

二氢杨梅素抑制斑马鱼尾静脉血栓形成的作用与机制

资石祥[†], 陈彩艳[†], 李文, 陈云志, 陈帅^{*}

贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025

摘要: 研究二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)抗斑马鱼尾静脉血栓的作用和机制。选取受精后3天的斑马鱼于6孔板中,随机分为空白对照组、模型组、DHM低、中、高剂量给药组(50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)、阿司匹林组(25 $\mu\text{g/mL}$)。用DHM或阿司匹林饲养斑马鱼6 h后,除空白对照组外,其余各组均给予30 $\mu\text{g/mL}$ 花生四烯酸1 h建立斑马鱼尾静脉血栓模型。通过对斑马鱼尾静脉及心脏红细胞染色评估DHM抗静脉血栓作用,活体荧光成像观察中性粒细胞活化与募集,RT-qPCR检测髓过氧化物酶(myeloperoxidase, *MPO*)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)及白细胞介素-6(interleukin-6, *IL-6*) mRNA表达,荧光探针法测定活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平,显微镜观察肠道出血情况评估安全性,分子对接验证与关键靶点的结合活性。结果显示,与模型组相比,DHM能显著减少斑马鱼尾静脉血栓形成($P < 0.01$),增加心脏红细胞染色面积($P < 0.01$),减少中性粒细胞荧光强度($P < 0.01$),抑制*MPO*($P < 0.001$)、*TNF- α* ($P < 0.001$)和*IL-6*($P < 0.01$) mRNA的表达,抑制ROS($P < 0.001$)的产生,且DHM组不会引起斑马鱼出血反应。分子对接结果显示DHM与*TNF- α* 、*IL-6*、*MPO*及ROS相关蛋白还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶2(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2, NOX2)均有较好的亲和力。以上结果表明,DHM可能通过抑制斑马鱼血栓形成过程中*TNF- α* /*IL-6*-ROS-*MPO*信号轴减少斑马鱼尾静脉血栓的形成,且不引起出血反应。

关键词: 静脉血栓栓塞症; 斑马鱼; 二氢杨梅素; 中性粒细胞胞外诱捕网; 髓过氧化物酶; 炎症反应

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)8-1679-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.8.006

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.8.006

Inhibitory effects and mechanisms of dihydromyricetin against caudal venous thrombosis in zebrafish

ZI Shi-xiang[†], CHEN Cai-yan[†], LI Wen, CHEN Yun-zhi, CHEN Shuai^{*}

School of Basic Medicine, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: This study aims to elucidate the effect and mechanism of dihydromyricetin (DHM) against venous thrombosis in zebrafish. Zebrafish at 3 days post-fertilization were randomly divided into six groups: a blank control, model, DHM low, medium, and high dose groups (50, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$), and an aspirin group (25 $\mu\text{g/mL}$). After six hours of treatment with DHM or aspirin, all groups except the blank control were exposed to 30 $\mu\text{g/mL}$ arachidonic acid for 1 hour to induce caudal vein thrombosis. The caudal vein and cardiac erythrocytes of zebrafish were stained to evaluate the antivenous thrombosis effect of dihydromyricetin (DHM), live fluorescence imaging was employed to observe neutrophil activation and recruitment, RT-qPCR was performed to determine the mRNA expression levels of myeloperoxidase (*MPO*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), and interleukin-6 (*IL-6*), reactive oxygen species (ROS) levels were measured using a fluorescent probe assay, intestinal hemorrhage was examined under a microscope to assess the safety of DHM, molecular docking was conducted to verify its binding activity with key targets. Results showed that compared to the model group, DHM significantly reduced thrombus formation in the caudal vein ($P < 0.01$), increased cardiac red blood cell staining area ($P < 0.01$), decreased neutrophil fluorescence intensity ($P < 0.01$), and suppressed mRNA expression of *MPO* ($P < 0.001$), *TNF- α* ($P < 0.001$), and *IL-6* ($P < 0.01$). DHM also markedly inhibited ROS generation ($P < 0.001$). DHM did not cause intestinal bleeding at any

收稿日期: 2025-05-28

接受日期: 2025-10-09

基金项目: 国家自然科学基金(82360860); 贵州省自然科学基金(黔科合基础-ZK[2023]一般405); 贵州省卫生健康委科学技术基金(gzwmkj2022-481); 国家级大学生创新创业训练计划(202310662135)

[†] 共同第一作者

^{*} 通信作者 Tel: 86-015185104495; E-mail: chenshuai2@gzy.edu.cn

tested concentrations. Molecular docking indicated that DHM exhibited favorable binding affinities with MPO, TNF- α , IL-6, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 (NOX2). These findings suggest that DHM may reduce caudal vein thrombosis in zebrafish by inhibiting the TNF- α /IL-6-ROS-MPO signaling axis, without inducing hemorrhagic effects.

