南京农业大学学报 2026,49(4):779-790
Journal of Nanjing Agricultural University
http://nauxb.njau.edu.cn
DOI:10.7685/jnau.202503020

袁闯,黄智,李晓帆,等.丹参内生细菌 TD16 发酵产物对小鼠尾静脉血栓形成的抑制作用[J]. 南京农业大学学报,2026,49(4):779-790.
Yuan C,Huang Z,Li X F,et al. Inhibitory effects of the fermentation products of *Salvia miltiorrhiza* endophytic bacteria TD16 on tail vein thrombosis formation in mice[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2026,49(4):779-790.

丹参内生细菌 TD16 发酵产物对小鼠尾静脉血栓形成的抑制作用

袁闯[1],黄智[2],李晓帆[3],黎文颖[1],吴旋[1],徐凡婷[1],孙莉琼[1*],唐晓清[1*],王康才[1]

(1.南京农业大学园艺学院,江苏 南京 211800;2.南京农业大学生命科学学院,江苏 南京 210014;
3.苏州聚鑫堂药业有限公司,江苏 苏州 215500)

摘要:[**目的**]本文旨在探究丹参内生细菌 TD16 的发酵提取物(TDFE)对角叉菜胶诱导小鼠尾静脉血栓形成的抑制作用及其潜在机制。[**方法**]将 KM 小鼠随机分为正常组(Control 组)、模型组(Model 组)、阿司匹林阳性对照组(Aspirin 组,10 mg·kg^{-1})和 TDFE 低剂量组(TDFE-L 组,50 mg·kg^{-1})、中剂量组(TDFE-M 组,100 mg·kg^{-1})、高剂量组(TDFE-H 组,200 mg·kg^{-1}),灌胃给药 7 d 后构建小鼠尾静脉血栓模型。通过测定黑尾率、血栓长度、凝血功能指标(凝血酶原时间 PT、活化部分凝血酶原时间 APTT、凝血酶时间 TT 和纤维蛋白原 FIB)、血清肝功能指标(天门冬氨酸氨基转移酶 AST、丙氨酸氨基转移酶 ALT、白蛋白 ALB、总胆红素 TBIL)、炎症因子(白细胞介素 IL-6、IL-1β 和肿瘤坏死因子 TNF-α)、血清纤溶指标(组织型纤溶酶原激活剂 t-PA、血栓素 B_2 TXB_2 和纤溶酶原激活抑制剂 PAI-1)以及肝脏和鼠尾组织的病理学分析等从多维度评价 TDFE 的体内抗血栓作用,并结合 UPLC-MS 和网络药理学初步解析活性成分及作用靶点。[**结果**]与 Model 组相比,TDFE-L 组血栓显著减少(P<0.05),TDFE-M 组和 TDFE-H 组血栓极显著减少(P<0.01),Aspirin 组几乎无明显血栓;各给药组小鼠的肝脏损伤均显著减轻,其中 TDFE-L 组和 Aspirin 组效果相当。凝血功能方面,各给药组小鼠的 PT、APTT 和 TT 均显著延长(P<0.05),FIB 含量降低。血清炎症因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 含量也显著降低(P<0.05)。纤溶指标方面,t-PA 浓度增加,而 TXB_2 和 PAI-1 浓度显著下降(P<0.05)。同时,血清中 AST、ALT 活性等肝代谢相关指标也显著降低(P<0.05)。UPLC-MS 鉴定出 α-亚麻酸(11.61%)、异香兰素(6.31%)等 19 种主要成分。网络药理学显示其可通过 IL-6、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(PPARG)、细胞间黏附分子 1(ICAM-1)等靶点调控脂质代谢和动脉粥样硬化通路发挥抗血栓作用。[**结论**]丹参内生细菌 TD16 发酵产物能有效抑制角叉菜胶诱导的小鼠尾静脉血栓形成,在血栓病治疗领域具有潜在的应用价值。

关键词:丹参;内生细菌;发酵产物;尾静脉血栓;角叉菜胶;抗血栓
中图分类号:R965 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-2030(2026)04-0779-12

Inhibitory effects of the fermentation products of *Salvia miltiorrhiza* endophytic bacteria TD16 on tail vein thrombosis formation in mice

YUAN Chuang[1],HUANG Zhi[2],LI Xiaofan[3],LI Wenying[1],WU Xuan[1],XU Fanting[1],
SUN Liqiong[1*],TANG Xiaoqing[1*],WANG Kangcai[1]

