

文章编号:1001-6880(2016)12-2000-06

处理后白花丹参药材中丹酚酸 A 超声波提取工艺及抗炎活性研究

张 愉,刘海梅,夏宏蕊,孙隆儒*

山东大学药学院,济南 250012

摘要:研究了处理后白花丹参药材中丹酚酸 A 的超声波提取最佳工艺条件。采用超声波提取方法,以 HPLC 测定药材中丹酚酸 A 的提取率为指标,通过单因素实验考察乙醇浓度对丹酚酸 A 提取率的影响,在此基础上,通过 $L_9(3^4)$ 正交实验考察料液比、提取时间、提取温度、提取次数对丹酚酸 A 提取率的影响。结果表明最佳提取工艺条件:以料液比为 1:12 的 75% 乙醇在 30 ℃ 条件下超声波提取 40 min,共提取 3 次。在此条件下测得处理白花丹参药材中丹酚酸 A 的平均含量为 17.1810 mg/g。该方法稳定性和重复性好,为丹酚酸 A 的工业化生产提供了参考。采用 THP-1 巨噬细胞对得到的丹酚酸 A 提取物进行了抗炎活性评价,结果显示该提取物具有较好的抗炎活性。

关键词:处理后白花丹参药材;丹酚酸 A;提取工艺;正交实验;单因素实验;抗炎活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.12.026

Ultrasonic Extraction and Anti-inflammation Activity of Salvianolic Acid A from the Treated Roots of *Salvia miltiorrhiza* var. *Alba*

ZHANG Yu, LIU Hai-mei, XIA Hong-rui, SUN Long-ru*

School of Pharmaceutical Science, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: In this study, the ultrasonic extraction technology of salvianolic acid A (SalA) from the treated roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge var. *alba* Wu and Li, mss. was optimized, and the content of SalA, as the marker component for the process, was measured by HPLC. The effect of ethanol concentration on the extraction efficiency of SalA from the treated materials was studied by single factor experiment. Then, the effects of solid-liquid ratio, extraction duration, temperature, and times of extraction on the extraction efficiency of SalA were investigated using $L_9(3^4)$ orthogonal experiment. The optimal extraction conditions were as follows: the materials were extracted under ultrasonication in 75% ethanol at 30 ℃ for 3 times, with solid-liquid ratio 1:12 and each time for 40 minutes. The extraction process was validated to be stable and repeatable, and it provided a method for the industrial extraction of SalA from the treated materials. In addition, the extracts of SalA were evaluated for the anti-inflammation activity with THP-1 cells and the results showed that they had moderate anti-inflammatory activity.

Key words: treated rhizome of *Salvia miltiorrhiza* Bunge var. *alba* Wu and Li, mss.; salvianolic acid A; extraction process; orthogonal experiment; single-factor test; anti-inflammatory activity

丹酚酸 A 和丹酚酸 B 是丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 和白花丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge var. *alba* Wu and Li, mss.) 根和根茎中两个重要的酚酸类有效成分。其中,以丹酚酸 B 为主要有效成分的注射用丹参多酚酸盐已用于临床治疗冠心病心绞痛等。丹酚酸 A 具有治疗心肌梗死^[1]、抗

心肌细胞缺血再灌注损伤^[2]、抗动脉粥样硬化^[3]、抗血小板聚集和抗血栓形成^[4]等作用。丹酚酸 A (10 μM) 的体外抗氧化活性与丹酚酸 B (200 μM) 的活性相当, 10 mg/kg 丹酚酸 A 对大鼠体内抗肝纤维化作用与 50 mg/kg 丹酚酸 B 的作用相当^[5]。2.5 mg/kg 丹酚酸 A 对大鼠心肌缺血的改善作用与 10 mg/kg 丹酚酸 B 的改善作用相当^[6], 表明丹酚酸 A 抗肝纤维化作用、对心血管疾病的治疗作用均强于丹酚酸 B 的, 具有良好的新药开发和应用前景。

但是,丹参^[7]和白花丹参^[8]原药材中丹酚酸 A

收稿日期:2015-11-04 接受日期:2016-09-21

基金项目:国家自然科学基金(81274031);山东省科技发展计划
(2014GSF119026)

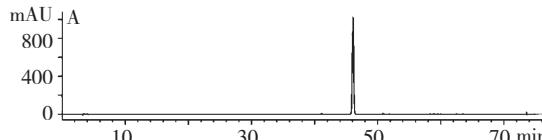
* 通讯作者 Tel:86-531-88382012; E-mail:sunlr@sdu.edu.cn

