that the number of senescent cells in the arsenic treatment group (15.75±3.01) was significantly increased compared with the control group (2.88±0.84) (*P* < 0.05); the numbers of senescent cells in the *Ginkgo biloba* extract group (9.38±1.92) and the sciadopitysin treatment group (7.75±2.38) were significantly decreased compared with the arsenic treatment group (all *Ps* < 0.05). The results of Western blotting showed that compared with the control group, the expression of E2F1 protein in hippocampus of the arsenic treatment group was significantly decreased (1.00±0.17 *vs*. 0.65±0.19, *P* < 0.05); compared with the arsenic treatment group, the protein expression level of E2F1 in hippocampus of the sciadopitysin treatment group (0.89±0.18) was significantly recovered (*P* < 0.05); compared with *Ginkgo biloba* extract (0.68±0.19), sciadopitysin had a better recovery effect on E2F1 expression level (0.89±0.18) (*P* < 0.05). The results of correlation analysis showed that the E2F1 protein expression level was negatively correlated with the positive rate of SA-β-gal staining in hippocampal neurons (*r*=-0.518, *P* < 0.05).

[Conclusion] Sciadopitysin is an effective component of *Ginkgo biloba* extract. It can effectively inhibit the senescence of hippocampal neurons induced by sodium arsenite, and E2F1 may play an important mediating role.

Keywords: sodium arsenite; sciadopitysin; hippocampus; senescence of neurons

环境砷暴露是一个全球性公共卫生问题,目前全世界有超过 2 亿人口的饮用水砷含量超标,主要分布于印度、孟加拉国、美国及中国等地<sup>[1-2]</sup>。砷中毒患者表现为全身性多器官多系统慢性损伤,患者除具有典型的皮肤损害体征外,往往还伴随神经行为异常症状和体征。该病由于其中毒机制不清,缺乏有效的治疗药物,至今尚未完全得到控制。流行病学研究表明,成人慢性砷暴露可导致脑病发生和高级神经系统功能障碍,如学习、近期记忆和注意力受损<sup>[3]</sup>。砷具有神经毒性,可穿过血脑屏障损伤脑组织,对人体中枢神经系统造成不同程度损害<sup>[4-5]</sup>,一般表现为头晕、头痛、失眠、多梦、嗜睡等。动物研究表明,长期无机砷暴露可损害大鼠学习记忆能力<sup>[6]</sup>。

研究表明,神经细胞受到外界刺激可诱导其发生 氧化应激、免疫炎症和 DNA 损伤反应等,这些因素均 可引起神经细胞发生衰老,长期衰老的神经细胞累积 可进一步造成神经功能障碍,从而引发多种神经系统 疾病<sup>[7-8]</sup>。有研究表明,砷可诱导人软骨细胞衰老,加 速大鼠关节软骨老化<sup>[9]</sup>。另据报道,阿尔茨海默病等神 经系统疾病的发生与长期低水平砷暴露有关<sup>[10]</sup>。然而, 无机砷暴露是否可引起神经细胞衰老尚不明确。细胞 周期停滞是细胞衰老的重要表现,细胞周期转录因子 E2F1 在调节细胞周期、增殖、分化和衰老方面起着关 键作用,可促进 S 期进入、DNA 合成和有丝分裂的基 因表达。段浩茹等<sup>[11]</sup>研究发现,E2F1 在大鼠子宫衰老 过程中起调控作用。E2F1 与细胞衰老的关系密切,其 可通过调控细胞增殖、自噬及 DNA 损伤修复等相关 基因的表达抑制细胞衰老。我们前期研究发现,亚砷 酸钠可抑制肝细胞 E2F1 的表达和磷酸化水平,进而导 致肝细胞活性下降<sup>[12]</sup>。因此,阐明 E2F1 在亚砷酸钠致 神经细胞衰老中的作用可为缓解砷致神经系统损伤 提供有效的干预靶点。