Key words: venous thromboembolism; Zebrafish; Dihydropyricetin; neutrophil extracellular traps; myeloperoxidase; inflammation

静脉血栓栓塞症 (venous thromboembolism, VTE) 是继心肌梗死和中风之后第三大最常见的心血管疾病, 具有极高的致残率和死亡率^[1]。目前抗凝血药物是防治 VTE 的主要手段, 然而这些药物作用靶点单一且并不能完全防止 VTE 的发生和复发, 且由于常发生出血反应而导致治疗失败, 其临床应用仍面临显著挑战^[2]。近年来, 免疫炎症反应在静脉血栓形成中的作用备受关注, 这表明在不影响止血功能的情况下抑制静脉血栓的形成具有可能性。特别是免疫炎症反应触发的中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 是静脉血栓形成的关键性因素, 通过多种途径促进静脉血栓形成, 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 是评估 NETs 形成的一个重要指标^[3,4]。鉴于 NETs 在静脉血栓形成中的关键作用及其与炎症反应的密切关联, 兼具抗凝与抗炎活性的天然产物成为新的研究热点。斑马鱼对临床抗凝/抗血栓药物表现出良好的反应性, 现已被广泛应用于血栓相关的基础研究和药物开发领域^[5]。应用分子克隆等技术建立的转基因斑马鱼 MPO-EGFP (以 MPO 启动子驱动增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 在中性粒细胞中特异性表达), 可在活体情况下通过荧光显微镜对中性粒细胞进行观察^[6], 用于筛选能够抑制中性粒细胞活化的药物。

二氢杨梅素 (dihydropyricetin, DHM) 是我国中药藤茶 (*Ampelopsis grossedentata*) 的主要活性成分, 其抗炎、抗氧化及心血管保护作用已被广泛报道^[7,8]。据《中华本草》记载, “藤茶, 味甘、淡, 性凉, 具有清热解毒、利湿消肿、平肝降压、活血化瘀的功效”^[9]。DHM 具有良好的抗血栓潜力, 相关实验结果显示其能够延长凝血时间、抑制血小板聚集和血栓形成, 是藤茶抗血栓作用的主要有效成分^[10]。作者前期的研究发现, DHM 通过抑制血小板激活、保护血管内皮等多途径发挥抗动脉血栓作用, 且不增加出血风险^[7]。此外, DHM 能够显著降低二硝基苯基-IgE 复合物致敏的人肥大细胞株 KU812 中炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平,

提示其可能通过调控免疫炎症反应发挥抗静脉血栓作用^[11]。尽管已有研究初步揭示了 DHM 通过影响凝血过程和血小板聚集发挥抗血栓作用, 但其是否能够通过调控炎症免疫反应干预静脉血栓形成尚不明确。本研究在前期工作的基础上, 通过建立 MPO-EGFP 斑马鱼尾静脉血栓模型, 系统探讨了 DHM 通过调节炎症反应及 NETs 形成的抗静脉血栓作用及机制, 为 DHM 抗静脉血栓作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

MPO-EGFP 转基因品系斑马鱼由贵州中医药大学陈发老师赠送与鉴定。实验用斑马鱼为受精后 3 天 (3 days post fertilization, 3 dpf) 幼鱼, 饲养于 28 °C 的养鱼用水中 (水质: 每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐, 电导率 450 ~ 550 μ S/cm, pH 6.5 ~ 8.5, 硬度 50 ~ 100 mg/L CaCO₃), 溶解氧浓度维持 6.5 ~ 7.0 mg/L, 符合 3 dpf 斑马鱼幼鱼的生理需求。以昼夜 14 h:10 h 光照循环, 每日定时喂食^[12]。本实验通过贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会审查批准 (批准编号: 20250328002)。

1.1.2 试剂

DHM ((2R,3R)-构型, $[\alpha]_D^{20} = +15.5 \sim +17.0$ (c 0.9, 甲醇); 批号: D101549, 纯度 $\geq 98\%$)、阿司匹林 (批号: A104180, 纯度 $\geq 99\%$)、花生四烯酸 (批号: A111764, 纯度 $\geq 99\%$)、邻联茴香胺 (批号: O755476, 纯度 $\geq 99\%$)、辛伐他汀 (批号: S129538, 纯度 $\geq 99\%$) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); DMSO (纯度 $\geq 99\%$, 批号: D8418, 美国 Merck Sigma-Aldrich 公司); CM-H2DCFDA 荧光探针 (批号: C6827, 美国 Thermo Fisher 公司); iTaq™ Universal SYBR Green® Supermix (批号: 1725124, 美国 Bio-Rad 公司); FastKing cDNA 第一链合成试剂盒 (去基因组) (批号: KR116, 北京天根生化科技有限公司); Universal RNA Extraction TL Kit C (批号: TL643-03C, 佛山奥维生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器

