Open Access
DOI:10.3724/zdxbyxb-2025-0418

阿尔茨海默病

·专题报道·

# 菟丝子能减少阿尔茨海默病模型细胞的氧化损伤

李德雨[1]，刘　欣[1]，陆韵薇[2]，于顾然[1]

1. 南京中医药大学附属医院神经内科，江苏 南京 210029
2. 广州中医药大学第四临床医学院 深圳市中医院脑病与心理病科，广东 深圳 518000

［摘　要］ **目的**：探讨菟丝子干预阿尔茨海默病模型细胞氧化损伤的分子机制及其神经保护效应。**方法**：采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱分析菟丝子的化学成分并进行成分鉴定。构建β淀粉样蛋白诱导HT22神经元细胞氧化损伤模型。CCK-8检测细胞存活率，Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡率，DCFH-DA探针检测细胞内生成的活性氧，蛋白质印迹法检测抗氧化、凋亡相关蛋白质表达。**结果**：共鉴定出菟丝子中的381种化学成分，其中，紫云英苷、金丝桃苷、山柰酚和槲皮素为菟丝子的主要成分。0.50、0.75、1.00 mg/mL菟丝子能增加模型细胞存活率，减少细胞凋亡率，抑制活性氧过度积累，上调抗氧化相关蛋白质血红素加氧酶1和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（磷酸）：醌氧化还原酶1（NQO1）表达，下调凋亡相关蛋白质细胞色素C表达，降低活化型caspase-3/caspase-3比值和BAX/Bcl-2比值。**结论**：菟丝子可能通过激活内源性抗氧化防御体系及抑制线粒体依赖性凋亡通路减少模型细胞氧化损伤。

［关键词］ 阿尔茨海默病；菟丝子；氧化应激；线粒体凋亡；HT22细胞
［中图分类号］ R285　［文献标志码］ A

# *Cuscuta chinensis* Lam. reduces oxidative injury in Alzheimer's disease model cells

LI Deyu[1], LIU Xin[1], LU Yunwei[2], YU Guran[1] (*1. Department of Neurology, Affiliated*

收稿日期（Received）：2025-07-04　修改返回日期（Revised）：2025-12-18　接受日期（Accepted）：2026-01-19　网络预发表日期（Online）：2026-04-08

**基金项目（Funding）**：国家重点研发计划（2022YFC3501403）；国家自然科学基金（82405265）；江苏省院士工作站（BM2024101）；广东省基础与应用基础研究基金（2023A1515110832）；深圳市科技计划（JCYJ20230807094801002）

**第一作者（First author）**：李德雨，博士研究生，主要从事神经系统疾病中医药研究；E-mail：525956500@qq.com；ORCID：0009-0005-6626-6244. 刘　欣，硕士研究生，主要从事神经系统疾病中医药研究；E-mail：511316478@qq.com；ORCID：0009-0002-5758-2737

**通信作者（Corresponding author）**：陆韵薇，主治医师，硕士生导师，主要从事神经系统疾病中医药研究；E-mail：417213243@qq.com；ORCID：0000-0002-6835-2788. 于顾然，主任中医师，教授，博士生导师，主要从事神经系统疾病中医药研究；E-mail：dr.ygrdf@163.com；ORCID：0000-0002-9356-8695

*Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Department of Neurology and Psychology, the Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China*)
*LI Deyu and LIU Xin contributed equally to this work.*
*Corresponding authors: LU Yunwei, E-mail: 417213243@qq.com, ORCID: 0000-0002-6835-2788; YU Guran, E-mail: dr.ygrdf@163.com, ORCID: 0000-0002-9356-8695*

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the protective effect of *Cuscuta chinensis* Lam. against oxidative injury in an Alzheimer's disease (AD) cell model, as well as the related molecular mechanism. **Methods**: Ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry was used to analyze and identify the chemical components of *Cuscuta chinensis* Lam.. An oxidative injury model was established in HT22 neuronal cells treated with $A\beta_{1-42}$. Cell viability was measured by CCK-8 assay, and apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were detected using the DCFH-DA probe, and the expression of antioxidant- and apoptosis-related proteins was examined by Western blotting. **Results**: A total of 381 chemical components were identified from *Cuscuta chinensis* Lam., among which astragalin, hyperoside, kaempferol, and quercetin were the main constituents. Cell experiments showed that *Cuscuta chinensis* Lam. at concentrations of 0.50, 0.75, and 1.00 mg/mL increased the viability of $A\beta_{1-42}$-treated HT22 cells, decreased the apoptosis rate, inhibited ROS excessive accumulation, upregulated the expression of the antioxidant-related proteins heme oxygenase-1 and NQO1, downregulated the expression of the apoptosis-related protein cytochrome C, and reduced the ratios of activated caspase-3/caspase-3 and BAX/Bcl-2. **Conclusion**: *Cuscuta chinensis* Lam. may attenuate oxidative injury in AD model cells by activating the endogenous antioxidant defense system and inhibiting the mitochondrial-dependent apoptotic pathway.

[**Key words**] Alzheimer's disease; *Cuscuta chinensis* Lam.; Oxidative stress; Mitoptosis; HT22 cell

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(5): 404-413.]

[**缩略语**] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD);β淀粉样蛋白(amyloid β-protein,Aβ);超高效液相色谱–四极杆飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry,UPLC-Q-TOF-MS);聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis,PAGE);十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS);胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease,caspase);血红素加氧酶1(heme oxygenase-1,HO-1);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC);碘化丙啶(propidium iodide,PI);B细胞淋巴瘤2(B cell lymphoma 2,Bcl-2);Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein,BAX);还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸):醌氧化还原酶1[nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) hydrogen:quinone oxidoreductase 1,NQO1];增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS);杜氏改良Eagle培养基(Dulbecco's modified Eagle medium,DMEM);2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(2′,7′-dichlorodihy-

drofluorescein diacetate,DCFH-DA);苯甲磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride,PMSF);乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetra-acetic acid,EDTA);含吐温-20的Tris缓冲液(Tris buffered saline with Tween-20,TBST);磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K);蛋白激酶B(protein kinase B,PKB,Akt);哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR);淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein,APP);早老蛋白1(presenilin-1,PS1)

