·论著·一次研究·

肉苁蓉促神经干细胞增殖活性成分初探

胡江雪，刘傲雪，米祖正，海梦雪，李　强

北京中医药大学中药学院（北京 102488）

【摘要】**目的** 研究肉苁蓉促进体外神经干细胞（NSCs）增殖的活性成分，初步明确其药效物质基础。**方法** 通过系统溶剂萃取法将肉苁蓉提取物按极性分离为不同部位；体外培养NSCs，以CCK-8法测定细胞光密度值并计算增殖率；以促NSCs增殖活性为指标，采用活性追踪法筛选有效部位；运用常压柱色谱和HPLC法等对有效部位进行分离，并经核磁共振波谱法鉴定化合物结构；通过CCK-8法评价各单体化合物对NSCs增殖的影响。**结果** 获得了松果菊苷、肉苁蓉苷A和肉苁蓉苷C等3个活性成分，其促NSCs增殖率分别为48.58%、37.06%和19.98%。**结论** 肉苁蓉的3个苯乙醇苷类化合物具有促进NSCs增殖作用，为研发神经保护产品提供了新思路。

【关键词】肉苁蓉；神经干细胞；活性成分；松果菊苷；肉苁蓉苷A；肉苁蓉苷C

【中图分类号】R285.5　　【文献标识码】A

Preliminary exploration of bioactive components from *Cistanches Herba* promoting neural stem cell proliferation

HU Jiangxue, LIU Aoxue, MI Zuzheng, HAI Mengxue, LI Qiang

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Corresponding author: LI Qiang, Email: lq_cn@126.com

【Abstract】**Objective** To investigate the active constituents of *Cistanches Herba* that promote the proliferation of neural stem cells (NSCs) *in vitro* and to preliminarily clarify the pharmacodynamic material basis. **Methods** The extract of *Cistanches Herba* was separated into fractions with different polarities by systematic solvent extraction. NSCs were cultured *in vitro*, and optical density (*OD*) values were detected by the CCK-8 assay to calculate the proliferation rate. Using the promotion of NSC proliferation as an indicator, the active fractions were screened by an activity-guided method. The active fractions were further separated by conventional column chromatography and preparative HPLC, and the compound structures were identified by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy comparison with reference compounds. Finally, the effects of the individual compounds on NSC proliferation were evaluated by the CCK-8 assay. **Results** Three active components, echinacoside, cistanoside A, and cistanoside C, were obtained. Their proliferation-promoting rates on NSCs were 48.58%, 37.06%, and 19.98%, respectively. **Conclusion** The three phenylethanoid glycosides isolated from *Cistanches Herba* exhibit significant promoting effects on neural stem cell proliferation, providing new insight for the development of neuroprotective agents.

【Keywords】*Cistanches Herba*; Neural stem cells; Active ingredients; Echinacoside; Cistanoside A; Cistanoside C

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202605065

通信作者：李强，博士，研究员，博士研究生导师，Email：lq_cn@126.com

脑老化是老年人群中常见的生理病理过程。在机体衰老的过程中，脑部出现脑萎缩、神经递质减少等改变，甚至产生β淀粉样蛋白等病理性蛋白损伤神经细胞，轻者记忆力减退、健忘，重者可能引发阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病，给老年人的健康及生活质量带来了极大影响，也给家庭和社会增添了沉重的经济与医疗负担[1-3]。

神经干细胞（neural stem cells，NSCs）是指存在于中枢神经系统中具有可再生能力的一类多能性神经细胞[4-5]。NSCs主要位于侧脑室室管膜下区（subventricular zone，SVZ）和海马齿状回颗粒细胞下层（subgranular zone，SGZ），SVZ的NSCs通过喙部抵达嗅球并分化为神经元，SGZ的NSCs在此处产生新的齿状颗粒神经元[6]。

NSCs的自我更新能力有限，NSCs衰老是脑老化的关键因素。随着年龄的增长，NSCs在不断分化为神经元的同时，干细胞巢中的干细胞数量在不断降低[7]。同时，在衰老大脑中，神经源性生态位（SVZ、SGZ）的神经发生受损，各种细胞因子的表达水平发生退行性变化，导致局部微环境改变，进而影响NSCs的增殖与分化[8]。

中医理论认为，肾生精，精生髓，髓藏于脑，脑髓的生成、充盈与肾精密切相关，肾足则精旺，精旺则髓盈，髓盈则脑得所养[9]。脑髓是脑结构和功能的基础，脑髓的产生依赖肾中精气的不断充养。肾精对于脑老化相关症状的治疗具有重要意义[10]。

肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉（*Cistanche deserticola* Y. C. Ma）或管花肉苁蓉［*Cistanche tubulosa*（Schrenk）Wight］的干燥带鳞叶的肉质茎，始载于《神农本草经》[11]，被列为上品，素有“沙漠人参”之称。《中国药典》2025年版[12]记载其具有补肾阳、益精血、润肠通便之功，用于肾阳不足、精血亏虚等疾病的治疗。现代药理学研究表明，肉苁蓉含有苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类、木脂素类、多糖类等多种化学成分[13]，具有保护神经、抗痴呆、抗衰老、调节免疫等多种药理活性。其中，苯乙醇苷类是肉苁蓉的主要活性成分类型，已报道的化合物达37种之多。已有研究表明，肉苁蓉苯乙醇苷可通过激活Wnt/β-连环蛋白C（β-catenin）信号通路促进缺血性中风小鼠SVZ的NSCs增殖，改善神经功能[14]；果菊苷可能通过提高衰老小鼠脑组织中一氧化氮的含量舒张血管、丰富血氧含量、增强超氧化物歧化酶活性，进而使减轻脂质过氧化反应减轻而延缓衰老[15]。毛蕊花糖苷可能通过预防氧化应激引起其的神经元凋亡或增强海马区神经生长因子的表达，来逆转衰老小鼠的认知障碍、改善空间学习能力，进而发挥神经保护作用、延缓衰老[16]。肉苁蓉总苷可保护快速老化小鼠亚系8（senescence-accelerated mouse prone/8，SAMP8）小鼠海马CA1区神经元、可显著提高突触可塑性，进而改善认知功能，其提高突触可塑性可能与增加雄激素特异性受体介导的血清睾丸激素水平相关[17]。然而，目前关于肉苁蓉中具体哪些苯乙醇苷类单体化合物具有促进NSCs增殖的活性，以及不同化合物之间活性差异的构效关系，尚缺乏系统研究。

基于上述研究背景，本研究拟采用活性追踪分离策略，以CCK-8法检测NSCs增殖率作为活性指标，系统筛选肉苁蓉中促进NSCs增殖的活性成分，旨在明确肉苁蓉促神经再生的物质基础，为肉苁蓉的质量控制及神经保护相关产品的开发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

AVANCE NEO 600型核磁共振波谱仪（美国布鲁克公司）；LC3000型高效液相色谱仪（北京创新通恒有限公司）；BSA124S型分析天平（德国赛多利斯公司）；BJ-2CD型净化工作台（上海博迅实业有限公司医疗设备厂）；311型二氧化碳恒温细胞培养箱和Countess3型细胞计数仪购自赛默飞世尔科技公司（美国）；Epoch型酶标仪（美国BioTek仪器有限公司）；TS2-S-SM型倒置相差显微镜（日本Nikon公司）。

1.2 主要药品与试剂

肉苁蓉（产地：新疆，批号：24070902）购自时珍堂巴东药业有限公司，北京中医药大学刘春生教授鉴定为列当科植物肉苁蓉（*Cistanche deserticola* Y.C.Ma）的干燥带鳞叶的肉质茎；松果菊苷（批号：AZ22031406，纯度98%）和肉苁蓉苷A对照品（批号：AFCC3102，纯度98%）购自成都埃法生物科技有限公司；肉苁蓉苷C对照品（河北品科研生物科技有限公司，批号：MHJ07156TZ，纯度98%）；AB-8型大孔树脂（批号：20220315，

北京索莱宝科技有限公司）；二氯甲烷（批号：20230201325）和石油醚（批号：20220801429）购自天津致远化学试剂有限公司；无水乙醚（北京市通广精细化工公司委托制造，批号：20220926）；DMEM/F12培养基（批号：2912966）、青链霉素混合液（批号：2441878）、bFGF（批号：032308.L2723）及B27无血清添加剂（批号：2814927）均购自赛默飞世尔科技有限公司；D-Hank′s解剖液（北京索莱宝科技有限公司，批号：240005003）；胎牛血清（杭州天杭生物科技公司，批号：23110704）；PBS缓冲液（上海逍鹏生物科技有限公司，批号：2349389）；CCK-8试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，批号：7E2070D）；DMSO-d_6（山东科源生化有限公司，批号：C16340961）。

1.3 实验动物

SPF级孕15~17 d的SD雌性大鼠购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号：SYXK（京）2023-0011。孕鼠由供应商按SPF级标准在屏障环境中繁育饲养，生产及饲养条件符合GB 14925—2010《实验动物　环境及设施》的相应要求；动物经检疫合格后，装入专用运输车运至本实验室，运输过程符合实验动物运输的相关规定。

动物在到货当日称体重（300 ~ 350 g），随即进行麻醉取材，孕鼠未在本单位动物房进行适应性饲养，实验期间未给予任何受试物或其他干预。实验经过北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审查，符合相关伦理要求（伦理批件号：BUCM-1-2024050901-1039）。

1.4 方法

1.4.1 NSCs的原代培养及传代

将孕15 ~ 18 d的SD雌性大鼠称体重，用无水乙醚麻醉，麻醉后的大鼠固定于手术台，75%乙醇消毒大鼠腹部，沿腹中线剪开皮肤组织、腹膜，打开腹腔，取出串状子宫置于75%乙醇中，迅速转移至超净台。于冰冷的D-Hank′s解剖液中剥除子宫壁、胎衣，剪断脐带，取出胎鼠，清洗血污并置于干净的D-Hank′s解剖液中。

分离胎鼠大脑半球，剥离脑膜、血丝，将大脑半球剪碎并用吸管吹打，加胰蛋白酶消化5 ~ 10 min，等体积胎牛血清终止消化，离心（106×*g*）5 min，细胞悬液过200目细胞筛，即得原代NSCs。将单细胞悬液置于显微镜下计数并调整细胞浓度为1.0×10^6个/mL，接种至细胞培养瓶中，置于37 ℃、5% CO_2的培养箱中培养。每3 d进行半量换液，每5 ~ 7 d传代。