的含量非常低,而丹酚酸 B 的含量却很高。有研究报道,丹酚酸 B 在水溶液中在高温高压条件下可转化为丹酚酸 A^[9,10],但丹酚酸 B^[11]、丹酚酸 A^[12]在水溶液中稳定性比较差,影响丹酚酸 A 的转化收率。由此,本课题组前期工作中研究了丹酚酸 B 在植物组织中转化为丹酚酸 A 的工艺,改善了丹酚酸 A、B 的不稳定性对丹酚酸 A 转化收率的影响,并获得了丹酚酸 A 高含量的白花丹参药材^[8]。本文主要对从该处理后的白花丹参药材中丹酚酸 A 的提取工艺进行研究,确定其最佳提取工艺条件;并对丹酚酸 A 提取物进行了抗炎活性评价,为其进一步开发提供了理论依据。

1 仪器与材料

HPLC:安捷伦 1260;超声仪:KO-250B,昆山市超声仪器有限公司;pH 计:梅特勒 FE20K, FiveEasy pH 主机, LE438 电极;粉碎机:GF-150, 中南制药机械厂;高温高压灭菌锅:LDZX-50KB, 上海申安;冻干机:ALPHA1-4 LSC, 德国 Christ;电子天平:梅特勒托利多;单人超净工作台:美国 Thermo 公司, Model 1384;二氧化碳细胞恒温培养箱:美国 Thermo 公司, Model 3111;低速常温离心机:德国 Eppendorf 公司, centrifuge 5415R;细胞培养板:NEST 公司;酶标仪:美国 Bio-Rad 公司, Model 680。

实验所用药材白花丹参根和根茎采自于山东省章丘市;去离子水:Milli-Q 超纯水净化系统;甲醇、乙腈(色谱纯);磷酸:德国默克;95% 乙醇。阿司匹林(aspirin):山东新华制药股份有限公司;二甲基亚砜:索莱宝公司;人髓系白血病细胞系 THP-1 细胞株:山东大学免疫药理研究室细胞库;PRMI 1640 完全培养基:HyClone 公司, SH40007-13;胎牛血清:Gibco 公司, 16000-044;脂多糖(LPS):Sigma, L2880-10MG;佛波酯(PMA):Sigma, FXP012;人 IL-8 定量分析酶联免疫检测试剂盒:安徽巧伊生物科技有限公司;人 IL-1 β 定量分析酶联免疫检测试剂盒:安徽巧伊生物科技有限公司。



2 方法与结果

2.1 药材的处理

分别精密称取 9 份白花丹参药材粉末各 10 g,采用本课题组报道处理方法^[8],用 20 mL pH = 1 的盐酸水溶液浸湿均匀,置于高温高压灭菌器内,在 120 ℃下加热 6 h,取出,低温放置,作为提取丹酚酸 A 的原料药,用于提取工艺考察。

2.2 丹酚酸 A 的测定方法

2.2.1 色谱条件

采用高效液相色谱法(HPLC)测定丹酚酸 A 的含量。色谱柱:Agilent TC-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm);流速:1.00 mL/min;检测波长:286 nm;柱温:25 ℃;流动相 A:0.05% 的磷酸水溶液;流动相 B:乙腈;梯度洗脱条件:0~15 min, 90%~80% A;15~35 min, 80%~75% A;35~45 min, 75%~70% A;45~55 min, 70%~10% A;55~70 min, 10% A。

2.2.2 标准品溶液制备

精密称取丹酚酸 A 对照品 5.13 mg 于 10 mL 容量瓶中,用 75% 的乙醇水溶液定容至刻度,摇匀,经 0.22 μm 滤膜过滤,得对照品溶液。

2.2.3 标准曲线建立

分别精密吸取丹酚酸 A 对照品溶液 2、4、6、8、10、14 μL 注入高效液相色谱仪,按照“2.2.1”项下的色谱条件进行测定(如图 1 A),丹酚酸 A 的保留时间约为 46 min。以丹酚酸 A 的峰面积积分值(Y)对进样量(X)进行线性回归,得回归方程 $y = 1009.7x - 15.931, R^2 = 0.9999$ 。结果表明丹酚酸 A 在 1.026~7.182 μg 范围内具有良好的线性关系。