(1.College of Horticulture,Nanjing Agricultural University,Nanjing 211800,China;2.College of Life Sciences,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210014,China;3.Suzhou Juxintang Pharmaceutical Co.,Ltd,Suzhou 215500,China)

Abstract:[**Objectives**]The present study aimed to explore the inhibitory effect and underlying mechanism of the fermented extract from endophytic bacterium TD16 (TDFE) the root of *Salvia miltiorrhiza* on carrageenan-induced tail vein thrombosis in mice. [**Methods**]KM mice were randomly divided into normal group(Control group),model group(Model group),aspirin-positive control group(Aspirin group,10 mg·kg^{-1}),and TDFE low-dose group(TDFE-L,50 mg·kg^{-1}),medium-dose group(TDFE-M,100 mg·kg^{-1}) and high-dose group(TDFE-H,200 mg·kg^{-1}). After continuous gavage administration for 7 days,a mouse tail vein thrombosis model was established. The *in vivo* antithrombotic effect of TDFE was evaluated through comprehensive analysis of multiple dimensions,including black tail rate,thrombus length,coagulation indices(prothrombin time,PT;activated partial thromboplastin time,APTT;thrombin time,TT;fibrinogen,FIB),serum liver function indices(aspartate aminotransferase,AST;alanine aminotransferase,ALT;

收稿日期:2025-03-13
基金项目:江苏省农业科技自主创新项目[CX(22)3174];国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(ZYYZDXK-2023293);企业合作项目(20231020);南京农业大学大学生创新创业项目(202414XX012)
作者简介:袁闯,硕士研究生。*通信作者:孙莉琼,副教授,硕导,主要从事中药活性物质基础研究与质量评价研究,E-mail:liqiongsun@njau.edu.cn;唐晓清,教授,博导,主要从事中药品质评价与中药资源开发利用研究,E-mail:xqtang@njau.edu.cn。

albumin, ALB; total bilirubin, TBIL), inflammatory factors (interleukins IL-6, IL-1β and tumor necrosis factor TNF-α), serum fibrinolytic indexes (tissue-type fibrinogen activator, t-PA; thromboxane B_2, TXB_2; fibrinogen activator inhibitor, PAI-1), as well as pathological analysis of liver and rat tail tissues. The UPLC-MS and network pharmacology were combined to analyze the chemical components and potential targets of TDFE. [**Results**] Compared with the Model group, the thrombus in the TDFE-L group was significantly reduced ($P<0.05$). The TDFE-M and TDFE-H groups exhibited very limited thrombosis ($P<0.01$), and the Aspirin group showed almost no visible thrombosis. The liver damage in mice from each administration group was significantly mitigated, with the most pronounced effect observed in the TDFE-L and the Aspirin group. Regarding coagulation function, PT, APTT and TT were significantly prolonged in mice from each administration group ($P<0.05$), accompanied by a decrease in FIB content. Furthermore, a significant decrease in the serum concentrations of inflammatory cytokines IL-6, IL-1β, and TNF-α was observed ($P<0.05$). Regarding fibrinolysis index, the concentration of t-PA increased, while the concentrations of TXB_2 and PAI-1 significantly decreased ($P<0.05$). Concurrently, serum AST, ALT activities and other liver metabolism-related indexes demonstrated a significant decrease ($P<0.05$). A comprehensive comparison of the TDFE-H group and the Aspirin group revealed that the former exhibited a superior overall effect. UPLC-MS identified 19 major components, including α-linolenic acid (11.61%) and isovanillin (6.31%). Network pharmacology analysis suggested that TDFE might exert antithrombotic effects by regulating lipid metabolism and atherosclerosis pathways through targets such as IL-6, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARG), and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). [**Conclusions**] The fermentation product of *S. miltiorrhiza* endophytic bacteria TD16 could effectively inhibit carrageenan-induced tail vein thrombosis in mice, indicating its potential application value in the treatment of thrombosis.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*; endophytic bacteria; fermentation product; tail vein thrombosis; carrageenan; antithrombosis

血栓是由血管内血凝块大量聚集形成的,通常由血小板聚集和凝血因子活化引发[1],对人体健康构成严重威胁。目前,临床使用的抗血栓药物主要包括抗血小板聚集药物(如阿司匹林和氯吡格雷[2]等)、抗凝药物(如华法林和达比加群[3]等)以及溶栓药物(如链激酶和尿激酶[4]等)。但这些药物在临床使用过程中往往伴随着不良反应,例如胃肠出血、颅内出血、血尿、急性肝肾损伤、血管性炎症及头痛[5]等。因此,开发更为安全、有效、经济且天然来源的抗血栓药物显得尤为重要。