贵州省拥有丰富的银杏资源,银杏叶双黄酮是银 杏叶提取物重要的有效成分之一。有研究表明金松双 黄酮具有抗肿瘤、抗氧化<sup>[13]</sup>、抗衰老<sup>[14]</sup>、降低血糖血 脂等作用,而金松双黄酮是银杏叶双黄酮中的主要组 分之一。银杏叶提取物是治疗心脑血管疾病的常用药, 对临床和实验性神经系统损伤存在有益作用。然而, 在长期砷暴露引起的神经损伤中,金松双黄酮是否能 发挥其神经保护作用鲜有研究报道。本研究通过构建 砷暴露大鼠及金松双黄酮干预模型,检测其海马组织 结构的改变及转录因子 E2F1 蛋白表达变化,探究亚砷 酸钠染毒对大鼠神经系统的损伤作用及金松双黄酮 的干预效果,为人群砷中毒的防治提供实验依据。

1 对象与方法

#### 1.1 银杏干预药物筛选

将 SH-SY5Y 细胞以 2×10<sup>4</sup> 个·孔<sup>-1</sup> 接种于 96 孔板

中,细胞贴壁后,采用 4 μmol·L<sup>-1</sup> 亚砷酸钠作用于 SH-SY5Y 细胞 24 h,并分别使用 50 μg·mL<sup>-1</sup> 银杏叶提取物 EGb761(德国威玛舒培博士药厂)及四种主要银杏叶 双黄酮(异银杏双黄酮、7-去甲基银杏双黄酮、金松双 黄酮和银杏双黄酮,成都普瑞法科技开发有限公司) 干预 24 h,采用 CCK-8 法测定细胞活性。24 h 后取出 培养板,在每个孔中添加 10 μL 的 CCK-8 溶液,放在 37 °C、 5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 2 h。用酶标仪测定每个孔在波 长 450 nm 的光密度值,光密度值越大代表细胞活性 越高。

#### 1.2 实验动物分组及染毒方法

选择健康 SPF 级 SD 大鼠 32 只,雌雄各半,体重 为 180~200 g,购自贵州医科大学动物实验中心,动物 合格证号为 SCXK(辽)2020-0001;饲养于贵州医科大 学动物实验中心清洁级实验动物饲养房,温度为 20~ 25 ℃,湿度为 60%~70%,照明为每天 12 h。实验期 间,动物可自由饮水、摄食。本实验获得贵州医科大学 伦理委员会批准(批准号: 1900212),符合动物伦理学 要求。

含砷染毒溶液的配制:准确称取适量的亚砷酸 钠溶于去离子水后,稀释至 10 mg·L<sup>-1</sup>,调节至 pH 7.0, 备用。

适应性饲养 1 周后,将大鼠按体重随机分为对照 组(去离子水,标准饲料)、染砷组(10 mg·L<sup>-1</sup>)、银杏叶 提取物干预组(10 mg·kg<sup>-1</sup>)和金松双黄酮干预组 (10 mg·kg<sup>-1</sup>),每组 8 只,雌雄各半。采用自由摄食和饮 水方式进行染毒,连续染毒 3 个月;干预在染毒 2 个 月后进行,药物摄入采用灌胃的方式,干预 1 个月。每 周测定并记录大鼠的体重。

#### 1.3 大鼠体量及脑脏器系数的测定

染毒结束后,大鼠禁食 12 h 称重,经腹腔注射 0.9% 戊巴比妥钠麻醉后处理大鼠,立即心脏采血并分离脑 组织,称重并计算脑组织脏器系数。脏器系数=(脑组 织质量/体重)×100%。

#### 1.4 HE 染色法检测大鼠海马结构

取大鼠大脑的矢状面大海马,用 10%多聚甲醛液 固定 48 h,经常规脱水后进行石蜡包埋、切片,常规 HE 染色,梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。光学 显微镜下观察,图像采集分析。

#### 1.5 尼氏染色法检测海马形态及神经细胞数量

取大鼠大脑的矢状面大海马,用 10%多聚甲醛液 固定 48 h,经常规脱水后石蜡包埋、切片。常规脱水后, 加入适量的甲苯基紫染色液覆盖组织,于 56 ℃ 烤箱 中浸染1h,去离子水冲洗,尼氏分化液分化2min,无 水乙醇迅速脱水。二甲苯透明,中性树胶封片。光学显 微镜下观察,图像采集分析。

## β-半 乳 糖 苷 酶 (senescence-associated βgalactosidase, SA-β-gal)染色法检测海马神经细胞衰 老情况

将含有海马区部位的脑组织冰冻切片加入 SA-βgal 染色固定液室温固定 20 min;用磷酸盐缓冲液 (PBS)浸泡洗涤组织 3 次,每次 5 min;加入适量的染 色工作液,37 ℃ 孵育过夜,光学显微镜下观察,图像 采集分析。