AD是一种以进行性认知功能障碍为特征的神经退行性疾病,是痴呆最常见的类型[1]。据估计,85岁以上老年人AD患病率高达25%~50%,该病已成为老年人群的主要医疗问题之一[2]。在全球人口老龄化加剧的背景下,AD患病率持续升高,该病导致的进行性认知衰退不仅引发患者失能率和死亡率上升,还带来长期护理成本激增等问题,已成为全球公共卫生系统的沉重负担[3]。

氧化损伤是AD发生和发展的早期关键事件,其发生早于纤维丝(后者最终沉积为不溶性Aβ斑块)和神经原纤维缠结等典型病理改变。Aβ聚集和沉积则进一步加剧氧化损伤和炎症反应,从而对神经元造成进行性损伤[4]。目前,AD的发病机制尚未完全阐明,主要假设包括淀粉样蛋白级联、τ蛋白异常磷酸化、胆碱能缺陷、锌平衡失调、炎症和氧化损伤等[5]。由于发病机制复杂,兼具疾病异质性和动态进展特性,单纯依赖单靶向药物或局部病理调控难以实现AD全病程管理。

在中医学理论中,AD属于“痴呆”的范畴,病机多呈本虚标实,历代医家总结其致病因素多为七情内伤、久病不愈、年老体虚等。中医药治疗痴呆具有悠久的历史,可根据辨证分型进行个体化精准治疗,具有多维度协同干预、减毒增效等方面的优势。菟丝子是旋花科植物菟丝子(*Cuscuta chinensis* Lam.)的成熟种子,具有补益肝肾、养肝明目、止泻、安胎等功效[6]。近年来,越来越多的研究表明菟丝子在缓解AD症状方面具有潜力。现代药理学研究证实菟丝子具有抑制氧化应激反应、抑制神经细胞凋亡、改善血管微循环、调节神经递质代谢等多种作用[7];Sayed等[8]和Lin等[9]分别在秀丽隐杆线虫和东莨菪碱诱导的氧化损伤小鼠模型中观察到菟丝子的神经保护及抗氧化作用;Ju等[10]证实菟丝子对AD小鼠神经元突触有神经保护作用;赵倩等[11]证实菟丝子可通过抑制糖原合成酶激酶3β活性改善AD模型大鼠认知功能。研究还发现菟丝子所含的黄酮类、苯丙素类等多种化学成分与抗氧化等作用有关[12],菟丝子多糖具有抗氧化作用,作用机制可能与清除自由基有关[13];金丝桃苷可通过抑制线粒体依赖性凋亡途径保护脑微血管内皮细胞[14];山奈酚和槲皮素则展现出良好的抗炎及抗氧化活性[15-17]。尽管现有研究提示菟丝子对AD患者的神经及认知功能具有保护作用,但其具体机制尚未阐明。本研究结合UPLC-Q-TOF-MS、细胞实验等方法,从调控氧化应激和线粒体凋亡通路方面探讨菟丝子在AD细胞模型中的神经保护机制,以期为菟丝子治疗AD提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、材料、试剂和仪器

HT22小鼠海马神经元细胞(CL-0697)为中国武汉普诺赛生命科技有限公司产品。菟丝子(20240608-01)购于江苏省中医院,经江苏省中医院药学部邱召娟主任中药师鉴定为正品。

$A\beta_{1-42}$(D9A3A)兔单克隆抗体(14974)为美国Cell Signaling Technology公司产品;Omni-Easy™一步法免染PAGE凝胶快速制备试剂盒(PG222)为中国上海雅酶生物医药科技有限公司产品;CCK-8试剂盒(C0037)、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)(P0015L)、*N*-乙酰半胱氨酸(S0077)为中国上海碧云天生物技术有限公司产品;180 kDa Prestained Protein Marke(MP102-01)为中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品;caspase 3/P17/P19单克隆抗体(66470-2-Ig)、HO-1/HMOX1多克隆抗体(10701-1-AP)为美国Proteintech公司产品;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(E-CK-A211)为中国武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司产品;活化型caspase-3兔单克隆抗体(A11021)、Bcl-2兔多克隆抗体(A11313)、BAX兔多克隆抗体(A12009)、β-肌动蛋白兔单克隆抗体

（高稀释度）（AC026）为中国爱博泰克生物科技有限公司产品；细胞色素C兔单克隆抗体（11940）为美国Cell Signaling Technology公司产品；NQO1兔单克隆抗体（AFRM0252）为中国湖南艾方生物科技有限公司产品；特超敏ECL底物试剂盒（BL520A）为中国安徽白鲨生物科技有限公司产品；甲醇（A452-4）、甲酸（A117-50）为美国Thermo Fisher Scientific公司产品。

高速冷冻离心机（Heraeus Fresco 21）、标准型翘板摇床（SK-R1807-E）为美国Scilogex公司产品；Q Exactive™组合型四极杆Orbitrap™质谱仪为美国Thermo Fisher Scientific公司产品；恒温水浴箱（GFL-1002）为德国GFL公司产品；超高效液相色谱仪（ACQUITY UPLC I-Class）、色谱柱（ACQUITY UPLC HSS T3，2.1 mm×100 mm，1.8 μm）为美国Waters公司产品；倒置显微镜（CKX41）为日本Olympus公司产品；全自动酶标仪（ELX-800）为美国BioTek公司产品；电子天平（BS124S）为德国Sartorius公司产品；全自动化学发光图像分析系统（Tanon-4600）为中国上海天能生命科学有限公司产品；分析型流式细胞仪（FACSCelesta）为美国BD公司产品。