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)为唇形科药用植物,以其干燥根及根茎入药,具有活血祛瘀、通经止痛的功效[6],在临床上广泛应用于各种心脑血管疾病的治疗。植物内生菌作为一种新兴且潜力巨大的微生物资源,具有资源丰富、生长快、代谢可控、易选育及可工业化生产等优势。根据协同演化理论[7],内生菌作为植物生态环境的重要组成部分,在与宿主植物长期共存的过程中,能够产生多种代谢产物,不仅可以帮助宿主植物抵抗各种病原微生物或病虫害,还可能拥有与宿主植物相同或相似的药效活性。本课题组前期从丹参根部分离得到1株具有体外溶栓活性的芽胞杆菌(*Bacillus* sp. TD16),利用活性追踪分离技术,在发酵液中提取得到了活性提取物,命名为TDFE。然而,TDFE在体内的药效及其具体作用机制仍需深入探究。

因此,本研究建立角叉菜胶诱导的小鼠尾静脉血栓模型,观察TDFE对血栓形成的影响,在动物上验证其抗血栓活性,探讨其作用机制,为天然来源的抗血栓药物研发提供有价值的参考和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品与试剂 二甲基亚砜(DMSO)、水合氯醛、3.8%枸橼酸钠抗凝剂、多聚甲醛固定液、EDTA抗凝管购自南京寿德生物科技有限公司;IL-1β、IL-6、TNF-α测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。t-PA、PAI-1、TXB_2测定试剂盒购自南京迈博昊成生物科技有限公司。

1.1.2 菌种 试验所用菌株为本课题组从药用植物丹参的根部分离获得,经16S rDNA基因序列鉴定为芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.),将其编号为TD16。具体分离鉴定流程如下:在田间采集新鲜丹参植株,低温保存运回实验室;剪取根部中段组织,清水冲洗干净后转移至超净工作台内,用75%乙醇浸泡10 min进行首次灭菌;用无菌水漂洗5~6次去除残留乙醇,再用2%次氯酸钠溶液浸泡3 min二次灭菌,最后用无菌水漂洗5~6次。取最终漂洗用的无菌水100 μL,涂布于LB琼脂平板进行表面灭菌验证。确认无微生物生长后,将处理后的根组织转移至无菌研钵,加入1.5 mL无菌生理盐水充分研磨,所得匀浆经涡旋振荡后作为原始菌悬液。按10倍梯度稀释法制备10^{-1}~10^{-5}稀释度样品。选取10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 3个稀释度样品各100 μL,涂布接种LB琼脂平板,28 ℃恒温培养48 h。选取形态特征各异的单菌落,经四区划线法连续纯化4次,获得单菌落生长的纯培养物。将纯化菌株接种于LB液体培养基,37 ℃振荡培养至$D_{600}=1.0$时,取

1.5 mL 菌液委托北京擎科生物科技有限公司进行 16S rDNA 扩增与测序分析。所得序列通过 NCBI 数据库 BLAST 比对,归属为芽胞杆菌属。

1.1.3　试验动物　雄性 SPF 级 KM 小鼠 72 只,5 周龄,体重为(24.0±2.0)g,由南京农业大学动物实验中心提供,试验动物使用许可证号:SYXK(苏)2022-0031。小鼠自由进食普通标准饲料和饮用纯净水,在温度(25±1)℃空调动物房适应性饲养 7 d 后开始试验。所有的动物试验严格遵照南京农业大学动物实验中心的动物伦理学条例及国家实验动物饲养和使用指南(伦理批准号:NJAU.No20240528101)。

1.2　试验方法

1.2.1　TD16 发酵产物提取物 TDFE 的制备　将活化后的菌株 TD16 接种于 LB 液体培养基中,30 ℃、180 $r\cdot min^{-1}$振荡培养 3 d。按 1%(体积分数)接种量将种子培养液接种到液体发酵培养基中,30 ℃、180 $r\cdot min^{-1}$振荡培养 6 d,3 000 $r\cdot min^{-1}$离心 20 min,收集发酵上清液。上清液经减压浓缩,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇萃取,每个步骤重复 3 次,弃去无体外溶栓活性的石油醚和正丁醇部分,合并乙酸乙酯萃取液减压浓缩旋干,得到乙酸乙酯部分。进一步用 60 Å 的硅胶柱进行柱层析分离,依次用石油醚-乙酸乙酯溶剂体系(体积比分别为 100∶0、50∶1、20∶1、10∶1、5∶1、2∶1、0∶100)进行梯度洗脱,对各洗脱部位进行体外溶栓活性检测,发现活性成分主要集中在石油醚-乙酸乙酯(10∶1)的洗脱部位,经合并浓缩干燥得到 TD16 的溶栓活性提取物 TDFE。最后用 5%(体积分数)DMSO 溶解,用生理盐水稀释配制成不同浓度的样品溶液,备用。