取材当日，显微镜下可见大量均匀且密集的小圆球状细胞悬浮生长（图1-A）。在原代NSCs提取分离的过程中，脑膜、血丝、胎牛血清会使NSCs分化，故在取材过程中应尽量将脑膜、血丝剥离干净，在使用胎牛血清终止消化后，应使用基础培养基反复多次洗弃血清。在培养过程中，NSCs逐渐聚集成神经球（图1-B），背景出现黑点状细胞碎片，这可能是因为除NSCs外的杂细胞在培养过程中因营养不足死亡。48 h后，大部分细胞聚集为神经球，折光率较强（图1-C）。3 ~ 5 d后，绝大部分细胞聚集成球，神经球增大，中心较暗，折光率降低，部分神经球出现聚集现象，此时应更换培养基进行传代培养（图1-D和图1-E）。传代培养后的NSCs与原代NSCs生长状态相似，成球速度更快，形状更规则，视野更纯净（图1-F）。

1.4.2 NSCs的鉴定

经本课题组鉴定[18-19]，本实验所培养细胞为NSCs，第三代纯度可达95%以上，可用于后续实验。

1.4.3 CCK-8法检测肉苁蓉各流份对NSCs增殖的影响

取第3代培养的NSCs悬液以1×10^6/mL的密度每孔100 μL接种于96孔板内。设置给药组（100 μL各浓度待测药液+100 μL细胞悬液）、药物调零组（100 μL各浓度待测药液+100 μL完全培养基）、对照组（100 μL完全培养基+ 100 μL细胞悬液）、完全调零组（200 μL完全培养基）。于培养箱中培养72 h，每孔加入20 μL CCK-8溶液，孵育后于450 nm波长处检测各孔光密度（*OD*）值。按以下公式计算NSCs增殖率：

增殖率（%）=［（给药组*OD*值-药物调零组*OD*值）/（对照组*OD*值-完全调零组*OD*值）-1］×100%

1.4.4 肉苁蓉活性追踪分离流程

取肉苁蓉3 kg，加8倍量75%乙醇回流提取，浓缩后得肉苁蓉醇提物（CRE）。药渣晾干后，加8倍量水回流提取，浓缩得肉苁蓉水提物（CRW）。CRE部位依次经石油醚（60 ~ 90 ℃）、乙酸乙酯、正丁醇萃取，浓缩得石油醚部位

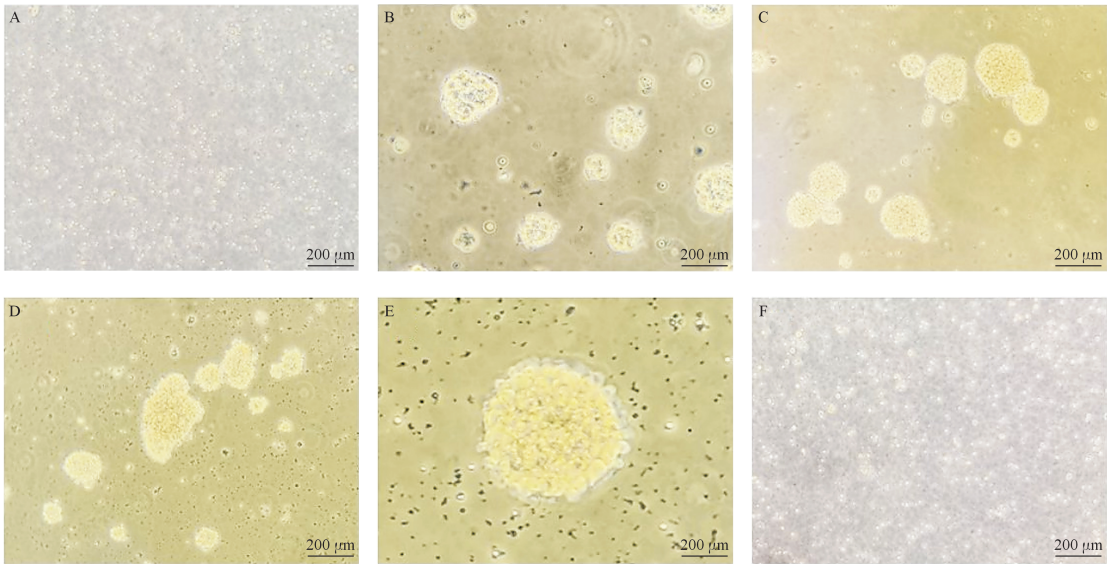


图1 NSCs传代培养的细胞生长状态（100×）

Figure 1. Growth status of NSCs in subculture （100×）

注：A.取材第1天的NSCs；B.接种培养24 h的NSCs；C.接种培养48 h的NSCs；D.接种培养96 h的NSCs；E.接种培养96 h的神经球；F.传代后的NSCs。

（CRE-PE）、乙酸乙酯部位（CRE-EA）、正丁醇部位（CRE-nBu）、剩余水部位（CRE-W）。其中，CRE-nBu以AB-8大孔树脂柱依次经水、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇、95%乙醇洗脱，分别浓缩得各洗脱部位Fr.A1、Fr.A2、Fr.A3、Fr.A4、Fr.A5。其中Fr.A2以硅胶柱经二氯甲烷-甲醇（20∶1、10∶1、7∶1、5∶1、3∶1、1∶1）、甲醇及水依次洗脱，甲醇与水的洗脱流分合并，浓缩各流分得到Fr.B1、Fr.B2、Fr.B3、Fr.B4、Fr.B5、Fr.B6、Fr.B7。其中Fr.B4以制备液相经甲醇-水分离，分别浓缩得各流份Fr.C1、Fr.C2、Fr.C3、Fr.C4、Fr.C5、Fr.C6、Fr.C7。Fr.C3（4 mg）、Fr.C4（5 mg）、Fr.C5（3 mg）经重结晶后获得3个化合物。每一步分离工作完成后即进行活性测定，选择活性较高的流分再进一步分离。分离总流程见图2。