### 1.2 UPLC-Q-TOF-MS分析菟丝子成分

精密称取菟丝子1 g，粉碎过筛，按文献方法制备样品溶液[18]。精密量取上述样品溶液1 mL置于5 mL离心管中，加入900 μL 70%甲醇，涡旋混匀，于4 ℃、16 000×*g*离心15 min，取上清液。色谱分离时柱温设置为45 ℃。流动相A为水溶液（含0.1%甲酸，v/v），B为乙腈，梯度洗脱：0~3 min，0% B；3~18.5 min，0%~20% B；18.5~20 min，20%~35% B；20~26 min，35%~40% B；26~35 min，40%~95% B；35~38 min，95% B；38~38.1 min，95%~0% B；38.1~40 min，0% B。流速为0.35 mL/min，进样量为2 μL，检测波长范围为210~400 nm。

定性分析在高分辨率质谱仪上进行，分别在正、负离子模式下采集数据。正离子模式下喷雾电压为3800 V，毛细管温度保持在320 ℃；负离子模式下喷雾电压设为−3200 V。在质荷比100~1500范围内采集高精度全扫描谱图。分子表征依赖于精确质量数、内部碎片和同位素分布。使用上海鹿明生物科技有限公司开发的LuMet-TCM数据库对菟丝子的化学成分进行鉴定和分析，筛选出Score≥70.0且Fragmentation Score≥80.0的化合物，并根据《中国药典》及相关文献对菟丝子的记载[6, 14-16]进一步确定其主要成分。

### 1.3 菟丝子冻干粉制备、细胞培养及分组

用纯水浸泡菟丝子30 min，文火煎煮两次，收集药液，离心及过滤后取上清液[19]制备冻干粉，制备好后置于−20 ℃保存、备用。

采用$A\beta_{1-42}$寡聚体诱导HT22细胞损伤构建AD细胞模型[20-21]，在不影响细胞活性前提下取合理浓度范围进行后续实验。具体操作为：取对数生长期的细胞进行消化、离心、计数，将细胞悬液的密度调整为$5\times10^4$个/mL，然后将100 μL细胞悬液均匀接种到96孔板中。设正常对照组、模型对照组、菟丝子组和抗氧化剂组。菟丝子组加入含不同浓度菟丝子（0.10、0.25、0.50、0.75、1.00、2.50、5.00 mg/mL）和含有20 μmol/L $A\beta_{1-42}$寡聚体的新鲜培养基100 μL，正常对照组加入100 μL培养基，模型对照组加入含20 μmol/L $A\beta_{1-42}$寡聚体的培养基100 μL，抗氧化剂组加入含5 mmol/L *N*-乙酰半胱氨酸和含有20 μmol/L $A\beta_{1-42}$寡聚体的新鲜培养基100 μL。每个组别设置三个复孔，在96孔板的边缘孔中加入PBS不接种细胞，置于培养箱中预培养24 h。

### 1.4 CCK-8检测细胞存活率

各组干预24 h后移除药液，每孔加入含10% CCK-8试剂的DMEM培养基100 μL，轻微振荡96孔板混匀，避光条件下继续孵育1 h。使用酶标仪在450 nm波长处检测吸光度值，并计算细胞存活率。细胞存活率（%）=（实验组吸光度值−空白对照组吸光度值）/（正常对照组吸光度值−空白对照组吸光度值）×100%。其中空白对照组仅有培养基无细胞。

### 1.5 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡率

取$1\times10^5$~$5\times10^5$个重悬细胞300×*g*离心5 min，弃上清液。用PBS洗涤细胞一次，加入1×Annexin V结合缓冲液500 μL，轻轻吹打重悬细胞，然后依次加入Annexin V-FITC染色液5 μL、50 μg/mL PI染色液5 μL，轻柔涡旋混匀，室温避光孵育15~20 min后立即上机检测。使用FlowJo软件分析。

### 1.6 DCFH-DA探针检测细胞内活性氧含量

取$3\times10^5$个/mL的细胞悬液，按每孔2 mL均匀接种于六孔板中，24 h后给药，用无血清DMEM稀释DCFH-DA至10 μmol/L，去除细胞培养液，加入1 mL稀释后的DCFH-DA覆盖细胞，37 ℃避光

孵育20 min,PBS洗涤细胞三次,去除未进入细胞内的DCFH-DA,倒置荧光显微镜下拍照,ImageJ软件处理图像,通过测量平均荧光强度进行定量。

### 1.7 蛋白质印迹法检测抗氧化和凋亡相关蛋白质表达

取3×10$^5$个/mL的细胞悬液,按每孔2 mL均匀接种于六孔板中,24 h后给药,设正常对照组、模型对照组和菟丝子组。使用预冷的PBS清洗细胞三次。每孔加入200 μL含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀裂解液(放射免疫沉淀裂解液∶PMSF∶蛋白酶抑制剂∶磷酸酶抑制剂∶EDTA=100∶1∶1∶1∶1),冰上裂解20 min。收集细胞裂解液,超声破碎三次(每次15 s),4 ℃、13 225×*g*离心20 min,取上清液。采用Bradford法测定蛋白质浓度后,加入上样缓冲液,100 ℃加热10 min,−20 ℃保存备用。

制备10% SDS-PAGE凝胶,恒压200 V电泳30 min。随后将蛋白质湿法转至甲醇激活的聚偏二氟乙烯膜,冰浴条件下以恒流400 mA转膜15~30 min。转膜后,用快速封闭液封闭膜15 min,分别与稀释后的一抗(BAX、Bcl-2、活化型caspase-3、caspase-3、细胞色素C、NQO1、HO-1、β-肌动蛋白等)4 ℃孵育过夜。次日,TBST清洗三次,与辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶3000)室温孵育1 h,再次用TBST清洗。使用ECL化学发光液和Tanon成像系统曝光显影,ImageJ软件分析条带灰度值。

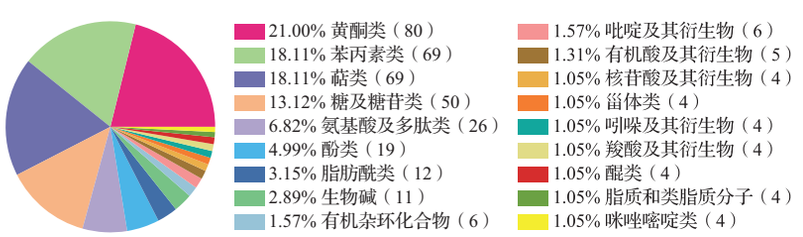
### 1.8 统计学方法

使用SPSS 22.0和Graph Pad Prism 9.5.0软件进行统计分析。正态分布的计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用Tukey检验进行事后多重比较,方差不齐时采用Dunnett's T3检验,$P$<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 菟丝子成分鉴定及分析