1.2.2　体外溶栓活性测定　参考龚铃等[8]的方法并加以改进。将小鼠摘眼球取血,用注射器移取血液至直径 5 mm 玻璃管中,封闭两头;待其自然凝固后用吸水纸吸取表面液体,用手术刀切割成大小质量一致的血块,置于离心管中;将试验组各液体 1 mL 覆盖于血凝块上,对照组用 1 mL 生理盐水覆盖于血凝块上,于 37 ℃恒温摇床上 80 $r\cdot min^{-1}$孵育 24 h。试验组血凝块干重记录为 m_1,对照组血凝块干重为 m_0。溶栓率计算公式:溶栓率=$(m_0-m_1)/m_0\times100\%$。

1.2.3　试验分组及小鼠静脉血栓模型构建　取 72 只健康且体重为(24.0±2.0)g 的 SPF 级雄性 KM 小鼠,随机分成 6 组,每组 12 只。分组如下:正常对照组(Control 组)、模型组(Model 组)、Aspirin 阳性给药组(Aspirin 组),以及 TDFE 的 3 个不同剂量处理组:低剂量组(TDFE-L 组,50 $mg\cdot kg^{-1}$)、中剂量组(TDFE-M 组,100 $mg\cdot kg^{-1}$)、高剂量组(TDFE-H 组,200 $mg\cdot kg^{-1}$)。Aspirin 组给药浓度参照人与动物体表面积折算系数进行换算[9],即 10 $mg\cdot kg^{-1}$。Control 组用等量生理盐水灌胃,每日 1 次,持续 7 d,记录初始体重,每天称重 1 次以监测体重变化。采用腹腔注射角叉菜胶构建小鼠血栓模型,并采用文献[10-11]的方法进行适当改进,于第 7 天灌胃各给药组药物 45 min 后,腹腔注射质量分数为 0.2%的角叉菜胶溶液,注射剂量为每 10 g 体重 0.1 mL。空白对照组注射同等剂量的生理盐水。造模后将小鼠尾部置于冰水内 1 min,再置于(25±1)℃的环境中饲养,自由饮食,48 h 后观察记录小鼠尾部血栓长度。

1.2.4　小鼠尾部血栓长度测定　根据前期预试验结果,将给予 0.2%角叉菜胶溶液后且小鼠尾部出现变黑及坏死脱落现象的时间点,设为黑尾长度测定时间。计算血栓形成长度占尾部总长度的百分比,即为血栓形成相对长度。

1.2.5　凝血 4 项指标检测　待测定完小鼠尾巴长度和黑尾长度后,迅速断头处死小鼠,用含 1.5 mL 38 $g\cdot L^{-1}$枸橼酸钠的离心管采血(血液∶抗凝剂的体积比为 9∶1),3 000 $r\cdot min^{-1}$离心 15 min 后取上清液,采用全自动凝血分析仪检测凝血功能指标 APTT、PT、TT 和 FIB。

1.2.6　血清生化指标测定　采用全自动生化仪测定小鼠血清 ALT、AST 活性和 TBIL、ALB、HDL-C、LDL-C、TG、TC 含量。

1.2.7　血清炎症因子测定　将通过小鼠眼球采集的血液置于普通离心管内静置 30 min,3 000 $r\cdot min^{-1}$离心 10 min,取上清液,用 ELISA 试剂盒检测上清液中炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 浓度。参照 ELISA 试剂盒说明书进行相应操作,测定前将试剂盒和血液置于室温条件下平衡 30 min 以上。

1.2.8　血清凝血和纤溶因子测定　参照 ELISA 试剂盒说明书测定小鼠血清中 TXB_2、t-PA、PAI-1 含量。

1.2.9　小鼠组织病理学切片观察　将小鼠尾部后段全段及肝脏组织切片后用 4%多聚甲醛浸泡固定,用苏木素-伊红(HE)染色后于光学显微镜下观察并拍照记录。

1.2.10　TDFE 的 UPLC-MS 化学成分分析　使用 Thermo Fisher Scientific Vanquish 超高效液相色谱系统,通过 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm)对 TDFE 样品进行色谱分离。