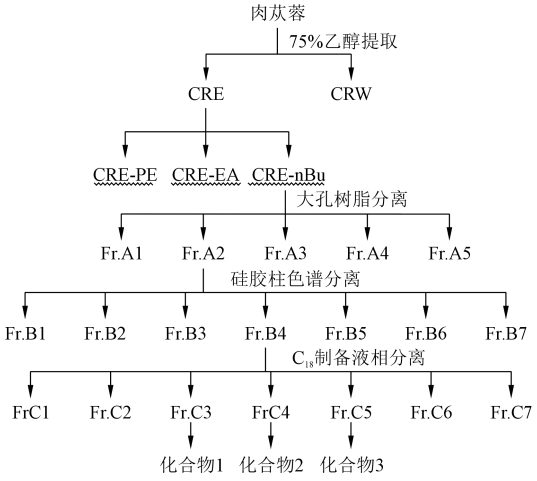


图2 肉苁蓉活性追踪分离流程

Figure 2. Separation scheme for activity-guided isolation of active constituents from *Cistanches Herba*

1.4.5 活性成分结构鉴定及对NSCs增殖的促进作用

取分离所得单体化合物，以DMSO-d_6溶解，采用AVANCE NE0 600型核磁共振波谱仪测定^{1}H-核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）谱、^{13}C-NMR及异核单量子相干谱（heteronuclear single quantum coherence，HSQC）、异核多键相关谱（heteronuclear multiple bond correlation，HMBC）、氢-氢相关谱（homonuclear correlation spectroscopy，^{1}H-^{1}H COSY）。以DMSO-d_6溶剂峰定标（δH 2.50，δC 39.52），化学位移以δ（ppm）表示，偶合常数J以Hz表示。结合二维核磁数据并与文献比对，鉴定化合物结构。

取松果菊苷、肉苁蓉苷A、肉苁蓉苷C在超净台内用完全培养基溶解，配制成浓度为0.600 0 μmol/mL的药液，0.22 μm滤器过滤除菌，密封，置于4 ℃保存备用。使用时加入完全培养基将0.600 0 μmol/mL药液稀释至0.300 0、0.150 0、0.075 0 、0.037 5 μmol/mL，得待测药液。

1.5 统计学分析

采用SPSS 20.0统计软件处理数据。数据均以$\bar{x} \pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析

（one-way ANOVA），方差齐性者两两比较采用LSD法，方差不齐者采用Tamhane′s T2法。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肉苁蓉不同部位促NSCs增殖作用比较

2.1.1 CRE和CRW部位活性比较

结果显示，肉苁蓉CRE、CRW各部分均存在促进NSCs增殖的活性成分，其中CRE部位（800 μg/mL）促NSCs增殖作用更强，增殖率可达52.78%（图3）。

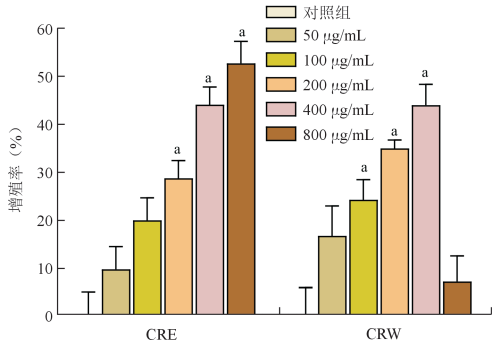


图3 CRE和CRW促NSCs增殖作用比较（$n = 4$）

Figure 3. Comparison of the proliferation-promoting effects of CRE and CRW on NSCs （$n = 4$）

注：与对照组相比，$^{a}P < 0.01$。

2.1.2 CRE各萃取部位活性比较

CRE经系统溶剂萃取法分为CRE-PE、CRE-EA、CRE-nBu和CRE-W 4个部位，各部位均具有促NSCs增殖活性（未展示数据表现抑制作用，下同），其中CRE-nBu在800 μg/mL时增殖率最高，达61.34%（图4）。

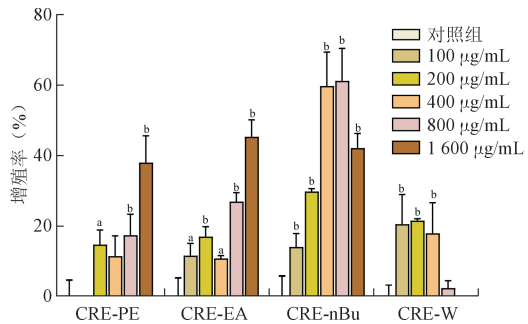


图4 CRE各萃取部位促NSCs增殖作用比较（$n = 4$）

Figure 4. Comparison of the proliferation-promoting effects of different solvent extraction fractions from CRE on NSCs （$n = 4$）