# **1.7** Western blotting 法检测大鼠海马组织中 E2F1 的 表达水平

取海马组织进行匀浆,采用二喹啉甲酸(BCA)蛋 白测定试剂盒进行蛋白定量。取相同量的蛋白,进行 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),接 着转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。将膜于含 5%脱脂 奶粉的 1×含 0.05% Tween20 的三羟甲基氨基甲烷缓 冲液(TBST)中封闭 2 h, 1×TBST 洗涤 5 min,加入抗 E2F1 一抗(1:1 000 稀释)及抗β-actin(1:5 000 稀释), 4 ℃ 孵育过夜;次日早上 1×TBST 洗涤 3次,每次 10 min,加入二抗 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)(1:8 000 稀释),室温孵育 1 h, 1×TBST 洗涤 4 次,每次 15 min。 采用增强型化学发光(ECL)试剂进行显色反应,用凝胶 成像系统 Image Lab<sup>™</sup> 2.0 软件分析蛋白条带平均光密 度值。采用目标蛋白和内参蛋白(E2F1 和β-Actin)的 平均光密度比值表示蛋白的相对表达水平。

#### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,实验数据 均以均数±标准差表示。多组间比较采用单因素方差 分析,进一步组间两两比较,方差齐时采用 Bonferroni 检验,方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验;各指标间 的相关性分析采用 Spearman 相关分析。检验水准 α= 0.05。

#### 2 结果

#### 2.1 银杏叶提取物活性成分及浓度筛选

CCK-8 实验结果表明,与对照组相比,4  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> 亚砷酸钠可明显抑制细胞活性(P < 0.05);与染砷组相 比,银杏叶提取物和四种主要的银杏叶双黄酮均可不 同程度地恢复细胞活性(均P < 0.05),与银杏叶提取物 干预组比较,金松双黄酮具有较好的细胞活性恢复作 用(P < 0.05),见图 1。

552



[注]\*: P<0.05。

#### 图 1 四种银杏叶双黄酮在亚砷酸钠致神经细胞 活性抑制中的作用

Figure 1 Effects of four biflavonoids in *Ginkgo biloba* leaves on sodium arsenite-induced inhibition of neuronal viability

#### 2.2 大鼠的一般情况

实验期间,各组大鼠均未出现死亡。各组大鼠饮 食、饮水量正常,毛发、活动、精神状态等均无明显异 常;染砷组大鼠毛发色泽变得暗淡,活动量呈不同程度的降低。随着时间延长,各组大鼠体重增长速度相对稳定,各组之间差异无统计学意义(均 P>0.05),见表 1。

#### 2.3 大鼠脑组织脏器系数测定结果

对照组、染砷组、银杏提取物干预组、金松双黄酮 干预组雄性大鼠脑组织脏器系数分别为(0.35±0.04)%、 (0.42±0.04)%、(0.42±0.03)%、(0.38±0.03)%,雌性依 次为(0.63±0.04)%、(0.70±0.07)%、(0.77±0.08)%、 (0.84±0.03)%。与对照组比较,金松双黄酮干预组雌 鼠脑组织的脏器系数明显升高,差异有统计学意义 (P<0.05)。

#### 2.4 大鼠脑组织病理学观察结果

2.4.1 海马神经细胞的损伤 通过 HE 染色和尼氏染色观察到:对照组大鼠海马神经细胞形态和数量正常;染砷组大鼠海马神经细胞数量明显较对照组减少且突触结构异常,细胞发生肿胀、核皱缩,出现空泡现象(图 2);与染砷组大鼠比较,银杏叶提取物干预组和金松双黄酮干预组大鼠海马神经细胞明显增多且突触结构较正常,肿胀和空泡样变性的细胞明显减少,见图 3。

#### 表1 亚砷酸钠染毒对大鼠体重的影响 (*n*=4, $\bar{x} \pm s$ ) Table 1 Effects of sodium arsenite on body weight of rats (*n*=4, $\bar{x} \pm s$ )