2.2.4 供试品溶液制备

按照 L_o(3⁴) 正交实验设计的条件(表 2)对“2.1”项下的药材进行超声波提取,将提取液过滤合并为同一批次的滤液,用 75% 乙醇水溶液定容至一定的体积,摇匀,并取出适量滤液,经 0.22 μm 滤膜过滤,供 HPLC 测定,如图 1B 所示。

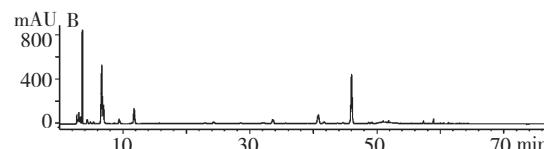


图 1 丹酚酸 A 标准品(A)及丹酚酸 A 提取物(B)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of salvianolic acid A standard (A) and extract of *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* (B)

2.2.5 精密度实验

精密吸取丹酚酸 A 对照品溶液 10 μL , 注入高效液相色谱仪, 连续进样 6 次, 记录峰面积积分值, 计算 RSD = 0.56%, 表明该仪器具有良好精密度。

2.2.6 稳定性实验

精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0、8、12、16、24、48 h 进样 10 μL , 记录峰面积积分值, 计算 RSD = 2.05%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.7 重复性实验

按照“2.2.4”项下供试品溶液的制备方法, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别精密吸取 10 μL 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积积分值, 计算 RSD = 3.03%, 表明该方法具有良好的重复性。

2.2.8 加样回收率实验

根据丹酚酸 A 在处理过的白花丹参药材中的含量, 分别精密称取适量的白花丹参粉末各 9 份, 按照“2.1”项的方法进行处理, 加入各自含量的 80%、100%、120% 的对照品, 对照品的加入量分别重复三次。按照供试品溶液的制备方法制备供试品溶液, 并测定供试品溶液中丹酚酸 A 的含量, 计算得平均回收率为 100.28%, RSD = 2.01%。

2.3 丹酚酸 A 提取工艺的研究

2.3.1 单因素实验

乙醇浓度对处理过的丹参中丹酚酸 A 提取率的影响: 称取 12 份干药材, 每份 0.5g, 按照“2.1”项的方法处理后, 分别以 20%、30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 的乙醇溶液 20 mL 在 50 °C 下超声波提取 1 h, 所得提取

液过滤, 分别用各自浓度的乙醇溶液定容至一定的体积, 摆匀, 并取出适量滤液, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 分别进样 10 μL , 记录各自的峰面积, 以乙醇浓度为 X 轴, 丹酚酸 A 的峰面积值为 Y 轴作曲线, 如图 2 所示。

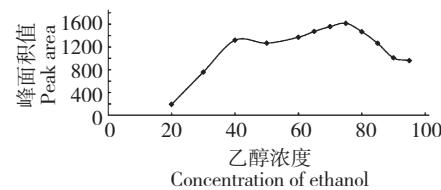


图 2 乙醇浓度对丹酚酸 A 峰面积的影响

Fig. 2 Effects of ethanol concentration on peak area of salvianolic acid A

由图 2 可知, 丹酚酸 A 的峰面积值随乙醇浓度的增加呈现先增大后减小的趋势, 当乙醇浓度达到 75% 时峰面积值达到最大, 之后随着乙醇浓度的增大, 丹酚酸 A 的峰面积值反而下降, 这可能是由于药材中的丹酚酸 A 主要是以其镁盐形式存在的原因。此外, 以 75% 乙醇提取时, 不利于药材中多糖的溶出^[13], 使提取物中多糖等水溶性大分子的含量较低, 有利于丹酚酸 A 的下一步纯化。因此, 选取 75% 乙醇为丹酚酸 A 的提取溶剂。

2.3.2 正交实验

采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计方法(表 2), 以每克干药材中丹酚酸 A 的提取量为指标, 考察料液比、提取时间、提取次数和提取温度四个关键因素及其三个水平(表 1)对丹酚酸 A 提取率的影响。

表 1 正交实验因素水平表

Table 1 Factor and level for orthogonal design

水平 Level	因素 Factors			
	(A) 料液比 Solid-liquid ratio	(B) 提取时间 Extraction duration (min)	(C) 提取次数 Times of extraction	(D) 提取温度(°C) Extraction temperature
1	8	30	2	30
2	10	40	3	50
3	12	50	4	70