流动相 A 相为水相,含 25 mmol·L^{-1}乙酸铵和 25 mmol·L^{-1}氨水,B 相为乙腈。样品室温度 4 ℃,进样体积 2 μL。梯度洗脱程序:0~2 min,10% B;2~14 min,10%~90% B;14~16 min,90% B;16~17 min,90%~10% B;17~18.5 min,10% B。使用 Thermo Scientific Orbitrap Exploris 120 高分辨质谱仪,配备电喷雾离子源(ESI)进行质谱检测。正/负离子扫描模式分别设置喷雾电压为+3.8 kV 和-3.4 kV,毛细管温度 320 ℃,鞘气流量 50 Arb,辅气流量 15 Arb,分辨率 60 000,数据依赖型扫描(DDA)模式下触发二级质谱(MS/MS)采集,动态排除时间 6 s。碰撞池能量采用 20、30、40 eV 三步碎裂模式。质谱数据采集范围(m/z)100~1 500,使用 Xcalibur 4.4 软件进行数据采集与处理分析。

1.2.11 网络药理学分析 利用 Swiss Target Prediction 数据库(http://swisstargetprediction.ch/)预测 TDFE 活性成分的作用靶点(Probility>0);采用 Genecards 数据库(www.genecards.org/)、OMIM 数据库(https://www.omim.org/)、Drugbank 数据库(https://db.idrblab.net/ttd/),以“thrombus”“thrombosis”“antithrombotic”“fibrinolysis”“coagulation factor”为关键词,筛选“血栓”相关作用靶点,通过微生信分析平台(https://www.bioinformatics.com.cn)对 TDFE 活性成分预测靶点与血栓疾病相关靶点进行交集分析,获取潜在抗血栓靶点。将潜在靶点导入 STRING 数据库(https://cn.string-db.org/),构建蛋白互作(PPI)网络,利用 Cytoscape 3.10.0 软件对 PPI 网络进行可视化处理。同时利用 Cytoscape 3.10.0 软件的 Centiscape2.2 插件,筛选出 Degree ≥ 10 的核心靶点,导入 David 数据库(https://davidbioinformatics.nih.gov/)进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析,通过微生信分析平台对富集结果进行可视化处理。最后,利用 Cytoscape 3.10.0 软件构建 TDFE“活性成分-血栓核心靶点-通路”网络。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析,结果以均值±标准差($\bar{x}\pm SD$)表示;多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法(*LSD* 法)。

2 结果与分析

2.1 不同洗脱部位的体外溶栓活性对比

如图 1 所示,对比多种洗脱剂比例条件,发现当洗脱剂石油醚-乙酸乙酯体积比为 10∶1 时,所获洗脱部位的溶栓活性极显著高于其他部位(P<0.001),表明 TD16 菌株所产生的溶栓活性成分主要集中在该洗脱部位。因此,后续试验采用体积比为 10∶1 石油醚-乙酸乙酯洗脱液的干燥浓缩物进行,并将其命名为 TDFE。

2.2 不同给药处理对小鼠体重的影响

如图 2 所示,连续灌胃 1 周后,Control 组小鼠平均体重为 40.25 g,Model 组、Aspirin 组、TDFE-L 组、TDFE-M 组和 TDFE-H 组小鼠平均体重分别为 39.50、40.42、40.67、41.50、41.33 g。各 TDFE 给药组与