								单位(Unit):g
组别	雄性							
	染毒前	第一个月	第二个月	第三个月	染毒前	第一个月	第二个月	第三个月
对照组	224.25±12.87	367.06±61.47	497.47±47.39	568.34±51.60	202.25±10.69	247.38±19.87	287.01±24.42	301.33±18.41
染砷组	215.00±4.24	350.75±62.92	470.99±25.44	512.84±35.93	207.50±8.66	246.94±15.62	271.86±16.43	287.13±19.23
银杏提取物干预组	221.75±4.57	358.50±52.40	477.56±35.14	534.79±39.27	207.25±7.27	242.69±15.28	271.46±12.26	288.64±14.40
金松双黄酮干预组	222.75±11.41	326.50±75.87	488.99±30.40	551.46±28.77	205.25±5.85	243.88±15.94	278.72±28.72	288.64±14.40
Р	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05



[注] A: 对照组; B: 染砷组; C: 银杏叶提取物干预组; D: 金松双黄酮干 预组。箭头所示: 大鼠海马神经细胞数量较对照组明显减少,细胞 发生肿胀、核皱缩,出现空泡现象。

图 2 HE 染色观察四组大鼠海马神经细胞损伤情况 Figure 2 Rat hippocampal neuron injury of four groups by HE staining



[注] A: 对照组; B: 染砷组; C: 银杏叶提取物干预组; D: 金松双黄酮干 预组。箭头所示: 大鼠海马神经细胞数量较对照组明显减少且突 触结构异常,出现空泡现象。

图 3 尼氏染色观察四组大鼠海马神经细胞数量及形态改变 Figure 3 Changes in the number and morphology of rat hippocampal neurons of four groups by Nissl's staining

2.4.2 海马神经细胞衰老 SA-β-gal 染色结果表明:
与对照组相比,染砷组的衰老细胞数量明显增加(P<</li>
0.05);与染砷组相比,银杏叶提取物干预组和金松双黄酮干预组衰老细胞数量明显下降(均 P<0.05)。结果见图 4。</li>



[注] A: 对照组; B: 染砷组; C: 银杏叶提取物干预组; D: 金松双黄酮干预组; E: 衰老细胞数量。阳性产物呈蓝色,染色深浅表示阳性程度。
 \*: P<0.05。</li>

图 4 SA-β-gal 染色观察四组大鼠海马神经细胞衰老情况 Figure 4 Senescence of rat hippocampal neurons of four groups by SA-β-gal staining

### 2.5 大鼠海马组织 E2F1 蛋白表达及其与细胞衰老的 相关性

Western blotting 实验结果表明:与对照组相比, 染砷组大鼠海马中 E2F1 蛋白表达明显降低(*P*<0.05); 与染砷组相比,金松双黄酮干预组海马中 E2F1 蛋白表 达水平明显升高(*P*<0.05);与银杏叶提取物相比,金 松双黄酮对 E2F1 表达水平的恢复效果较好(*P*<0.05)。 结果见图 5。大鼠海马中转录因子 E2F1 的表达与海 马神经细胞 SA-β-gal 染色阳性率呈负相关(*r*=-0.518, *P*<0.05)。





Figure 5 Effects of sciadopitysin on sodium arsenite-induced inhibition of E2F1 expression in rat hippocampus

#### 3 讨论

本研究结果表明,亚砷酸钠染毒 3 个月可诱导大 鼠海马神经细胞发生衰老及 E2F1 蛋白水平降低,金松 双黄酮可有效抑制亚砷酸钠所引起的神经细胞衰老 效应并恢复 E2F1 表达水平。

越来越多的研究发现,无机砷暴露可引起神经细胞损伤。Mehta等<sup>[15]</sup>研究表明,无机砷可引起神经细胞凋亡,轴突形成异常,氧化损伤加重。在砷暴露 3 个月的大鼠模型中发现,亚砷酸钠除可引起神经细胞减少和轴突异常,还可诱导其发生衰老;而神经细胞衰老是导致多种神经行为异常的关键机制<sup>[16]</sup>。因此,预防无机砷所诱导的神经细胞衰老可有效缓解神经系统疾病的发生发展。