结果如表 2 所示, 通过极差 R 直观分析可知, 各因素对丹酚酸 A 的提取率(每克干药材提取丹酚酸 A 的毫克数)影响的大小顺序为: 提取次数(C) > 料液比(A) > 提取时间(B) > 提取温度(D); 以 D 因素为误差项进行方差分析, 结果如表 3 所示, C 因

素具有比较大的影响, A 和 B 因素的影响不显著。综合各考察因素的影响, 并考虑在工业化生产中的实际情况, 确定其最佳提取工艺条件为 $A_3B_2C_2D_1$, 即加入药材重量 12 倍量的 75% 乙醇, 在 30 °C 条件下超声波提取 3 次, 每次提取 40 min。

表 2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal design

实验号 No.	A	B	C	D	丹酚酸 A 含量 Salvianolic acid A content (mg/g)
1	1	1	1	1	7.9102
2	1	2	2	2	14.4283
3	1	3	3	3	10.6639
4	2	1	2	3	14.4373
5	2	2	3	1	14.7256
6	2	3	1	2	8.1943
7	3	1	3	2	13.0683
8	3	2	1	3	12.4857
9	3	3	2	1	17.2808
K_1	33.0024	35.4158	28.5902	39.9166	
K_2	37.3572	41.6396	46.1464	35.6909	
K_3	42.8348	36.1390	38.4578	37.5869	
R	3.2775	2.0746	5.8521	1.4086	

表 3 方差分析表

Table 3 Results of variance analysis

方差来源 Sources of variation	偏差平方和 Sum of square of deviations	自由度 Degree of freedom	F 值 F value	P 值 P value
A	16.183	2	5.418	$P > 0.1$
B	7.724	2	2.586	$P > 0.1$
C	51.634	2	17.286	$0.05 < P < 0.1$
D(误差 Errors)	2.987	2		

$F_{0.05}(2,2) = 19.00; F_{0.1}(2,2) = 9.00$

2.3.3 工艺验证

精密称定三批白花丹参药材粉末,按方法“2.1”进行处理,然后按照正交实验得到的最佳工

艺条件进行实验性实验,结果如表 4 所示。由实验结果可知,该提取工艺方法稳定,重复性好。

表 4 实验性实验结果

Table 4 Results of validation test

序号 No.	药材粉末重量 Weight of material powder(g)	丹酚酸 A 含量 Salvianolic acid A content(mg/g)
1	10.0034	17.0003
2	10.0855	17.3803
3	10.0468	17.1597
平均值 Average value	10.0452	17.1810

2.4 白花丹参提取物的抗炎活性的研究

2.4.1 THP-1 细胞的培养与诱导

将冻存于液氮罐中的单核 THP-1 细胞株取出,

37 °C 迅速解冻,转移到细胞培养瓶中,加入含 10% (v/v) FBS 胎牛血清、双抗(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL) 的 PRMI 1640 完全培养基 5 mL,于 37

℃、5% CO₂ 孵箱中孵育 4 h 后更换新鲜培养基, 隔天换一次新鲜培养基, 直到细胞生长状态良好。实验所用的单核 THP-1 细胞均加入 40 ng/mL PMA 诱导 24 h, 使其成为成熟的巨噬细胞, 换上新鲜培养基培育, 用于后续实验。

2.4.2 ELISA 法检测 THP-1 细胞培养上清液中炎症因子 IL-8 和 IL-1 β

取对数生长的细胞以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于 24 孔板中, 待细胞长到 90%, 开始给药。实验分为空白组, 模型组 (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 阳性药组 (aspirin, 1 mg/mL), 给药组 (40、20、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每组 3 个复

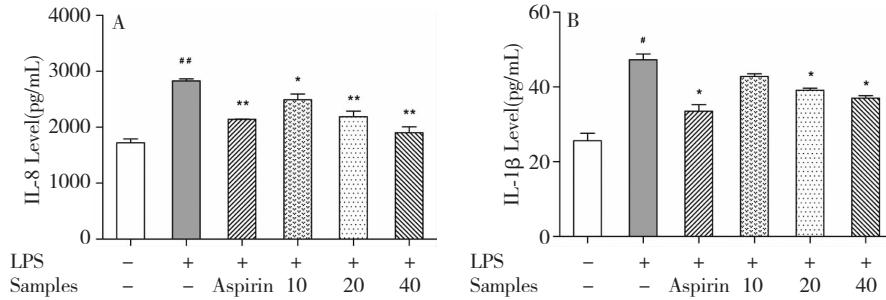


图 3 丹酚酸 A 提取物对 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症因子 IL-8 (A)、IL-1 β (B) 分泌的影响