共鉴定出381种化学成分,主要包括黄酮类、苯丙素类、萜类、糖及糖苷类、氨基酸及多肽类、酚类、脂肪酰类、生物碱、有机杂环化合物、吡啶及其衍生物等(图1)。在LuMet-TCM数据库中,共筛选出24种化合物(附图1、附表1)。然后,根据《中国药典》及相关文献对菟丝子的记载[6, 14-16],进一步确定化合物紫云英苷(Score=76.25, Fragmentation Score=97.79)、金丝桃苷(Score=72.04, Fragmentation Score=92.5)、山柰酚(Score=74.93, Fragmentation Score=90.89)和槲皮素(Score=71.3, Fragmentation Score=84.48)为菟丝子的主要成分(附图2)。




括号中的数字代表各类化学成分数.

**图1** 菟丝子化学成分分布

**Figure 1** Distribution of chemical components in *Cuscuta chinensis* Lam.

### 2.2 菟丝子增加AD模型细胞存活率

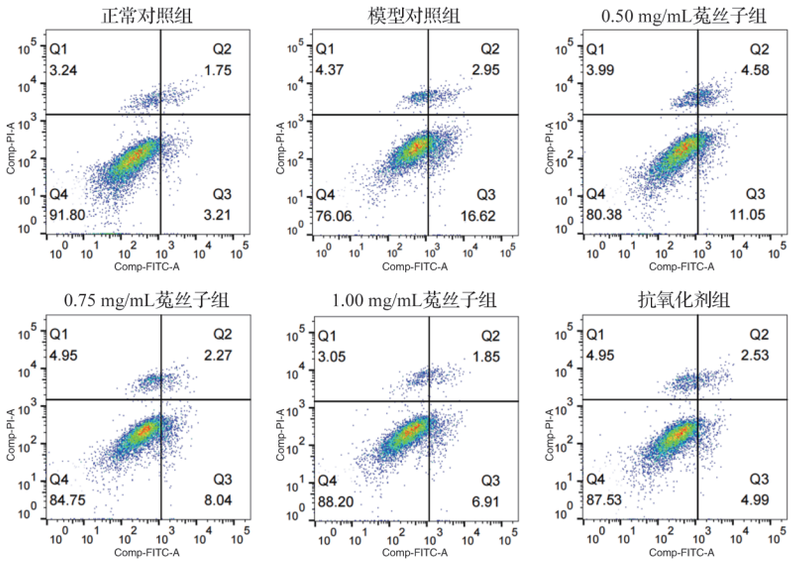
与正常对照组比较,模型对照组细胞活性减弱[细胞存活率分别为(100±3)%和(83±3)%,$P$<0.01],表明AD细胞模型构建成功。与模型对照组比较,0.25、0.50、0.75、1.00 mg/mL菟丝子作用后细胞活性增强[细胞存活率分别为(97±3)%、(98±3)%、(100±3)%、(100±4)%,均$P$<0.05],并呈浓度依赖性;而2.50、5.00 mg/mL菟丝子溶液作用后细胞活性减弱,细胞存活率分别为(97±1)%和(80±2)%。基于此,选择0.50、0.75、1.00 mg/mL菟丝子溶液进行后续实验。

### 2.3 菟丝子减少AD模型细胞凋亡率

与正常对照组比较,模型对照组细胞凋亡率增加[分别为(4.11±0.72)%和(21.99±3.10)%,$P$<0.01];与模型对照组比较,0.50、0.75、1.00 mg/mL菟丝子作用后细胞凋亡率降低,分别为(14.48±3.84)%、(12.85±2.07)%和(9.87±2.24)%,其中1.00 mg/mL菟丝子作用后的细胞凋亡率与模型对照组间差异有统计学意义($P$<0.05),且接近抗氧化剂组[(6.64±1.61)%]。见图2。结果提示,菟丝子可减少AD模型细胞凋亡。

### 2.4 菟丝子抑制AD模型细胞活性氧过度积累

与正常对照组比较,模型对照组活性氧水平显著升高(分别为21.41±2.24和44.57±1.35,$P$<0.01);与模型对照组比较,0.50、0.75、1.00 mg/mL菟




与正常对照组比较，模型对照组细胞凋亡率显著增加；与模型对照组比较，不同浓度菟丝子组细胞凋亡率明显降低，并表现出浓度相关性，抗氧化剂组细胞凋亡率也明显降低. FITC：异硫氰酸荧光素；PI：碘化丙啶.

**图2** 各组细胞凋亡情况（Annexin V-FITC/PI双染法）

**Figure 2** Apoptosis of cells in each group (Annexin V-FITC/PI double staining)

丝子作用后活性氧水平降低，分别为40.95±3.14、33.88±0.17和29.38±1.25，其中0.75、1.00 mg/mL菟丝子组活性氧水平与模型对照组间差异有统计学意义（均$P$<0.05），且接近抗氧化剂组（26.20±0.62）。见图3。结果提示，菟丝子可抑制活性氧过度积累。

### 2.5 菟丝子上调抗氧化相关蛋白质表达并下调凋亡相关蛋白质表达

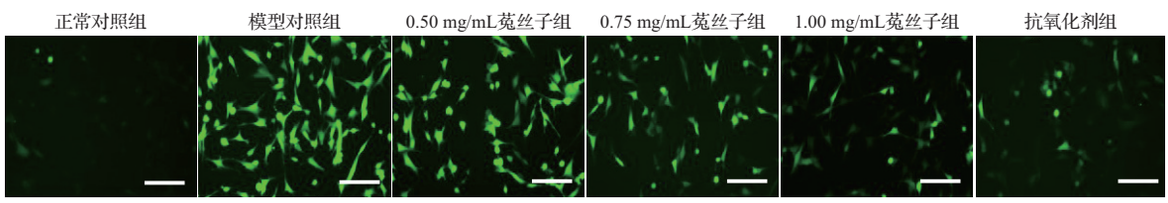
与正常对照组比较，模型对照组抗氧化相关蛋白质HO-1和NQO1表达水平显著降低（均$P$<0.05）。与模型对照组比较，0.50、0.75、1.00 mg/mL菟丝子组HO-1表达水平呈浓度依赖性显著升高（均$P$<0.05）；0.75、1.00 mg/mL菟丝子组NQO1表达水平显著升高（均$P$<0.05）。结果见图4和表1，提示菟丝子可增强抗氧化相关蛋白质表达。