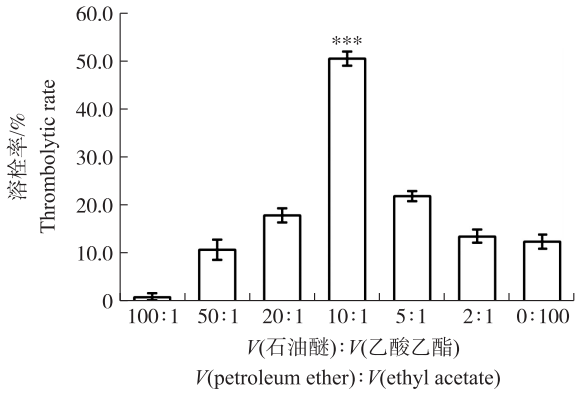


图 1 不同洗脱部位的体外溶栓活性

Fig. 1 *In vitro* thrombolysis activities of the elution products

*** P<0.001.

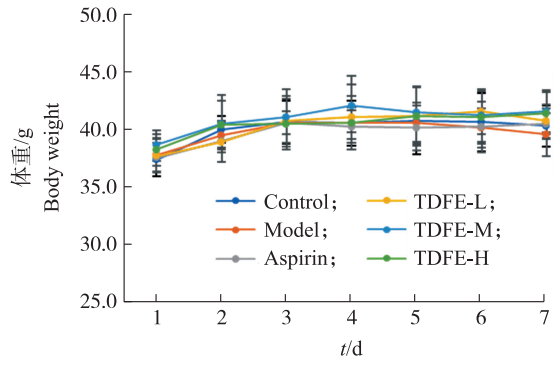


图 2 TDFE 对小鼠体重的影响

Fig. 2 Effect of TDFE on body weight in mice

Control:正常对照组 Normal group;Model:模型组 Model group;Aspirin:阳性给药组 Aspirin-positive control group;TDFE-L:低剂量组 Low-dosee group(50 mg·kg^{-1} TDFE);TDFE-M:中剂量组 Medium-dose group(100 mg·kg^{-1} TDFE);TDFE-H:高剂量组 High-dose group(200 mg·kg^{-1} TDFE). 下同 The same as follows.

Control、Model、Aspirin 组相比,体重均没有显著差异($P>0.05$)。表明 TDFE 在试验设定的剂量范围内,对小鼠的基本生活和饮食习惯未产生明显干扰,小鼠的进食、活动等行为正常,能够在一定程度上维持小鼠体重稳定。

2.3　TDFE 对小鼠尾部血栓形成的影响

由图 3 可见,造模 48 h 后,除 Control 组外,其他各组小鼠尾部均出现了不同程度的暗红色血栓,部分小鼠尾部血栓甚至出现干枯、脱落现象,形成断尾。由表 1 可见,与 Control 组小鼠相比,Model 组小鼠的黑尾率为 100%,尾部血栓约占全尾长度的 80.89%,两组间差异显著($P<0.05$),提示模型构建成功。与 Model 组小鼠相比,各给药组小鼠的黑尾率、尾部血栓长度和尾部血栓相对长度均有不同程度的降低。其中 Aspirin 组小鼠尾部血栓改善效果最为显著($P<0.05$),表明阳性对照药物阿司匹林在抑制血栓形成方面有良好作用。同时,TDFE-M 组和 TDFE-H 组小鼠的尾部血栓情况也得到了极大改善($P<0.05$),并且治疗效果接近阳性对照药物 Aspirin 组,但仍存在显著差异。TDFE-L 组尾部血栓长度和尾部血栓相对长度与 Model 组相比显著降低($P<0.05$)。初步表明,TDFE 在不同剂量下均对小鼠静脉血栓有抑制作用,且呈现出一定的剂量依赖性。



图 3　小鼠尾部血栓长度观察

Fig. 3　Observation of tail thrombus length in mice

表 1　小鼠黑尾率、血栓长度和血栓相对长度的比较

Table 1　Comparison of black tail rate, thrombus length and relative thrombus length in mice

组别 Group	剂量/(mg·kg^{-1}) Dosage	黑尾率/% Black tail rate	血栓长度/mm Thrombus length	血栓相对长度/mm Relative length of thrombus
Control				
Model		100.00	88.58±7.22	80.89±6.41
Aspirin	10	58.33	4.62±4.13*	4.33±3.86*
TDFE-L	50	100.00	54.25±5.21$^{*\#}$	51.84±5.69$^{*\#}$
TDFE-M	100	100.00	13.92±3.06$^{*\#}$	13.11±3.19$^{*\#}$
TDFE-H	200	100.00	15.42±2.68$^{*\#}$	14.22±2.59$^{*\#}$

注:* 表示与模型组相比差异显著($P<0.05$);$^{\#}$ 表示与阿司匹林组相比差异显著($P<0.05$)。

Note: * indicates significant difference compared with the model group ($P<0.05$); $^{\#}$ indicates significant difference compared with the aspirin group ($P<0.05$).