ESEN-AW 斑马鱼养殖饲养系统 (北京爱生科

技发展有限公司);SZX 61 体视荧光显微镜(日本 Olympus 公司);SZX7 体式显微镜(日本 Olympus 公司);CP214 精密电子天平(上海奥豪斯国际贸易有限公司);SPARK 多功能酶标仪(上海帝肯贸易有限公司);JXFSTPRP-24L 全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司);Auto-Pure32A 全自动核酸提取仪(杭州奥盛仪器有限公司);T100 普通 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司);CFX Connect 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Heraeus Fresco 17 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司);NanoDrop 2000 紫外-可见光分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司);BE-6100 微孔板迷你离心机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 斑马鱼尾静脉血栓模型的建立及药物干预
随机选取 3 dpf MPO-EGFP 斑马鱼,在显微镜下挑选发育正常斑马鱼幼鱼于 6 孔板中,每孔均处理 30 尾斑马鱼^[13]。本研究 DHM 的给药剂量参考了课题组前期研究结果^[13],并结合已有天然产物在斑马鱼静脉血栓模型中使用的剂量^[14],设置 5 个浓度(12.5、25、50、100、200 μg/mL)进行预实验筛选。结果显示,50、100 和 200 μg/mL 对血栓形成具有显著抑制作用,故选取这 3 个浓度作为正式实验的低、中、高剂量。设置 6 个实验组:空白对照组(control, Con)、花生四烯酸模型组(model, Mod)、阿司匹林(acetylsalicylic acid, ASA)对照组、DHM 低剂量组(50 μg/mL)、DHM 中剂量组(100 μg/mL)、DHM 高剂量组(200 μg/mL)。Con 组:斑马鱼于含 0.1% DMSO 的鱼水中饲养;Mod 组:斑马鱼于含 30 μg/mL 花生四烯酸的鱼水中饲养 1 h;药物组:分别将斑马鱼于含低、中、高剂量 DHM 或 25 μg/mL 阿司匹林的鱼水中饲养 6 h,再加入花生四烯酸继续饲养 1 h。在以下斑马鱼实验中,各实验组均设置 3 次独立的生物学重复(平行实验)。

1.2.2 邻联茴香胺染色观察斑马鱼尾静脉血栓
按照“1.2.1”方法处理各实验组斑马鱼,用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 3 遍,加入新鲜配制的邻联茴香胺溶液(0.6 mg/mL)对静脉血栓的主要组成成分红细胞进行染色,避光孵育 15 min 后用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 洗涤 3 遍终止反应。每组随机挑选 10 尾斑马鱼,使用体式显微镜(40×)观察斑马鱼尾静脉血栓及心脏红细胞染色情况。用 Imagine-Pro

Plus 6.0 图像处理软件定量分析斑马鱼尾静脉及心脏红细胞染色面积,按公式(1)计算血栓形成率(R_F)^[15],按公式(2)计算血栓抑制率(R_I)^[16]。

$$R_F = \frac{S_m - S_c}{S_m} \tag{1}$$

$$R_I = \frac{S_m - S_d}{S_m} \tag{2}$$

式中, S_m 、 S_c 、 S_d 分别表示模型组、空白对照组、药物组尾静脉红细胞平均染色面积。

1.2.3 荧光显微镜观察中性粒细胞

用含 0.05% 三卡因的 1% 甲基纤维素钠养鱼水将各实验组斑马鱼固定,每组随机挑选 10 尾斑马鱼,在体式荧光显微镜(40×)下观察绿色荧光标记的中性粒细胞,用 Imagine-Pro Plus 6.0 图像处理软件定量分析斑马鱼荧光强度。

1.2.4 RT-qPCR 检测 MPO 及炎症因子表达
使用 Universal RNA Extraction TL Kit C 提取各实验组斑马鱼总 RNA,利用紫外-可见光分光光度计对总 RNA 浓度和纯度进行测定。取 2.00 μg 斑马鱼样品总 RNA,按照 cDNA 第一链合成试剂盒说明操作,合成 20.0 μL cDNA,通过 RT-qPCR 检测 β -actin、MPO、TNF- α 和 IL-6 基因的表达。反应条件为:预变性 95℃ 2 min;变性 95℃ 5 s,退火/延伸 60℃ 30 s,共 39 个循环,熔解曲线从 65℃ 升温至 95℃,温度每 5 s 增加 0.5℃。用 β -actin 作为基因表达的内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 MPO、TNF- α 和 IL-6 基因的 mRNA 相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
β -actin	F:5'-TCGAGCAGGAGATGGGAACC-3' R:5'-CTCGTGGATACCGCAAGATTC-3'
TNF- α	F:5'-GCGCTTTTCTGAATCCTACG-3' R:5'-TGCCCACTCTGCTCCTTCT-3'
IL-6	F:5'-TCAACTTCTCCAGCGTGATG-3' R:5'-TCTTTCCTCTTTTCTCCTG-3'
MPO	F:5'-CAGAACCACTGAGCCTGAGA-3' R:5'-CTCTCTTCTTCTGCCCCCA-3'

1.2.5 荧光酶标仪检测活性氧
各实验组按照“1.2.1”方法处理斑马鱼后,加入 CM-H2DCFDA 荧光探针对活性氧(reactive oxygen species, ROS)进行标记,共同孵育 2 h 后使用多功能荧光酶标仪测定每组 ROS 荧光值。