与正常对照组比较，模型对照组活化型caspase-3/caspase-3比值、BAX/Bcl-2比值及细胞色素C表达水平均显著升高（均$P$<0.05）。与模型对照组比较，0.50、0.75、1.00 mg/mL菟丝子组活化型caspase-3/caspase-3比值呈浓度依赖性降低（均$P$<0.01）；1.00 mg/mL菟丝子组BAX/Bcl-2比值降低且与模型对照组间差异有统计学意义（$P$<0.05）；0.75、1.00 mg/mL菟丝子组细胞色素C表达水平显著降低（均$P$<0.01）。结果见图4和表1，提示菟丝子可抑制线粒体依赖性凋亡通路。

综上所述，菟丝子可通过促进抗氧化相关蛋白质表达、下调凋亡相关蛋白质表达，缓解$A\beta_{1\text{-}42}$诱导的氧化损伤，减少AD模型细胞凋亡。

## 3 讨 论

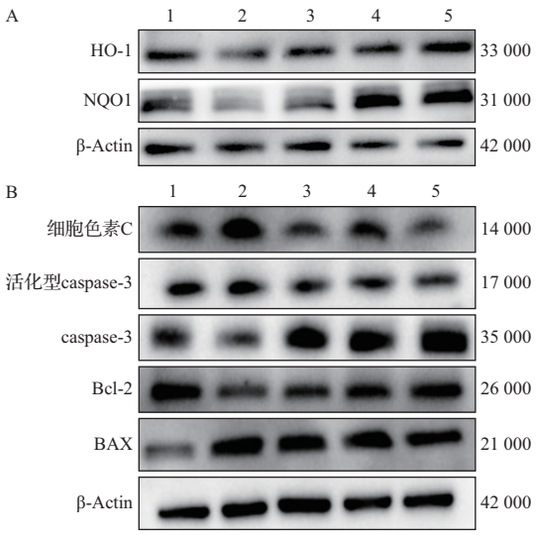
AD是一种以认知功能进行性损害为特征的神经退行性疾病，其发病机制复杂，目前临床上仍缺乏能够延缓或阻断疾病进展的有效治疗药物[22-23]。西药治疗AD多针对单一靶点，仅缓解症状且疗效有限[24]，中医药因多成分、多靶点、多通路优势，可能成为治疗新选择[25]。近年来，菟丝子治疗AD的效果逐渐得到认可[7, 26]。本文资料利用UPLC-Q-TOF-MS技术系统分析了菟丝子的化学成分，并以$A\beta_{1\text{-}42}$诱导的HT22小鼠海马神经元细胞为模型，探讨了菟丝子对AD细胞模型的




与正常对照组比较，模型对照组可见活性氧（绿色荧光）积累显著增加，而不同浓度菟丝子组和抗氧化剂组活性氧积累较模型对照组明显减少. 标尺=50 μm. DCFH-DA：2′，7′-二氯荧光素二乙酸酯.

**图3** 各组细胞活性氧检测结果（DCFH-DA荧光探针法）

**Figure 3** Reactive oxygen species levels of cells in each group ( DCFH-DA fluorescent probe method )




A:抗氧化相关蛋白质;B:凋亡相关蛋白质. 1:正常对照组;2:模型对照组;3:0.50 mg/mL菟丝子组;4:0.75 mg/mL菟丝子组;5:1.00 mg/mL菟丝子组. HO-1:血红素加氧酶1;NQO1:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸):醌氧化还原酶1;β-Actin:β-肌动蛋白;caspase-3:胱天蛋白酶3;Bcl-2:B细胞淋巴瘤2;BAX:Bcl-2相关X蛋白.

**图4** 各组细胞抗氧化和凋亡相关蛋白质表达电泳图

**Figure 4** Western blot of antioxidant-related and apoptosis-related protein expression in each group

**表1** 各组细胞抗氧化和凋亡相关蛋白质表达水平比较

**Table 1** Comparison of the expression levels of antioxidant-related and apoptosis-related proteins in cells among groups

($\bar{x}\pm s$, $n$=3)

| 组 别 | HO-1 | NQO1 | 活化型caspase-3/caspase-3 | BAX/Bcl-2 | 细胞色素C |
|---|---|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 0.97±0.06 | 1.00±0.15 | 1.03±0.15 | 0.84±0.18 | 0.82±0.11 |
| 模型对照组 | 0.49±0.04* | 0.48±0.09* | 1.55±0.14* | 2.04±0.42* | 1.25±0.07* |
| 0.50 mg/mL菟丝子组 | 0.80±0.09# | 0.80±0.07 | 0.89±0.06## | 1.32±0.16 | 0.96±0.13 |
| 0.75 mg/mL菟丝子组 | 1.18±0.16# | 0.87±0.03# | 0.77±0.05## | 0.92±0.15 | 0.71±0.07## |
| 1.00 mg/mL菟丝子组 | 1.63±0.18## | 1.20±0.05## | 0.61±0.08## | 0.72±0.19# | 0.53±0.08## |

与正常对照组比较,*$P$<0.05;与模型对照组比较,#$P$<0.05,##$P$<0.01. HO-1:血红素加氧酶1;NQO1:还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(磷酸):醌氧化还原酶1;caspase-3:胱天蛋白酶3;Bcl-2:B细胞淋巴瘤2;BAX:Bcl-2相关X蛋白.