银杏叶提取物 EGb761 是目前临床上广泛用干治 疗脑损伤等心脑血管疾病的常用药物,具有抗氧化、 抗肿瘤、神经保护及抗衰老等功效。Savaskan 等<sup>[17]</sup>研 究发现 EGb761 具有抗衰老功效。此外,Kandiah 等<sup>[18]</sup> 研究表明, EGb761 具有神经保护作用。本课题组前期 研究发现,银杏叶提取物可减轻亚砷酸钠对肝细胞的 毒性作用<sup>[19]</sup>。本研究进一步发现,10 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量 EGb761 可有效缓解亚砷酸钠诱导的大鼠海马神经细胞衰老 并有效促进 E2F1 表达水平。银杏双黄酮是银杏叶提 取物中的主要黄酮成分,具有抗氧化<sup>[20]</sup>、抗炎<sup>[21]</sup>、抗肿 瘤<sup>[22]</sup>、神经保护<sup>[23]</sup>、抗肥胖<sup>[24]</sup>等功效。为进一步阐明 EGb761 的有效活性成分,本研究选取银杏叶双黄酮主 要组分进行体外活性筛选,发现金松双黄酮对细胞活 性的恢复效果最佳。体内研究表明,金松双黄酮和 EGb761 均具有拮抗砷致神经细胞衰老功效,且金松双 黄酮干预效果更佳,表明金松双黄酮为银杏叶提取物

#### 的有效活性成分。

E2F1 是一种细胞周期相关转录因子,具有多种生物学调控功能,如调控细胞活性、凋亡、自噬、衰老等。 Zhang 等<sup>[25]</sup>研究发现促进 E2F1 表达可使初级皮质神 经元 DNA 损伤减轻,抑制 E2F1 表达会加重 DNA 损伤 和凋亡,揭示了 E2F1 在神经系统损伤中的影响。本课 题组前期研究发现,亚砷酸钠可抑制肝细胞中 E2F1 的 表达<sup>[12]</sup>。本研究进一步发现,亚砷酸钠染毒大鼠海马 组织 E2F1 表达下调,且 E2F1 表达水平与脑组织海马 区 SA-β-gal 染色阳性率呈负相关,提示 E2F1 可能介导 了无机砷对神经系统衰老的影响; 而金松双黄酮可有 效恢复 E2F1 的表达水平,进一步证明 E2F1 可能在砷 致神经细胞衰老中具有重要介导作用。

综上,本研究发现金松双黄酮可拮抗亚砷酸钠所 诱导的海马神经细胞衰老,E2F1在其中可能发挥重要 介导作用。

#### 参考文献

- [1] SHAJI E, SANTOSH M, SARATH KV, et al. Arsenic contamination of groundwater: a global synopsis with focus on the Indian Peninsula[J].
   Geosci Front, 2021, 12(3): 101079.
- [2] RODRÍGUEZ-LADO L, SUN G, BERG M, et al. Groundwater arsenic contamination throughout China [J]. Science, 2013, 341(6148): 866-868.
- [3]关怀,朴丰源.砷神经发育毒性及机制研究进展[J].中国公共卫生, 2015,31(4):538-540.
  GUAN H, PU FY. Advances in neurodevelopmental toxicity and mechanism of arsenic[J]. Chin J Public Health, 2015, 31(4):538-540.
- [4] MOCHIZUKI H. Arsenic neurotoxicity in humans[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(14): 3418.
- [5] TYLER CR, SOLOMON BR, ULIBARRI AL, et al. Fluoxetine treatment ameliorates depression induced by perinatal arsenic exposure via a neurogenic mechanism[J]. NeuroToxicology, 2014, 44: 98-109.
- [6] FRITSCHE E, CROFTON K M, HERNANDEZ A F, et al. OECD/EFSA workshop on developmental neurotoxicity (DNT): the use of non-animal test methods for regulatory purposes [J]. Altex, 2017, 34(2): 311-315.
- [7] KRITSILIS M, RIZOU SV, KOUTSOUDAKI PN, et al. Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 2937.
- [8] BAKER DJ, PETERSEN RC. Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives [J]. J Clin Invest, 2018, 128(4): 1208-1216.
- [9] CHUNG YP, CHEN YW, WENG TI, et al. Arsenic induces human chondrocyte senescence and accelerates rat articular cartilage aging [J]. Arch Toxicol, 2020, 94(1): 89-101.
- [10] O'BRYANT SE, EDWARDS M, MENON CV, et al. Long-term low-level arsenic exposure is associated with poorer neuropsychological functioning: a project FRONTIER study[J]. Int J Environ Res Public Health, 2011, 8(3): 861-874.