1.2.6 显微镜观察斑马鱼肠道出血反应

随机选取 3 dpf MPO-EGFP 斑马鱼,在显微镜下挑选发育正常斑马鱼幼鱼于 6 孔板中,每孔均处理 30 尾斑马鱼。设置空白对照组 (control, Con)、辛伐他汀模型组 (model, Mod) 和 DHM 组 (50、100、200、400 $\mu\text{g/mL}$)。Con 组:斑马鱼于含 0.1% DMSO 的鱼水中饲养;Mod 组:斑马鱼于含 8 $\mu\text{g/mL}$ 辛伐他汀的鱼水中饲养 6 h;DHM 组:分别将斑马鱼于含不同浓度 DHM 的鱼水中饲养,6 h 后于显微镜下 (40 $\times$) 观察各组斑马鱼肠道出血情况,统计各组斑马鱼肠道出血数量和肠道出血发生率。

1.2.7 分子对接

分子对接实验用于验证 DHM 与关键靶点 TNF- α 、IL-6、MPO 及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2, NOX2) 的结合活性。TNF- α 、IL-6 蛋白结构从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取, MPO、NOX2 蛋白结构从 AlphaFold 数据库 (<https://www.alphafold.ebi.ac.uk/>) 获取。DHM 结构来自 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。使用 AutoDockTools 1.5.7 对蛋白加氢、计算电荷并设定对接网格,同时优化 DHM 的可旋转键。利用 AutoDock Vina 1.1.2 对接后,计算蛋白与

小分子对接组合的得分,并使用 Pymol 和 Discovery Studio 软件进行分析和可视化呈现。

1.2.8 统计方法

本文中所有实验均重复 3 次,实验数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用 GraphPad Prism 9 软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析和 t 检验比较各组间差异, $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DHM 抑制斑马鱼尾静脉血栓形成

通过对斑马鱼尾静脉及心脏红细胞进行染色,研究 DHM 对斑马鱼尾静脉血栓形成的影响。结果如图 1 所示,与 Con 组相比,Mod 组斑马鱼尾静脉红细胞染色面积显著增加,血栓形成率为 94.2%,说明斑马鱼尾静脉血栓模型建立成功。与 Mod 组相比,DHM 低、中、高剂量组干预后均能显著减少尾静脉血栓形成 ($P<0.01$),血栓抑制率分别为 29.9%, 47.7%, 60.2%,具有浓度依赖性。同时,与 Con 组相比,Mod 组斑马鱼心脏红细胞染色面积明显减少 (斑马鱼心脏红细胞染色面积与尾静脉血栓负相关)^[16],而与 Mod 组相比 DHM 低、中、高剂量组干预后斑马鱼心脏红细胞染色面积明显增加 ($P<0.01$)。

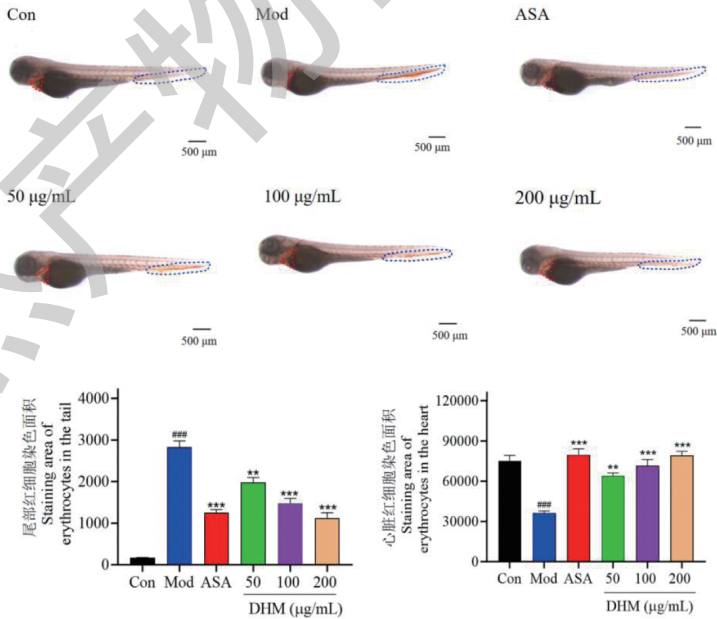


图 1 DHM 对斑马鱼尾静脉血栓及心脏红细胞的影响($\bar{x}\pm s, n=30$)

Fig. 1 Effects of DHM on zebrafish caudal vein thrombosis and heart erythrocytes($\bar{x}\pm s, n=30$)

注:红色虚线代表心脏位置,蓝色虚线代表尾静脉位置。与 Con 组相比,#### $P<0.001$;与 Mod 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,下同。Note:The red dashed line indicates the position of the heart,while the blue dashed line marks the location of the zebrafish caudal vein. Compared with Con group,#### $P<0.001$;Compared with Mod group,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,the same below.