保护作用及其分子机制。

中药(复方或单味药)的药理效应是其多种化学成分协同作用的结果[27]。本文资料首先采用UPLC-Q-TOF-MS技术对菟丝子的化学成分进行了全面表征,共鉴定出381种化学成分,其中以黄酮类、苯丙素类等为主。进一步分析提示,紫云英苷、金丝桃苷、山奈酚和槲皮素为菟丝子的主要成分。既往研究显示,紫云英苷可能通过抑制PI3K/Akt-mTOR信号通路改善AD转基因动物模型APP/PS1小鼠的认知障碍,增强小鼠海马神经元自噬流[28];金丝桃苷可通过抗氧化、抗炎、抗凋亡、抗Aβ聚集及抑制胆碱酯酶等多种机制,改善AD相关细胞(如神经元和脑微血管内皮细胞)Aβ毒性[29];山奈酚可清除多种自由基,抑制活性氧生成,并增强抗氧化酶表达[30];槲皮素显示出明显的抗氧化特性和抗AD作用[31-32]。上述结果为后续系统阐释菟丝子多成分、多靶点干预AD的作用机制提供了重要依据。

在明确菟丝子化学成分的基础上,本文资料进一步验证其神经保护效应。$A\beta_{1-42}$诱导后HT22细胞凋亡率显著升高,而菟丝子干预后,凋亡率呈浓度依赖性降低,其作用效果接近抗氧化剂,提示菟丝子对$A\beta_{1-42}$寡聚体诱导的神经元损伤具有直接的保护作用。Aβ诱导的氧化损伤是AD病理进程中的关键早期事件,主要表现为过量的活性氧可损伤脂质、蛋白质和DNA,并触发级联凋亡信号[33-34]。一方面,HO-1和NQO1作为抗氧化反应元件调控的下游关键效应蛋白,其表达上调是细胞抵御氧化应激的重要机制[35-36]。具体而言,HO-1可通过降解血红素生成具有抗氧化活性的胆绿素和一氧化碳,NQO1则能直接清除超氧化物并再生抗氧化剂[37-38]。本文资料显示,菟丝子干预后,细胞内活性氧过度积累显著降低,HO-1和NQO1表达水平显著上调,提示菟丝子能够有效激活神经元内源性抗氧化防御系统,增强细胞清除活性氧的能力,减轻$A\beta_{1-42}$诱导的氧化应激损伤。另一方面,线粒体既是活性氧的主要生成场所,也是氧化损伤的首要靶标,在Aβ诱导的神经元凋亡中扮演重要角色[39-41]。氧化损伤可诱导线粒体膜电位崩溃,并促进促凋亡蛋白BAX向线粒体膜转位,进而增加线粒体膜通透性,导致细胞色素C从线粒体释放进入细胞质[42-43],激活caspase级联反应,最终通过活化caspase-3诱导细胞凋亡[44-46]。本文资料显示,菟丝子显著抑制$A\beta_{1-42}$诱导的细胞色素C释放,降低BAX/Bcl-2比值和活化

型caspase-3/caspase-3比值，提示菟丝子通过阻断线粒体依赖性凋亡通路，有效抑制$A\beta_{1-42}$诱导的神经元凋亡。

综上所述，菟丝子可能通过上调HO-1、NQO1等抗氧化相关蛋白质的表达，增强神经元的抗氧化防御能力，减轻Aβ诱导的氧化应激损伤；同时，菟丝子可能通过调控BAX与Bcl-2平衡，阻断细胞色素C介导的caspase凋亡级联反应，抑制线粒体依赖性凋亡通路，最终实现对神经元的保护。本文资料为菟丝子在AD治疗中的潜在应用提供了新的实验证据，体现了中医药多成分、多靶点、多通路整体调节的特色和优势。然而，研究仍存在一定局限性。首先，本文资料基于细胞模型，未能完全反映AD在体内的复杂病理机制；其次，菟丝子提取物中发挥关键作用的活性成分及其直接作用的分子靶点有待进一步阐明。未来将采用AD转基因动物模型，对菟丝子及其主要活性成分的体内药效进行系统研究，以推动其临床转化。

本文附加文件见电子版。

**志谢** 本研究得到国家重点研发计划（2022YFC3501403）、国家自然科学基金（82405265）、江苏省院士工作站（BM2024101）、广东省基础与应用基础研究基金（2023A1515110832）和深圳市科技计划（JCYJ20230807094801002）支持

**Acknowledgements** This study was supported by National Key R&D Program of China (2022YFC3501403), National Natural Science Foundation of China (82405265), Jiangsu Provincial Academician Workstation (BM2024101), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2023A1515110832), and Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20230807094801002)

**作者贡献** 李德雨、刘欣、陆韵薇和于顾然参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释，起草研究论文或修改重要智力性内容. 所有作者均已阅读并认可最终稿件，并对数据的完整性和安全性负责. 具体见电子版

**Author Contributions** LI Deyu, LIU Xin, LU Yunwei and YU Guran participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

**数据可用性** 本研究的相关数据已在论文正文及附件中完整呈现

**Data Availability** All relevant data supporting the findings of this study are fully available within the article and supplementary materials

**医学伦理** 本研究不涉及人体或动物实验

**Ethical Approval** This study does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**Conflict of Interests** The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

## 参考文献（References）

[1] MCKHANN G M, KNOPMAN D S, CHERTKOW H, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheime's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease[J]. **Alzheimers Dement**, 2011, 7(3): 263-269.

[2] SUN Z K, YANG H Q, CHEN S D. Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease[J]. **Transl Neurodegener**, 2013, 2(1): 6.

[3] KIM H N, LEE J H, BOSCARDIN J, et al. Plasma β-hydroxybutyrate concentration, genetic risk, and the incidence of Alzheimer's disease: a prospective study of 261 933 participants[J]. **Clin Nutr**, 2025, 46: 1-9.

[4] JIA W, SU Q, CHENG Q, et al. Neuroprotective effects of palmatine via the enhancement of antioxidant defense and small heat shock protein expression in Aβ-transgenic *Caenorhabditis elegans*[J]. **Oxid Med Cell Longev**, 2021, 2021: 9966223.