[11] 段浩茹, 欧阳夏荔, 金琪, 等. 基于CyclinD1/CDK4/E2F1信号通路与氧化 应激探讨艾灸治未病延缓大鼠子宫组织衰老的机制[J]. 针灸临床杂志, 2021, 37(9): 59-63.

DUAN HR, OUYANG XL, JIN Q, et al. Mechanism of preventing diseases moxibustion in delaying aging of uterine tissues in rats based on CyclinD1/ CDK4/E2F1 signaling pathway and qxidative stress[J]. J Clin Acupunct Moxibustion, 2021, 37(9): 59-63.

- [12] CHEN X, WANG D, SUN B, et al. GBE attenuates arsenite-induced hepatotoxicity by regulating E2F1-autophagy-E2F7 a pathway and restoring lysosomal activity[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(5): 4050-4065.
- [13] SUH KS, CHON S, JUNG WW, et al. Protective effects of sciadopitysin against methylglyoxal-induced degeneration in neuronal SK-N-MC cells [J]. J Appl Toxicol, 2022, 42(2): 274-284.
- [14] GU Q, LI Y, CHEN Y, et al. Sciadopitysin: active component from *Taxus chinensis* for anti-Alzheimer's disease[J]. Nat Prod Res, 2013, 27(22): 2157-2160.
- [15] MEHTA K, KAUR B, PANDEY KK, et al. Resveratrol protects against inorganic arsenic-induced oxidative damage and cytoarchitectural alterations in female mouse hippocampus[J]. Acta Histochem, 2021, 123(7): 151792.
- [16] LAUTRUP S, SINCLAIR DA, MATTSON MP, et al. NAD<sup>+</sup> in brain aging and neurodegenerative disorders [J]. Cell Metab, 2019, 30(4): 630-655.
- [17] SAVASKAN E, MUELLER H, HOERR R, et al. Treatment effects of *Ginkgo biloba* extract EGb761<sup>®</sup> on the spectrum of behavioral and psychological symptoms of dementia: meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Int Psychogeriatr, 2018, 30(3): 285-293.
- [18] KANDIAH N, ONG PA, YUDA T, et al. Treatment of dementia and mild cognitive impairment with or without cerebrovascular disease: expert consensus on the use of *Ginkgo biloba* extract, EGb761<sup>\*</sup>[J]. CNS Neurosci Ther, 2019, 25(2): 288-298.
- [19] CHEN X, WANG D, SUN B, et al. GBE attenuates arsenite-induced hepatotoxicity by regulating E2F1-autophagy-E2F7a pathway and restoring lysosomal activity[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(5): 4050-4065.
- [20] JIANG Y, LI D, MA X, et al. Ionic liquid-ultrasound-based extraction of biflavonoids from *Selaginella helvetica* and investigation of their antioxidant activity[J]. Molecules, 2018, 23(12): 3284.
- [21] LI Q, YE T, LONG T, et al. Ginkgetin exerts anti-inflammatory effects on cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in a rat model via the TLR4/ NF-кВ signaling pathway[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2018, 83(4): 675-683.
- [22] PARK Y, WOO SH, SEO SK, et al. Ginkgetin induces cell death in breast cancer cells via downregulation of the estrogen receptor [J]. Oncol Lett, 2017, 14(4): 5027-5033.
- [23] WANG Y Q, WANG M Y, FU X R, et al. Neuroprotective effects of ginkgetin against neuroinjury in Parkinson's disease model induced by MPTP via chelating iron [J]. Free Radical Res, 2015, 49(9): 1069-1080.
- [24] CHO YL, PARK JG, KANG HJ, et al. Ginkgetin, a biflavone from Ginkgo biloba leaves, prevents adipogenesis through STAT5-mediated PPARγ and C/EBPα regulation [J]. Pharmacol Res, 2019, 139: 325-336.
- [25] ZHANG Y, SONG X, HERRUP K. Context-dependent functions of E2F1: cell cycle, cell death, and DNA damage repair in cortical neurons[J]. Mol Neurobiol, 2020, 57(5): 2377-2390.

(英文编辑:汪源;责任编辑:王晓宇)