2.2 DHM 抑制 MPO-EGFP 斑马鱼尾静脉血栓模型中性粒细胞的活化与募集

应用绿色荧光蛋白标记中性粒细胞的转基因斑马鱼 MPO-EGFP 建立尾静脉血栓模型,通过荧光显微镜在活体情况下观察各实验组斑马鱼 MPO 荧光强度,研究 DHM 对斑马鱼静脉血栓模型中性粒细胞活化及募集的影响。结果如图 2 所示,与 Con 组

相比 Mod 组斑马鱼中性粒细胞在尾静脉的活化及募集明显增加。DHM 低、中、高剂量组干预后中性粒细胞在尾静脉的活化及募集与 Mod 组相比均显著性减少($P < 0.01$)。同时,RT-qPCR 结果显示与 Mod 组相比,DHM 低、中、高剂量均可显著下调 *MPO* 基因的相对表达量($P < 0.001$)。

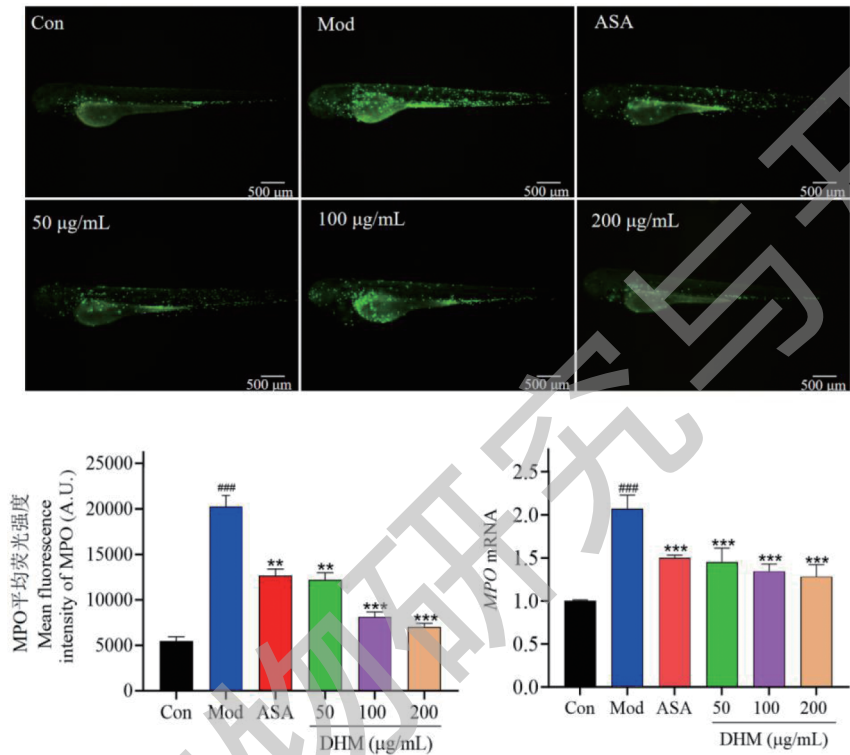


图 2 DHM 对 MPO-EGFP 斑马鱼中性粒细胞活化与募集的影响($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Fig. 2 Effects of DHM on the activation and recruitment of neutrophils in MPO-EGFP zebrafish($\bar{x} \pm s, n = 30$)

2.3 DHM 抑制尾静脉血栓模型斑马鱼 NETs 相关炎症因子表达

采用 RT-qPCR 研究 DHM 对斑马鱼静脉血栓模型 NETs 相关炎症因子 *TNF-α* 及 *IL-6* 表达的影响。

结果如图 3 所示,与 Con 组相比,Mod 组斑马鱼 *TNF-α* 及 *IL-6* 相对表达量均显著增加。与 Mod 组相比,DHM 组均能显著减少 *TNF-α* 相对表达量($P < 0.001$)及 *IL-6* 相对表达量($P < 0.01$)。

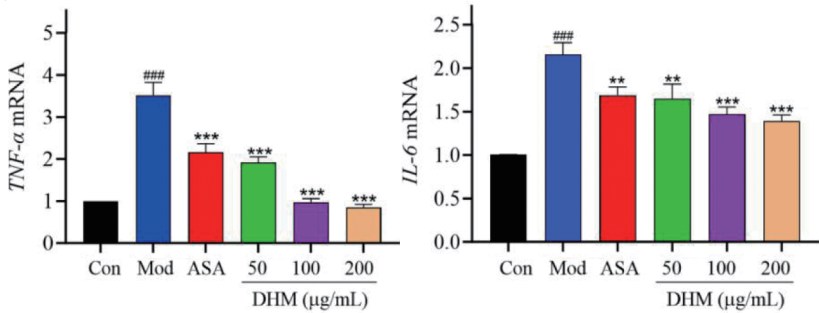


图 3 DHM 对尾静脉血栓模型斑马鱼炎症因子表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Fig. 3 Effects of DHM on the expression of inflammatory factors in the zebrafish caudal vein thrombosis model($\bar{x} \pm s, n = 30$)