Fig. 3 Inhibition of IL-8 (A), IL-1 β (B) production in LPS-activated THP-1 macrophages by Sal A extracts

注: 空白组, 模型组 (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 阳性药组 (aspirin, 1 mg/mL), 给药组 (10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $^{\#}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, 与空白组比较; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, 与模型组比较

Note: Control group, Model group (LPS, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Positive drug group (aspirin, 1 mg/mL), Administration group (10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $^{\#}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, Compared with control group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, Compared with model group

3 讨论与结论

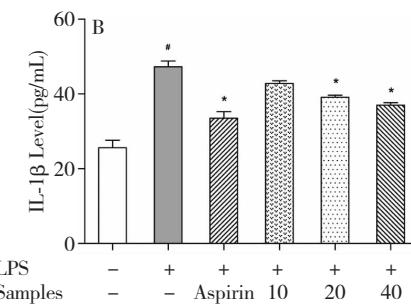
本研究用药材是白花丹参药材在高温、高压、高湿的条件下经一定时间处理所得, 在此条件下丹酚酸 B 在植物组织细胞中转化为丹酚酸 A, 由于该转化不是在水溶液中进行的, 在较大程度上避免了由于丹酚酸 B^[11]、A^[12]在热水溶液中不稳定所引起的收率影响。同样, 丹参或其它含有较大量丹酚酸 B 的药材也可以采用同法处理而获得丹酚酸 A 高含量的药材^[14]。这是获得大量丹酚酸 A 的一个重要途径, 该提取工艺研究可为其工业化生产提供参考。

正交实验结果方差分析(表 3), 各因素的 P 值均大于 0.05, 但 C 因素的 F 值为 17.286, 比较接近 19.0 ($P = 0.05$ 的界限值), 故 C 因素的影响比较大。结合正交实验结果中各因素 K 值的大小和实际生产成本核算分析, 确定其最佳提取工艺条件为 A₃B₂C₂D₁, 即用药材重 12 倍量的 75% 乙醇在 30 ℃ 条件超声波提取 40 min, 提取次数为 3 次。

孔。给药 1 h 后, 除了空白组其余各组分别加入 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 24 h, 收集上清待测。检测细胞上清中细胞炎症因子白介素 IL-8 及白介素 IL-1 β , 方法按试剂盒说明书进行。

2.4.3 实验结果

用 ELISA 法检测丹酚酸 A 提取物对 LPS 诱导的 THP-1 细胞炎症因子 IL-8 及 IL-1 β 的表达的影响。结果如图 3 所示, LPS 能够刺激 THP-1 细胞的 IL-8 及 IL-1 β 表达增多, 丹酚酸 A 提取物能够明显地抑制炎症因子 IL-8 及 IL-1 β 的过表达。



炎症是动脉粥样硬化^[15]、冠心病^[16]、心肌梗死^[17]等心血管疾病发生发展的一个重要病理反应。本文抗炎活性实验表明, 丹酚酸 A 提取物对 THP-1 巨噬细胞炎症因子 IL-8 和 IL-1 β 均有抑制作用, 且随提取物浓度的增加, 其抗炎活性增强, 说明该工艺条件下的丹酚酸 A 提取物有较好的抗炎活性。

参考文献

- Wang SB, Tian S, Yang F, et al. Cardioprotective effective of salvianolic acid A on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. *Eur J Pharmacol*, 2009, 615:125-132.
- Pan HJ, Li DY, Fang F, et al. Salvianolic acid A demonstrates cardioprotective effects in rats hearts and cardiomyocytes after ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 58:535-542.
- Zhang XC, Chen JQ, Li B, et al. Salvianolic acid A suppresses CCL-20 expression in TNF- α -treated macrophages and ApoE-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2014, 64:318-325.