注：与对照组相比，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$。

2.1.3 大孔树脂柱各部位活性比较

CRE-nBu部位用大孔树脂色谱分离后，获得流分Fr.A1 ~ Fr.A5。其中Fr.A2（400 μg/mL）增殖率最高，为14.57%（图5）。

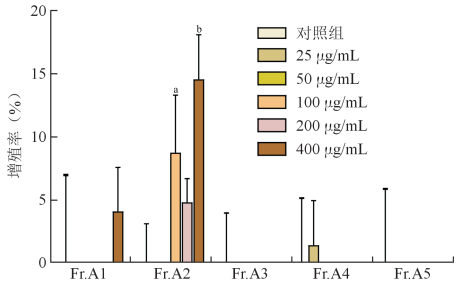


图5 CRE-nBu大孔树脂柱各流分促NSCs增殖作用比较（$n = 4$）

Figure 5. Comparison of the proliferation-promoting effects of fractions from CRE- nBu on NSCs by macroporous adsorption resin column chromatography （$n = 4$）

注：与对照组相比，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$。

2.1.4 硅胶柱各部位活性比较

Fr.A2经硅胶柱色谱分离，获得流分Fr.B1 ~ Fr.B7。其中Fr.B4（100 μg/mL）增殖率最高，为26.96%（图6）。

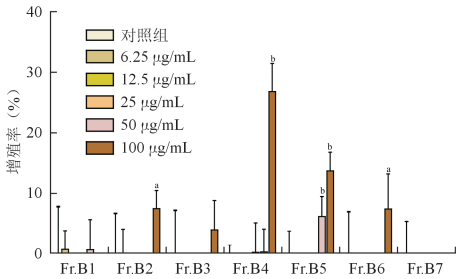


图6 Fr.A2硅胶柱各洗脱部位促NSCs增殖作用比较（$n = 4$）

Figure 6. Comparison of the proliferation-promoting effects of eluates from Fr.A2 on NSCs by silica gel column chromatography （$n = 4$）

注：与对照组相比，$^{a}P < 0.05$，$^{b}P < 0.01$。

2.1.5 制备液相各流份活性比较

Fr.B4经制备液相分离获得流份Fr.C1 ~ Fr.C7。各流分均存在促进NSCs增殖的活性成分，其中Fr.C3（400 μg/mL）中的活性组分促进NSCs增殖活性最强，增殖率为48.52%（图7）。

2.2 活性成分结构鉴定结果及对NSCs增殖的促进作用

2.2.1 结构鉴定结果

（1）化合物1

浅黄色无定形粉末，UV_{365}下呈现亮蓝色荧光，

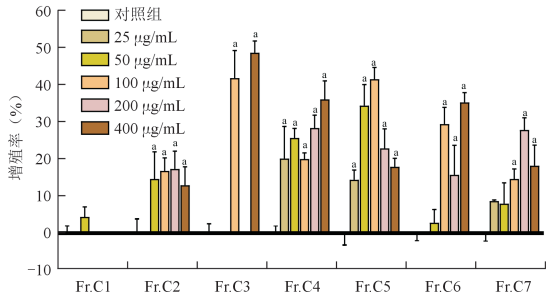


图7 Fr.B4各流份促NSCs增殖作用比较（n = 4）

Figure 7. Comparison of the proliferation-promoting effects of fractions from Fr.B4 on NSCs （n = 4）

注：与对照组相比，$^{a}P < 0.01$。

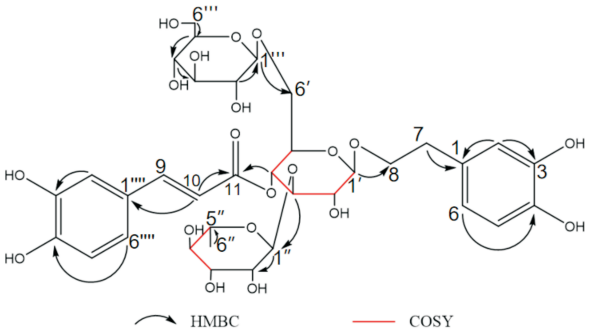


图8 化合物1结构及关键HMBC、COSY相关

Figure 8. Structure of compound 1 and its key HMBC and COSY correlations

易溶于甲醇。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d6）提示，2个反式烯烃质子信号δ_H：7.47（1H，brd，J = 15.72 Hz）、6.21（1H，brd，J = 15.78 Hz），1组鼠李糖质子信号δ_H：0.95（3H，d，J = 6.14 Hz），2组芳香族质子信号δ_H：7.02（1H，d，J = 2.27 Hz）、6.98（1H，dd，J = 8.27、2.18 Hz）、6.63（1H，d，J = 8.28 Hz）、6.75（1H，d，J = 8.17 Hz）、6.51（1H，dd，J = 8.04、2.31 Hz）、6.63（1H，s），2个亚甲基质子信号δ_H：3.67（2H，m）、2.69（2H，m），3个糖端基质子信号δ_H：5.02（1H，d，J = 1.8 Hz）、4.37（1H，d，J = 7.81 Hz）、4.16（1H，d，J = 7.81 Hz）；^{13}C-NMR（150 MHz，DMSO-d6）提示，1组双键碳信号δ_C：145.60、113.30，1个羰基碳信号δ_C：166.08，1个鼠李糖甲基碳信号δ_C：18.18，6个芳香族季碳信号δ_C：129.20、145.60、143.52、125.43、144.95、148.65，6个芳香族叔碳信号δ_C：116.36、115.77、119.56、114.74、115.70、121.55，2个仲碳信号δ_C：70.17、35.00，3个糖端基质子信号δ_C：103.35、102.16、101.28。上述^{1}H-NMR和^{13}C-NMR数据与文献报道的松果菊苷[20]基本一致，并结合异核多量子相干谱（heteronuclear multiple quantum coherence，HMQC）及HMBC，鉴定化合物1为松果菊苷（图8）。