表 2 DHM 对尾静脉血栓模型斑马鱼 ROS 生
成的影响($\bar{x} \pm s, n=30$)

Table 2 Effect of DHM on ROS production in the zebrafish caudal vein thrombosis model ($\bar{x} \pm s, n=30$)		
组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g/mL}$)	ROS 荧光值 ROS fluorescence intensity
Con	-	1088 $\pm$ 22.3
Mod	30	1641 $\pm$ 19.2 ^{###}
ASA	25	1490 $\pm$ 20.2 ^{***}
DHM	50	1445 $\pm$ 16.3 ^{***}
	100	1394 $\pm$ 25.1 ^{***}
	200	1362 $\pm$ 20.6 ^{***}

注:与 Con 组相比,^{###} $P < 0.001$;与 Mod 组相比,^{***} $P < 0.001$,下同。
Note: Compared with Con group,^{###} $P < 0.001$; Compared with Mod group,^{***} $P < 0.001$, the same below.

2.4 DHM 抑制尾静脉血栓模型斑马鱼 ROS 产生

为了进一步研究 DHM 对 NETs 形成的影响,通过荧光探针标记 ROS 研究 DHM 对诱导 NETs 形成的 ROS 产生的影响。结果见表 2,与 Con 组相比,Mod 组斑马鱼 ROS 的产生显著增加。与 Mod 组相比,DHM 组均能显著抑制斑马鱼 ROS 的产生($P < 0.001$)。

2.5 DHM 不引起斑马鱼出血反应

基于目前常用抗血栓药物的主要不良反应为出血反应,通过建立辛伐他汀诱导的斑马鱼肠道出血模型评估 DHM 的安全性。结果如图 4 及表 3 所示,与 Con 组相比 Mod 组能显著引起斑马鱼肠道出血反应,出血发生率为 94% ($P < 0.001$),而 DHM 组均未引起斑马鱼肠道出血反应,出血发生率均为 0%。

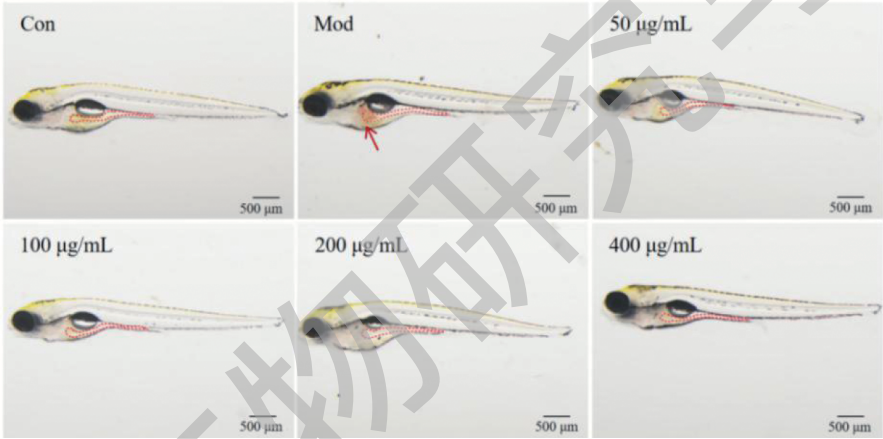


图 4 DHM 对斑马鱼肠道出血的影响

Fig. 4 Effect of DHM on intestinal bleeding in zebrafish

注:红色虚线框为肠道,红色箭头指示为肠道出血位置。Note:The red dashed box indicates the intestine, and the red arrow points to the location of intestinal bleeding.

表 3 DHM 对斑马鱼肠道出血的影响($n=30$)
Table 3 Effect of DHM on intestinal
bleeding in zebrafish ($n=30$)

组别 Group	剂量 Dose ($\mu\text{g/mL}$)	肠道出血的 斑马鱼数量 Number of zebrafish with intestinal bleeding	发生率 Incidence (%)
Con	-	0	0
Simvastatin	8	28	94 ^{###}
DHM	50	0	0
	100	0	0
	200	0	0
	400	0	0

2.6 DHM 分子对接结果

将 DHM 与 TNF- α 、IL-6、MPO、ROS 相关蛋白 NOX2 进行分子对接,进一步验证 DHM 抑制静脉血栓的作用靶点。结果如表 4 及图 5 所示,DHM 与

表 4 DHM 与靶点蛋白对接结果

Table 4 Molecule docking results of DHM with target proteins	
靶点 Target	结合能 Binding energy (kcal/mol)
TNF- α	-6.8
IL6	-6.7
MPO	-7.1
NOX2	-7.6