[5] KOZIN S A, KECHKO O I, ADZHUBEI A A, et al. Switching on/off amyloid plaque formation in transgenic animal models of Alzheimer's disease[J]. **Int J Mol Sci**, 2024, 25(1): 72.

[6] 国家药典委员会. **中华人民共和国药典:一部**[M]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 222.
National Pharmacopoeia Board. **Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume Ⅰ**[M]: 2020 ed. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 222. (in Chinese)

[7] 方永光, 王　莎, 代欣旖, 等. 菟丝子及其有效成分

治疗阿尔茨海默病的药理机理研究进展[J]. **江苏中医药**, 2024, 56(12): 73-78.
FANG Yongguang, WANG Sha, DAI Xinyi, et al. Review of pharmacological mechanism of Semen Cuscutae and active ingredients in treating Alzheimer's disease[J]. **Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine**, 2024, 56(12): 73-78. (in Chinese)

[8] SAYED S M A, ALSEEKH S, SIEMS K, et al. Identification of a hydroxygallic acid derivative, zingibroside R1 and a sterol lipid as potential active ingredients of *Cuscuta chinensis* extract that has neuroprotective and antioxidant effects in aged *Caenorhabditis elegans*[J]. **Nutrients**, 2022, 14(19): 4199.

[9] LIN M K, LEE M S, HUANG H C, et al. *Cuscuta chinensis* and C. campestris attenuate scopolamine-induced memory deficit and oxidative damage in mice [J]. **Molecules**, 2018, 23(12): 3060.

[10] JU I G, KIM N, CHOI J G, et al. Cuscutae japonicae semen ameliorates memory dysfunction by rescuing synaptic damage in Alzheimer's disease models[J]. **Nutrients**, 2019, 11(11): 2591.

[11] 赵 倩, 罗洪斌, 凌志峰, 等. 基于GSK-3β信号通路探讨菟丝子对AD模型大鼠认知功能障碍的影响[J]. **中国药理学通报**, 2021, 37(12): 1775-1776.
ZHAO Qian, LUO Hongbin, LING Zhifeng, et al. Effects of *Cuscuta* on cognitive dysfunction of AD model rats by GSK-3β signaling pathway[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2021, 37(12): 1775-1776. (in Chinese)

[12] 陈鲁宁, 胡 扬, 辛国松, 等. 菟丝子化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测[J]. **中草药**, 2024, 55(15): 5298-5314.
CHEN Luning, HU Yang, XIN Guosong, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects of Cuscutae Semen and its quality marker prediction[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2024, 55(15): 5298-5314. (in Chinese)

[13] 叶春林, KHUDOYBERDIEV Ilkhomjon, 陈 颖, 等. 菟丝子多糖的抗氧化活性和抑制肿瘤细胞增殖的研究[J]. **河南工业大学学报(自然科学版)**, 2020, 41(5): 73-78.
YE Chunlin, KHUDOYBERDIEV Ilkhomjon, CHEN Ying, et al. Study on the antioxidant activity and the inhibition of tumor cell proliferation of polysaccharides from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam.[J]. **Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)**, 2020, 41(5): 73-78. (in Chinese)

[14] LIU C Y, BAI K, LIU X H, et al. Hyperoside protects the blood-brain barrier from neurotoxicity of amyloid beta 1-42[J]. **Neural Regen Res**, 2018, 13(11): 1974-1980.

[15] ALEXANDER C, PARSAEE A, VASEFI M. Polyherbal and multimodal treatments: kaempferol- and quercetin-rich herbs alleviate symptoms of Alzheimer's disease [J]. **Biology (Basel)**, 2023, 12(11): 1453.

[16] HERRERA T E S, TELLO I P S, MUSTAFA M A, et al. Kaempferol: unveiling its anti-inflammatory properties for therapeutic innovation[J]. **Cytokine**, 2025, 186: 156846.

[17] IMRAN M, RAUF A, ALI SHAH Z, et al. Chemopreventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: a comprehensive review[J]. **Phytother Res**, 2019, 33(2): 263-275.

[18] 解利东, 孙向明, 胡 扬, 等. 基于超高效液相色谱的特征图谱和多成分定量分析法的菟丝子质量评价[J]. **理化检验-化学分册**, 2025, 61(8): 914-922.
XIE Lidong, SUN Xiangming, HU Yang, et al. Quality evaluation on Cuscutae Semen by characteristic chromatogram and multi-component quantification analysis based on ultra-high performance liquid chromatography [J]. **Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)**, 2025, 61(8): 914-922. (in Chinese)

[19] 中华中医药学会. 中药汤剂煎煮规范: T/CACM 1366—2021[S]. 北京: 中华中医药学会, 2021.
China Association of Chinese Medicine. Specification of traditional Chinese medicine decoction: T/CACM 1366—2021[S]. Beijing: China Association of Chinese Medicine, 2021. (in Chinese)

[20] 孟美辰, 王志远, 王丽娟, 等. 光甘草定衍生物MG01通过抑制铁死亡改善$A\beta_{1-42}$对HT22细胞的损伤[J]. **中草药**, 2025, 56(3): 867-876.
MENG Meichen, WANG Zhiyuan, WANG Lijuan, et al. Glabridin derivative MG01 protect HT22 cell from $A\beta_{1-42}$-induced injury by inhibiting ferroptosis[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2025, 56(3): 867-876. (in Chinese)

[21] LIU Y, PENG L, LI M, et al. STAT6-mediated SOCS2 alleviates cognitive impairments and neuronal damage in Alzheimer's disease rat models and $A\beta_{1-42}$-stimulated HT-22 cells[J]. **Mol Neurobiol**, 2026, 63(1): 622.

[22] BREIJYEH Z, KARAMAN R. Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment[J]. **Molecules**, 2020, 25(24): 5789.