（2）化合物2

白色无定形粉末，UV_{365}下呈现亮蓝色荧光，易溶于甲醇。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d6）提示，2个反式烯烃质子信号δ_H：7.47（1H，brd，J = 15.71Hz）、6.21（1H，brd，J = 15.89Hz），1组鼠李糖质子信号δ_H：0.95（3H，d，J = 6.18Hz），2组芳香族质子信号δ_H：7.03（1H，d，J = 2.18Hz）、6.98（1H，dd，J = 8.27、2.09Hz）、6.76（1H，d，J = 8.17 Hz）、6.84（1H，d，J = 2.00 Hz）、6.67（1H，d，J = 7.99Hz）、6.65（1H，dd，J = 8.08、1.91 Hz），2个亚甲基质子信号δ_H：3.67（2H，s，J = 7.61 Hz）、2.77（2H，t，J = 7.49 Hz），3个糖端基质子信号δ_H：5.03（1H，s）、4.38（1H，d，J = 7.90 Hz）、4.17（1H，dJ = 7.81 Hz）；^{13}C-NMR（600 MHz，DMSO-d6）提示，1组双键碳信号δ_C：145.70、113.22，1个羰基碳信号δ_C：166.21，1个鼠李糖甲基碳信号δ_C：18.32，6个芳香族季碳信号δ_C：129.45、147.50、144.88、125.62、145.70、148.69，6个芳香族叔碳信号δ_C：113.22、115.42、121.15、114.91、115.91、121.67，2个仲碳信号δ_C：70.50、35.27，3个糖端基质子信号δ_C：103.51、102.27、101.41。上述^{1}H-NMR和^{13}C-NMR数据与文献报道的肉苁蓉苷A[21]基本一致，并结合HMQC及HMBC，鉴定化合物2为肉苁蓉苷A（图9）。

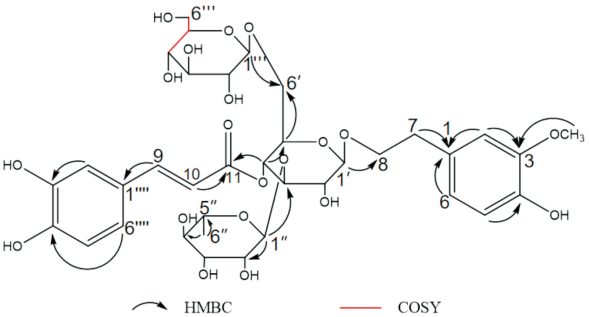


图9 化合物2结构及关键HMBC、COSY相关

Figure 9. Structure of compound 2 and its key HMBC and COSY correlations

（3）化合物3

棕色无定形粉末，UV_{365}下呈现亮蓝色荧光，易溶于甲醇。^{1}H-NMR（600 MHz，DMSO-d6）提示，2个反式烯烃质子信号δ_H：7.46（1H，brd，

J = 15.78Hz）、6.20（1H，brd，J = 15.90 Hz），1组鼠李糖质子信号δ_H：0.96（3H，t，J = 6.06 Hz），2组芳香族质子信号δ_H：7.03（1H，d，J = 2.18 Hz）、6.98（1H，dd，J = 8.31、2.13 Hz）、6.76（1H，d，J = 8.17 Hz）、6.63（1H，d，J = 7.98 Hz）、6.63（1H，d，J = 2.10Hz）、6.50（1H，dd，J = 7.99、2.18 Hz），2个亚甲基质子信号δ_H：3.67（2H，m）、2.78（2H，t，J = 7.49 Hz），2个糖端基质子信号δ_H：5.03（1H，d，J = 1.68 Hz）、4.36（1H，d，J = 7.88 Hz）；^{13}C-NMR（600 MHz，DMSO-d6）提示，1组双键碳信号δ_C：145.56、113.55，1个羰基碳信号δ_C：165.69，1个鼠李糖甲基碳信号δ_C：18.11，6个芳香族季碳信号δ_C：129.07、147.35、144.99、125.50、147.35、145.56，6个芳香族叔碳信号δ_C：115.76、115.28、119.53、114.71、115.45、121.19，2个仲碳信号δ_C：70.44、35.00，2个糖端基质子信号δ_C：102.27、101.42。上述^{1}H-NMR和^{13}C-NMR数据与文献报道的肉苁蓉苷C[22]基本一致，并结合HMQC及HMBC，鉴定化合物3为肉苁蓉苷C（图10）。

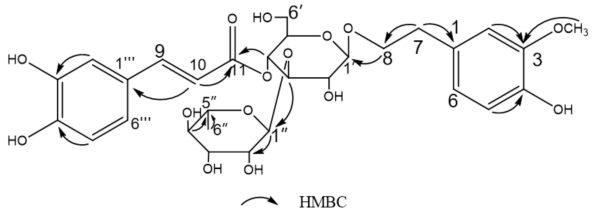


图10 化合物3结构及关键HMBC相关

Figure 10. Structure of compound 3 and its key HMBC correlations

2.2.2 活性成分对NSCs增殖的促进作用

Fr.C3、Fr.C4、Fr.C5经重结晶处理分别获得3个化合物，结构鉴定为松果菊苷、肉苁蓉苷A、肉苁蓉苷C。

活性研究结果（图11）显示，与对照组相比，三者促增殖率均有提高，松果菊苷浓度0.075 0 μmol/mL时增殖率为48.58%，与对照组相比差异极显著（$P < 0.05$），肉苁蓉苷A浓度0.600 0 μmol/mL时增殖率为37.06%，与对照组相比差异极显著（$P < 0.05$），肉苁蓉苷C浓度0.300 0 μmol/mL时增殖率为19.98%，与对照组相比差异显著（$P < 0.05$）。