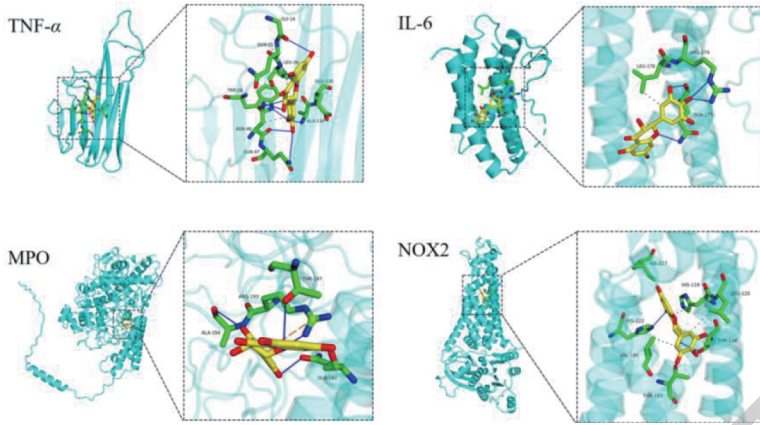


图5 DHM与靶点的分子对接可视化图

Fig. 5 Molecular docking visualization of DHM and targets

TNF- α 、IL-6 结合能均小于-5.0 kcal/mol,说明 DHM 与 TNF- α 、IL-6 之间结合良好(结合能越低说明结合越稳定)。而 DHM 与 MPO 及 NOX2 的结合能均小于-7.0 kcal/mol,表明 DHM 与 MPO 及 NOX2 结合较强。

3 讨论与结论

不同于已被深入研究的动脉血栓,静脉血栓的形成机制目前仍处于探索阶段。静脉血栓形成是多因素导致的病理结果,虽然长期以来一直以 1856 年 Virchow 提出的血栓形成三要素来解释静脉血栓的发生机制,包括血液瘀滞,血液高凝状态以及血管损伤^[17]。但是,越来越多的研究发现炎症反应在静脉血栓的发生发展过程中发挥着重要作用。中性粒细胞在受到炎症刺激后启动细胞内关键蛋白的转录和翻译,随后经过染色质解聚、核膜解体及细胞膜破裂等过程,将胞内染色质及多种颗粒蛋白(主要是 MPO)释放到胞外形成 NETs。NETs 的形成成为黏附血小板和红细胞提供了稳定的三维支架,并促进凝血酶生成和纤维蛋白沉积促进静脉血栓形成^[18]。NETs 的生成受炎症因子与氧化应激的双重调控,炎症因子 TNF- α 和 IL-6 通过上调还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶活性,诱导 ROS 爆发,而 ROS 进一步激活 MPO 并促进 NETs 释放^[19,20]。在这一过程中, TNF- α /IL-6-ROS-MPO 信号轴形成级联放大环路促进 NETs 释放,并诱导静脉血栓形成。

DHM 作为藤茶中的主要活性成分,在多项研究中被证明具有显著的抗炎与抗氧化作用。DHM 能够通过抑制核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein ki-

nase, MAPK)等炎症相关信号通路,显著下调 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎症因子的表达,从而减轻炎症损伤^[21]。此外, DHM 能激活核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1(nuclear factor erythroid-related factor 2/heme oxygenase-1, NRF2/HO-1)信号轴,增强内源性抗氧化防御,提升超氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽等关键抗氧化酶的活性,从而减少 ROS 过度生成及氧化应激引发的细胞伤害^[22]。DHM 还可降低 NADPH 氧化酶亚型 NOX2 和 NOX4 的表达,从源头抑制 ROS 生成^[23]。以上研究为 DHM 调控 TNF- α /IL-6 介导的 ROS 爆发、MPO 活化及 NETs 形成提供了理论依据。

本课题组前期研究表明, DHM 能够有效抑制血小板活化、延长凝血时间,发挥抗动脉血栓作用^[13]。在此基础之上,本研究通过建立 MPO-EGFP 斑马鱼尾静脉血栓模型,进一步探讨了 DHM 通过调控炎症-氧化应激级联反应抑制 NETs 形成,从而干预静脉血栓形成的机制。实验结果显示, DHM 能够显著抑制花生四烯酸诱导的斑马鱼尾静脉血栓形成,并有效降低中性粒细胞活化及 NETs 形成标志物 MPO 的表达。这一效应与 DHM 对 TNF- α /IL-6 及 ROS 的调控相关, DHM 能显著降低 TNF- α 和 IL-6 的 mRNA 的表达水平,同时显著减少 ROS 爆发。这一结果通过分子对接技术得到了进一步的验证。NETs 作为静脉血栓形成的关键介质,其生成过程需要中性粒细胞的活化及炎症反应和氧化应激的协同作用, DHM 可能通过干预这些环节减少 NETs 的形成与释放,从而有效抑制静脉血栓的形成,作用机制见图 6。