2.4　TDFE 对小鼠血液学指标的影响

2.4.1　对凝血功能的影响　如表 2 所示,与 Control 组相比,Model 组小鼠的 APTT、PT、TT 均显著减少,FIB 浓度显著升高($P<0.05$),表明造模后小鼠存在凝血功能异常,表现为凝血倾向增强。与 Model 组相比,各给药组小鼠的血清 PT、APTT、TT 均显著增加,FIB 浓度显著降低($P<0.05$)。表明 Aspirin 和不同剂量的 TDFE 均能在一定程度上改善小鼠的凝血功能异常,使凝血倾向减弱。此外,TDFE 的药效作用呈现出明显的剂量依赖性,即 TDFE 剂量越大,其药效作用越显著。TDFE-L 和 TDFE-M 组小鼠的血清 PT 和 TT 水平低于 Aspirin 组,而 FIB 含量高于 Aspirin 组,这表明在较低和中等剂量下,TDFE 对小鼠凝血功能的改善作用可能略逊于 Aspirin。然而,TDFE-H 组中 PT 和 APTT 水平高于 Aspirin 组,TT 和 FIB 水平低于 Aspirin 组($P<0.05$)。表明在高剂量下,TDFE 对小鼠凝血功能的改善作用更为显著,甚至优于 Aspirin。

表 2 不同处理对小鼠凝血功能指标的影响

Table 2 Effects of different treatments on coagulation function indexes in mice

组别 Group	凝血酶原时间/s Prothrombin time(PT)	活化部分凝血酶原时间/s Activated partial thromboplastin time(APTT)	凝血酶时间/s Thrombin time(TT)	纤维蛋白原含量/(g·L^{-1}) Fibrinogen(FIB) content
Control	10.32±0.32	21.21±0.66	32.06±0.99	1.57±0.05
Model	9.03±0.28*	19.56±0.61*	22.89±0.20*	3.30±0.10*
Aspirin	10.81±0.34$^{\#}$	28.91±0.89$^{*\#}$	33.99±0.14$^{*\#}$	2.53±0.08$^{*\#}$
TDFE-L	8.46±0.26$^{*\#\dagger}$	31.03±0.96$^{*\#\dagger}$	24.31±0.10$^{*\#\dagger}$	3.17±0.08$^{*\#\dagger}$
TDFE-M	9.33±0.29*†	32.30±1.00$^{*\#\dagger}$	28.07±0.47$^{*\#\dagger}$	2.76±0.09$^{*\#\dagger}$
TDFE-H	11.60±0.36$^{*\#\dagger}$	32.93±1.02$^{*\#\dagger}$	26.09±0.59$^{*\#\dagger}$	2.34±0.07$^{*\#\dagger}$

注：* 表示与对照组相比差异显著(P<0.05)，$^{\#}$表示与模型组相比差异显著(P<0.05)，† 表示与阿司匹林组相比差异显著(P<0.05)。下同。

Note: * indicates significant difference compared with the control group(P<0.05); $^{\#}$ indicates significant difference compared with the model group(P<0.05); † indicates significant difference compared with the aspirin group(P<0.05). The same as follows.

2.4.2 对炎症因子的影响 如表 3 所示，与 Control 组相比，Model 组小鼠血清中的炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 浓度均显著升高(P<0.05)，表明造模后小鼠体内存在明显的炎症反应。与 Model 组相比，Aspirin 组、TDFE-M 和 TDFE-H 组的 IL-6、IL-1β、TNF-α 浓度均显著降低(P<0.05)，表明 Aspirin 和 TDFE(中、高剂量)均能抑制小鼠体内的炎症反应，降低炎症因子的水平。在 TDFE 的不同剂量组中，随着剂量的增加，IL-1β 和 TNF-α 的浓度逐渐降低，表现出明显的剂量依赖性。具体而言，TDFE-M 组 IL-1β、TNF-α 浓度显著低于 TDFE-L 组(P<0.05)，而 TDFE-H 组 IL-1β、TNF-α 浓度则显著低于 TDFE-M 组(P<0.05)。整体而言，TDFE-H 组与 Aspirin 组在降低小鼠血清中 IL-1β 和 TNF-α 水平方面表现出相似的效果，两组之间的差异不显著，提示高剂量的 TDFE 可能具有与 Aspirin 相当的抗炎作用。

表 3 不同处理对小鼠血浆中炎症因子的影响

Table 3 Effects of different treatments on inflammatory factors in mice plasma pg·mL^{-1}

组别 Group	IL-6 浓度 IL-6 concentration	IL-1β 浓度 IL-1β concentration	TNF-α 浓度 TNF-α concentration
Control	9.09±0.30	13.94±0.90	58.50±0.87
Model	11.93±0.16*	17.13±0.05*	66.67±2.30*
Aspirin	9.45±0.49$^{*\#}$	11.84±0.65$^{*\#}$	53.80±0.97$^{*\#}$
TDFE-L	9.10±0.29$^{\#\dagger}$	16.54±0.65*†	65.68±2.86†
TDFE-M	9.51±1.10$^{\#}$	14.38±2.43$^{\#\dagger\ddagger}$	56.81±0.31$^{\#\dagger\ddagger}$
TDFE-H	9.13±0.54$^{\#\dagger}$	13.77±0.12$^{\#\ddagger\triangle}$	53.18±0.05$^{*\#\ddagger\triangle}$

注：‡表示与 TDFE-L 组相比差异显著(P<0.05)；$^{\triangle}$表示与 TDFE-M 组相比差异显著(P<0.05)。下同。

Note: ‡ indicates significant difference compared with the TDFE-L group(P<0.05); $^{\triangle}$ indicates significant difference compared with the TDFE-M group(P<0.05). The same as follows.