比较研究发现，3个化合物取代基的变化对活性有影响：结构中心位置的葡萄糖C6′位连接

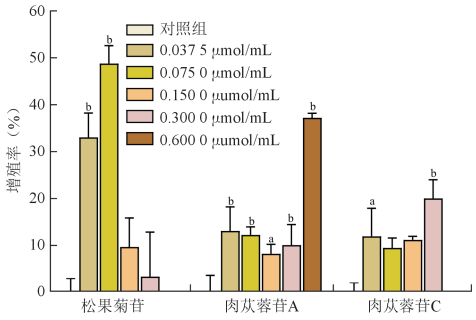


图11 松果菊苷、肉苁蓉苷A、肉苁蓉苷C促NSCs增殖作用比较（$n = 4$）

Figure 11. Comparison of the proliferation-promoting effects of echinacoside, cistanoside A, and cistanoside C on NSCs ($n = 4$)

注：与对照组相比，$^aP < 0.05$，$^bP < 0.01$。

葡萄糖基时活性增强；苯乙醇C3上取代基为-OH比-OCH_3活性更强。相应规律的进一步总结，还需更多类似结构的平行比较研究才能逐步阐明。

3 讨论

肉苁蓉化学成分复杂，苯乙醇苷类、环烯醚苷类、木脂素类和多糖类等成分共存，若仅按传统植化方法分离，容易丢失微量活性成分或忽视成分间的协同作用。本研究以促NSCs增殖活性为指标，采用“提取-萃取-柱色谱-制备液相-结构鉴定-单体活性验证”的活性追踪策略，使分离过程始终围绕药效活性展开，提高了活性成分发现的定向性。该策略的优势在于：其一，可在早期阶段快速锁定有效部位，避免对无活性部位的无效分离；其二，活性指标贯穿分离全程，有助于发现含量较低但活性较强的微量成分；其三，逐级追踪可观察不同极性部位活性变化，为后续构效关系分析提供线索。

本研究采用活性追踪法从肉苁蓉中分离鉴定了松果菊苷、肉苁蓉苷A和肉苁蓉苷C 3个促NSCs增殖的苯乙醇苷类活性成分，其中后两者为首次报道具有该活性。从中医理论角度看，肉苁蓉“补肾阳、益精血”，《神农本草经》[11]将其列为上品；中医认为“肾生精，精生髓，髓藏于脑”，脑髓的充盈依赖肾精的不断充养。本研究结果提示，肉苁蓉中松果菊苷、肉苁蓉苷A和肉苁蓉苷C促进NSCs增殖，可能是其“补肾益精、充养脑髓”功效的细胞生物学表现之一，为该传统功效的现代阐释提供了实验支撑。在应用层

面，3个活性成分可作为肉苁蓉神经保护相关活性的质量标志物候选成分，其中肉苁蓉苷A和肉苁蓉苷C因具有促NSCs增殖活性，也可作为神经退行性疾病药物研发的先导化合物。后续研究应进一步开展体内活性验证及作用机制探讨，并扩大构效关系研究范围，为苯乙醇苷类化合物的结构优化与应用奠定基础。

本研究仅观察了化合物对NSCs增殖的影响，未深入探讨其作用机制，本研究分离的3个苯乙醇苷类成分的促NSCs增殖作用可能涉及Wnt/β-catenin和/或PI3K/Akt通路的参与[23-25]，但该推测尚需通过蛋白印迹法检测通路关键蛋白、使用通路特异性抑制剂干预，以及转录组学分析等方法加以验证。此外，构效关系的分析基于3个化合物，样本量较小，后续研究可引入更多苯乙醇苷类结构类似物进行比较，以明确关键活性基团。

参考文献

1 余月明, 马援. 自由基衰老学说、肾虚与衰老及补肾抗衰老研究[J]. 陕西中医, 1993(4): 45-46. [Yu MY, Ma Y. The free radical theory of aging, kidney deficiency and aging, and studies on anti-aging by tonifying the kidney[J]. Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine, 1993(4): 45-46.] http://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-SXZY199304040.htm.

2 Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing[J]. Nature, 2000, 408(6809): 239-247. DOI: 10.1038/35041687.

3 Stefanatos R, Sanz A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain[J]. FEBS Lett, 2018, 592(5): 743-758. DOI: 10.1002/1873-3468.12902.

4 Inukai S, de Lencastre A, Turner M, et al. Novel microRNAs differentially expressed during aging in the mouse brain[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40028. DOI: 10.1371/journal.pone.0040028.

5 吴金凤. 大鼠脑老化microRNA组学研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2014. https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10542-1017231969.htm.

6 Fu X, He Q, Tao Y, et al. Recent advances in tissue stem cells[J]. Sci China Life Sci, 2021, 64(12): 1998-2029. DOI: 10.1007/s11427-021-2007-8.

7 Apple DM, Solano-Fonseca R, Kokovay E. Neurogenesis in the aging brain[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 141: 77-85. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.06.116.

8 Smith LK, White CW, Villeda SA. The systemic environment: at the interface of aging and adult neurogenesis[J]. Cell Tissue Res, 2018, 371(1): 105-113. DOI: 10.1007/s00441-017-2715-8.