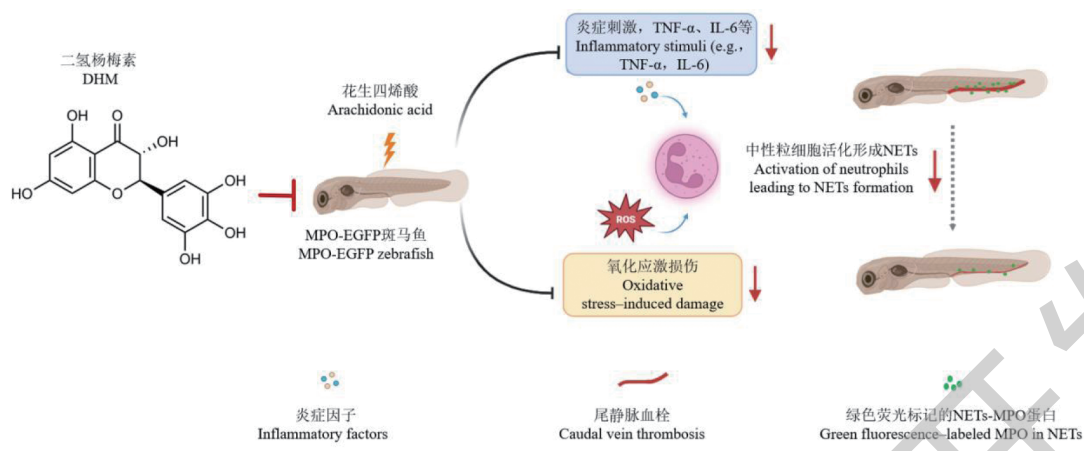


图6 DHM抑制斑马鱼尾静脉血栓形成的机制

Fig. 6 Mechanism of DHM inhibiting thrombus formation in zebrafish caudal vein

综上所述,DHM 可通过调节炎症-氧化应激级联反应,抑制中性粒细胞活化及 NETs 形成,从而有效干预斑马鱼尾静脉血栓的形成,且不引起出血反应,具有良好的有效性和安全性。这一发现不仅拓展了 DHM 的抗血栓机制,也为探讨兼具抗炎与抗氧化活性的天然产物防治静脉血栓提供了实验依据。并且 DHM 通过同时靶向炎症、氧化应激及 NETs 形成等多重病理环节,提示其在治疗 NETs 相关血栓性疾病(如脓毒症或肿瘤相关 VTE)中也可能具有潜在的治疗优势。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00386>) 中访问获取。

参考文献

1 Lutsey PL,Zakai NA. Epidemiology and prevention of venous thromboembolism[J]. Nat Rev Cardiol,2023,20:248-262.

2 Jin MC,Sussman ES,Feng AY,et al. Hemorrhage risk of direct oral anticoagulants in real-world venous thromboembolism patients[J]. Thromb Res,2021,204:126-133.

3 Colling ME,Tourdot BE,Kanthi Y. Inflammation, infection and venous thromboembolism[J]. Circ Res,2021,128:2017-2036.

4 Hidalgo A,Libby P,Soehnlein O,et al. Neutrophil extracellular traps:from physiology to pathology[J]. Cardiovasc Res, 2022,118:2737-2753.

5 Griffin MS,Dahlgren AR,Nagaswami C,et al. Composition of thrombi in zebrafish:similarities and distinctions with mammals[J]. J Thromb Haemost,2024,22:1056-1068.

6 Buchan KD,Prajsnar TK,Ogryzko NV,et al. A transgenic ze-

brafish line for *in vivo* visualisation of neutrophil myeloperoxidase[J]. PLoS One,2019,14:e0215592.

7 Chen S,Lv KY,Sharda A,et al. Anti-thrombotic effects mediated by dihydromyricetin involve both platelet inhibition and endothelial protection[J]. Pharmacol Res,2021,167:105540.

8 Du XP,Guo YJ,Yang JZ. Dihydromyricetin alleviated the damage of hypoxia-induced mouse neurons by reducing ROS levels and inhibiting the expression of PAR and γ H2AX[J]. BioRxiv,2024,7:602423.

9 Shi YS,Xiao L,Nie J,et al. Resource survey on Chinese minority medicine *Ampelopsis grossedentata* [J]. J Chin Med Mater(中药材),2020,43:1076-1080.

10 Ye Y,Ou XH,Huang QJ,et al. Antithrombotic effect of total flavonoids and monomeric compounds from *Ampelopsis grossedentata* [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol(中药新药与临床药理),2013,24:33-36.

11 Chang TM,Hsiao TC,Yang TY,et al. IgE-induced mast cell activation is suppressed by dihydromyricetin through the inhibition of NF- κ B signaling pathway[J]. Molecules,2021,26:3877.

12 Lv YK,Zheng X,Zhang J,et al. Effect of total flavonoids from *Forsythia suspensa* leaf on zebrafish ulcerative colitis[J](天然产物研究与开发),2024,36:1279-1287.

13 Chen C,Zuo YH,Hu HM,et al. Hepatic lipid metabolism disorders and immunotoxicity induced by cysteamine in early developmental stages of zebrafish[J]. Toxicology,2023,493:153555.

14 Tang HL,Qin NY,Rao C,et al. Screening of potential anti-thrombotic ingredients from *Salvia miltiorrhiza* in zebrafish and by molecular docking[J]. Molecules,2021,26:6807.