- 4 Fan HY, Fu FH, Yang MY, et al. Antiplatelet and antithrombotic activities of salvianolic acid A. *Thromb Res*, 2010, 126(1):17-22.
- 5 Tsai MK, Lin YL, Huang YT. Effects of salvianolic acids on oxidative stress and hepatic fibrosis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 242:155-164.
- 6 Song YP (宋延平), Kong LS (孔令姗), Wu J (吴静), et al. Comparison of the effect of salvianolic acid A and B on acute myocardial ischemia of rats. *Chin J Inform Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2007, 14(9):36-38.
- 7 Wei PP (尉萍萍), Zhao L (赵粼). Determination of salvianolic acid A in radix *Salviae Miltiorrhizae* by HPLC. *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学). 2008, 25: 241-243.
- 8 Xia HR, Sun LR, Lou HX, et al. Conversion of salvianolic acid B into salvianolic acid A in tissues of Radix *Salviae Miltiorrhize* using high temperature, high pressure and high humidity. *Phytomedicine*. 2014, 21:906-911.
- 9 Wang Y (王颖), Zhu JB (朱靖博), Fu SP (付绍平), et al. Process of salvianolic acid A production from *Salvia miltiorrhiza* extract at high temperature and high pressure. *J Dalian Polytechnic Univ* (大连工业大学学报), 2011, 30: 412-415.
- 10 Wang Y (王颖), Zhu JB (朱靖博), Fu SP (付绍平), et al. Study on chemical changes of salvianolic acid B and lithospermic acid aqueous under conditions of high temperature and high pressure. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志). 2011, 36:434-438.
- 11 Li SS (李珊珊), Zhao ZW (赵紫伟), He R (何蕊), et al. Study on raw material of salvianolic acid B for the stability in powder and aqueous solution. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med* (云南中医学院学报), 2012, 35(4):44-46.
- 12 Xu JZ, Zeng SS, Chen XY, et al. Isolation and identification of degradation products of salvianolic acid A by NMR and LC-MS. *Fitoterapia*, 2011, 82:260-266.
- 13 He GY (何国勇), Zhang CP (张翠萍), Tong SQ (童胜强), et al. The establishment and study of polysaccharide model in the alcohol precipitation process of *Radix Salvia Miltiorrhiza*. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2009, 5(5):21-24.
- 14 Sun LR (孙隆儒), Xia HR (夏宏蕊), Liu SC (刘双成), et al. A kind of medicinal with high content of salvianolic acid A, preparation method and application (一种丹酚酸 A 高含量的药材、制备方法和用途). CN201210334295.7, 2012-11-28.
- 15 Chu XM (褚现明), Li B (李冰), An Y (安毅), et al. The progression of the relation between inflammation and atherosclerosis. *Mol Cardiol Chin* (中国分子心脏病学杂志), 2010, 11:184-188.
- 16 Lin KM (林开敏), Li WH (李卫华). The clinical significance of inflammatory factors in the incidence of coronary artery disease. *Adv Cardiovasc Dis* (心血管病学进展), 2007, 28(1):81-84.
- 17 Jiang S (姜舒), Rui YC (芮耀诚), Li TJ (李铁军). The mechanisms of inflammation and apoptosis in myocardial infarction. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2016, 34: 119-123.

(上接第 2016 页)

- 18 Eckert A, Hauptmann S, Scherping I, et al. Oligomeric and fibrillar species of β -amyloid ($A\beta42$) both impair mitochondrial function in P301L tau transgenic mice. *J Mol Med*, 2016, 86:1255-1267.
- 19 Ahmad A, Ali T, Park HY, et al. Neuroprotective effect of fisetin against amyloid-beta-induced cognitive/synaptic dysfunction, neuroinflammation, and neurodegeneration in adult mice. *Mol Neurobiol*, 2016;1-17.
- 20 Kuchibhotla KV, Lattarulo CR, Hyman BT, et al. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science*, 2009, 323:1211-1215.
- 21 Kamphuis W, Mamber C, Moeton M, et al. GFAP isoforms in adult mouse brain with a focus on neurogenic astrocytes and reactive astrogliosis in mouse models of Alzheimer disease. *PloS One*, 2012, 7:42823.
- 22 Amtul Z. Comorbid $A\beta$ toxicity and stroke: hippocampal atrophy, pathology, and cognitive deficit. *Neurobiol Aging*, 2014, 35:1605-1614.
- 23 Huang Y, Mucke L. Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Cell*, 2012, 148:1204-1222.
- 24 Yue LH (岳丽红), Cheng GD (程广东), Luo ZW (罗志文), et al. Tibetan spiritual mushroom yogurt on liver and kidney in artificial index of aging mice. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2014, 18:5165-5167.
- 25 Chen Z (陈真). Regulation of fisetin on immunological system of mice and its protective effects on autoimmune hepatitis model mice. Guangzhou: Ji'nan University (暨南大学), MSc. 2011.