9 刘芳, 周胜强, 林秀慧, 等. 国医大师刘祖贻从“脑髓阳生阴长”论治脑损伤后神经功能缺损[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(2): 2-5,1. [Liu F, Zhou SQ, Lin XH, et al. LIU Zuyi's treatment for neurologic impairment following brain injury from mutual promotion between yin and yang in brain marrow[J]. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 52(2): 2-5,1.] DOI: 10.16305/j.1007-1334.2018.02.001.

10 王平. 脑衰老与老年痴呆的中医病机探析[J]. 湖北中医杂志, 2002(9): 3-4. [Wang P. An analysis of the traditional Chinese medicine pathogenesis of brain aging and Alzheimer's disease[J]. Hubei Journal of Traditional Chinese Medicine, 2002(9): 3-4.] DOI: 10.3969/j.issn.1000-0704.2002.09.001.

11 清·黄爽, 辑. 神农本草经[M]. 北京: 中医古籍出版社, 1982: 73.

12 中国药典2025年版. 一部[S]. 2025: 144-145.

13 陈飞, 陈卓, 邢雪飞, 等. 肉苁蓉的研究进展[J]. 药物评价研究, 2013, 36(6): 469-475. [Chen F, Chen Z, Xing XF, et al. Research process in Cistanche Herba[J]. Drug Evaluation Research, 2013, 36(6): 469-475.] DOI: 10.3969/j.issn.1006-6810.2013.03.020.

14 Liu J, Wang Y, Li Q, et al. Phenylethanoid glycosides derived from *Cistanche deserticola* promote neurological functions and the proliferation of neural stem cells for improving ischemic stroke[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 167: 115507. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115507.

15 李媛, 宋媛媛, 褚春明, 等. 松果菊苷延缓衰老作用机制研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(14): 1077-1080. [Li Y, Song YY, Zhu CM, et al. Study on the anti-aging effect of echinacoside[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2011, 46(14): 1077-1080.] https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-ZGYX201114012.htm.

16 Gao L, Peng X M, Huo S X, et al. Memory enhancement of acteoside (verbascoside) in a senescent mice model induced by a combination of D-gal and AlCl3[J]. Phytother Res, 2015, 29(8): 1131-1136. DOI: 10.1002/ptr.5357.

17 刘心朗, 周丽丽, 杨占君, 等. 肉苁蓉总苷对SAMP8小鼠学习记忆能力及突触可塑性的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 110-115,276-277. [Liu XL, Zhou LL, Yang ZJ, et al. Effects of glycosides of cistanche on cognitive function and synaptic plasticity in SAMP8 mice[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2022, 40(1): 110-115,276-277.] DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2022.01.027.

18 张建平, 司银楚, 朱培纯. 三七总皂苷对体外培养的大鼠海马神经干细胞增殖分化的作用[J]. 解剖学报, 2010, 41(3): 362-366. [Zhang JP, Si YC, Zhu PC. Effects of panax notoginseng saponins on proliferation and differentiation of cultured hippocampal neural stem cells *in vitro*[J]. Acta Anatomica Sinica, 2010, 41(3): 362-366.] DOI: 10.3969/j.issn.0529-1356.2010.03.007.

19 高歌, 杨芊芊, 王瀚泽, 等. 熟地黄促神经干细胞增殖的有效部位筛选[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2834-2838. [Gao G, Yang QQ, Wang HZ, et al. Screening of effective parts of Radix Rehmanniae Preparata for promoting neural stem cell proliferation[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2020, 35(6): 2834-2838.] https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/zgyyxb202006034.

20 雷厉, 宋志宏, 屠鹏飞, 等. 反相高效液相色谱法制备松果菊

苷标准品[J]. 色谱, 2001, 19(3): 200-202. [Lei L, Song ZH, Tu PF, et al. Separation of echinacoside by reversed-phase preparative high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2001, 19(3): 200-202.] DOI: 10.3321/j.issn:1000-8713.2001.03.003.

21 王金芳. 肉苁蓉不同部位苯乙醇苷类成分的定性定量研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014. DOI: 10.7666/d.Y2629272.

22 王力伟. 肉苁蓉成分的分离鉴定、定量分析及生物活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2016. DOI: 10.7666/d.Y3027634.

23 郑利强, 江琼, 伍亚民, 等. APS通过PI3K/AKT信号通路促进神经干细胞增殖[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(10): 1359-1363. [Zheng LQ, Jiang Q, Wu YM, et al. Astragalus polysaccharide (APS) promotes proliferation of neural stem cells (NSCs) through PI3K/AKT signaling pathway[J]. Basic & Clinical Medicine, 2016, 36(10): 1359-1363.] https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTotal-JCYL201610007.htm.

24 吴琨鹏. 六味地黄汤对衰老模型小鼠认知功能及bFGF/Notch信号的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016. https://cdmd.cnki.com.cn/Article/CDMD-10541-1016127073.htm.

25 朱将虎. 经典Wnt/β-catenin信号通路在神经干细胞增殖和分化中的作用[J]. 重庆医学, 2016, 45(34): 4858-4860. [Zhu JH. Role of canonical Wnt/β-catenin signaling pathway in neural stem cell proliferation and differentiation[J]. Chongqing Medicine, 2016, 45(34): 4858-4860.] DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2016.34.034.

收稿日期：2026年05月17日 修回日期：2026年09月15日
本文编辑：钟巧妮 冼静怡