[23] 王英全, 梁景宏, 贾瑞霞, 等. 2020—2050年中国阿尔茨海默病患病情况预测研究[J]. **阿尔茨海默病及相关病杂志**, 2019, 2(1): 289-298.
WANG Yingquan, LIANG Jinghong, JIA Ruixia, et al. Alzheimer disease in China (2015—2050) estimated using the 1% population sampling survey in 2015[J]. **Chinese Journal of Alzheimer's Disease and Related Disorders**, 2019, 2(1): 289-298. (in Chinese)

[24] ZHENG Q, WANG X. Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy[J]. **Protein Cell**, 2025, 16(2): 83-120.

[25] JARRELL J T, GAO L, COHEN D S, et al. Network medicine for Alzheimer's disease and traditional Chinese medicine[J]. **Molecules**, 2018, 23(5): 1143.

[26] 沈 裕. 早期AD肾虚型认知特点及补肾中药(山萸肉、菟丝子)干预线虫AD模型行为学影响研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
SHEN Yu. Cognitive characteristics of kidney deficiency

type early-stage AD and effect of kidney-tonifying herbs (Corni Fructus and Cuscutae Semen) on C.elegans AD model behavioral manifestation[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022. (in Chinese)

[27] QI Y, YAN J, HUANG X, et al. Targeting tumor-associated macrophage polarization with traditional Chinese medicine active ingredients: dual reversal of chemoresistance and immunosuppression in tumor microenvironment[J]. **Pharmacol Res**, 2025, 216: 107788.

[28] 杨翠珠. 紫云英苷抑制 PI3K/Akt-mTOR 通路调节 AD 小鼠海马神经元自噬流[D]. 广州: 广东药科大学, 2022.
YANG Cuizhu. Astragalin regulates autophagic flux by inhibiting PI3K/Akt-mTOR pathway in hippocampal neurons of AD mice[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2022. (in Chinese)

[29] YUAN J, DONG X, ZHOU S, et al. Pharmacological activities and therapeutic potential of Hyperoside in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases: a systemic review[J]. **Neuroscience**, 2024, 563: 136-147.

[30] SIMUNKOVA M, BARBIERIKOVA Z, JOMOVA K, et al. Antioxidant *vs*. prooxidant properties of the flavonoid, kaempferol, in the presence of Cu(Ⅱ) ions: a ROS-scavenging activity, Fenton reaction and DNA damage study[J]. **Int J Mol Sci**, 2021, 22(4): 1619.

[31] REN T, CHEN Z, XIE J, et al. Studies on the role of *Rosa roxburghii* Tratt quercetin in improving intestinal metabolism and the microbiome in mice with Alzheimer's disease[J]. **J Funct Foods**, 2024, 114: 106046.

[32] TANIGAWA S, FUJII M, HOU D X. Action of Nrf2 and Keap1 in ARE-mediated NQO1 expression by quercetin [J]. **Free Radic Biol Med**, 2007, 42(11): 1690-1703.

[33] PLUTA R, KIŚ J, JANUSZEWSKI S, et al. Cross-talk between amyloid, tau protein and free radicals in post-ischemic brain neurodegeneration in the form of Alzheimer's disease proteinopathy[J]. **Antioxidants**, 2022, 11(1): 146.

[34] JELLINGER K A. Alzheimer 100-highlights in the history of Alzheimer research[J]. **J Neural Transm**, 2006, 113(11): 1603-1623.

[35] JI X, LUO H, LI X, et al. Structural characterization, anti-aging activity and mechanisms investigation *in vivo* of a polysaccharide from *Anthriscus sylvestris*[J]. **Int J Biol Macromol**, 2024, 279(Pt 3): 135256.

[36] CHENG M, YUAN C, JU Y, et al. Quercetin attenuates oxidative stress and apoptosis in brain tissue of APP/PS1 double transgenic AD mice by regulating Keap1/Nrf2/HO-1 pathway to improve cognitive impairment [J]. **Behav Neurol**, 2024, 2024: 5698119.

[37] DE ALMEIDA A J P O, DE OLIVEIRA J C P L, DA SILVA PONTES L V, et al. ROS: basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways[J]. **Oxid Med Cell Longev**, 2022, 2022(1): 1225578.

[38] ROSS D, SIEGEL D. NQO1 in protection against oxidative stress[J]. **Curr Opin Toxicol**, 2018, 7: 67-72.

[39] SWERDLOW R H. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria[J]. **Biochim Biophys Acta BBA Mol Basis Dis**, 2011, 1812(12): 1630-1639.

[40] D'APOLITO E, SISALLI M J, TUFANO M, et al. Oxidative metabolism in brain ischemia and preconditioning: two sides of the same coin[J]. **Antioxidants (Basel)**, 2024, 13(5): 547.

[41] KERWIN D, ABDELNOUR C, CARAMELLI P, et al. Alzheimer's disease diagnosis and management: perspectives from around the world[J/OL]. **Alzheimers Dement Diagn Assess Dis Monit (Amst)**, 2022, 14(1): e12334.

[42] MORI M, NAKAGAMI H, MORISHITA R, et al. N141I mutant Presenilin-2 gene enhances neuronal cell death and decreases bcl-2 expression[J]. **Life Sci**, 2002, 70 (21): 2567-2580.

[43] THOMENIUS M J, WANG N S, REINEKS E Z, et al. Bcl-2 on the endoplasmic reticulum regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins[J]. **J Biol Chem**, 2003, 278(8): 6243-6250.

[44] CHEN H H, CHEN Y T, YANG C C, et al. Melatonin pretreatment enhances the therapeutic effects of exogenous mitochondria against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats through suppression of mitochondrial permeability transition[J]. **J Pineal Res**, 2016, 61(1): 52-68.

[45] MAO Z, ZHENG Y L, ZHANG Y Q, et al. Chronic application of nonylphenol-induced apoptosis *via* suppression of bcl-2 transcription and up-regulation of active caspase-3 in mouse brain[J]. **Neurosci Lett**, 2008, 439(2): 147-152.

[46] KALANI K, YAN S F, YAN S S. Mitochondrial permeability transition pore: a potential drug target for neurodegeneration[J]. **Drug Discov Today**, 2018, 23(12): 1983-1989.

［本文编辑　余　方　沈　洁］