2.4.3 对纤溶系统的影响 如表 4 所示，与 Control 组相比，Model 组 t-PA 浓度降低，TXB_2、PAI-1 浓度显著升高(P<0.05)，表明造模后小鼠体内纤溶系统出现明显紊乱，凝血倾向相对增加。与 Model 组相比，Aspirin、TDFE-M、TDFE-H 组 t-PA 浓度均有所升高，TXB_2、PAI-1 浓度均显著降低(P<0.05)，表明 Aspirin 和中、高剂量的 TDFE 均能改善小鼠体内紊乱的纤溶系统，调节各纤溶因子水平。对比不同剂量的 TDFE 给药组，相较于 TDFE-L 组，TDFE-M 和 TDFE-H 组 t-PA 浓度升高，但无显著差异，TXB_2 浓度显著降低(P<0.05)，PAI-1 浓度也呈降低趋势，表明 TDFE 在调节纤溶系统方面具有一定的剂量相关性。TDFE-H 组与阳性药 Aspirin 组在调节纤溶系统方面表现出相似的效果。在 TDFE-M 组与 TDFE-H 组间 t-PA、TXB_2、PAI-1 等各项指标差异均不显著，提示在中剂量与高剂量这个区间内，TDFE 对纤溶系统的调节作用达到一个相对稳定的状态。

表 4 不同处理对小鼠血浆纤溶系统指标的影响

Table 4 Effects of different treatments on plasma fibrinolytic system indexes in mice

组别 Group	组织型纤溶酶原激活剂浓度/(ng·mL^{-1}) t-PA concentration	血栓素 B_2 浓度/(pg·mL^{-1}) TXB_2 concentration	纤溶酶原激活抑制剂浓度/(pg·mL^{-1}) PAI-1 concentration
Control	5.64±0.67	53.74±2.52	3.13±0.27
Model	5.32±0.12	64.33±3.57*	3.78±0.02*
Aspirin	5.60±0.69	49.87±0.43$^{*\#}$	2.60±0.02$^{*\#}$
TDFE-L	5.30±0.18	55.49±4.65*†	3.37±0.54†
TDFE-M	5.43±0.47	50.10±0.04$^{*\#\ddagger}$	3.31±0.01†
TDFE-H	5.55±0.25	50.33±0.81$^{*\#\ddagger}$	3.02±0.23$^{\#}$

Note: t-PA: Tissue-type fibrinogen activator; TXB_2: Thromboxane B_2; PAI-1: Fibrinogen activator inhibitor.

2.4.4　对小鼠肝功能的影响　由表 5 可知,相较于 Control 组,Model 组 ALT、AST 活性及 TBIL 和 ALB 浓度均显著上升($P<0.05$),表明造模后肝脏合成功能可能受损;相较于 Model 组,各给药组 ALT、AST 活性和 TBIL 浓度均显著降低($P<0.05$),提示 Aspirin 和 TDFE 处理对受损的肝细胞具有一定的保护作用;各给药组与 Model 组相比,ALB 浓度差异不显著,这表明各处理可能在短期内对肝脏合成 ALB 功能的影响较小。对比不同剂量的 TDFE 给药组,发现 TDFE 在改善肝功能损伤方面亦具有一定的剂量依赖性。

表 5　不同处理对小鼠血浆肝功能水平指标的影响

Table 5　Effects of different treatments on plasma liver function level in mice

组别 Group	丙氨酸氨基转移酶活性/(U·L^{-1}) ALT activity	天门冬氨酸氨基转移酶活性/(U·L^{-1}) AST activity	总胆红素浓度/(μmol·L^{-1}) TBIL concentration	白蛋白浓度/(g·L^{-1}) ALB concentration
Control	33.08±1.53	104.41±2.66	7.18±0.13	22.43±0.35
Model	99.43±4.12*	170.42±3.93*	12.40±0.43*	26.66±0.38*
Aspirin	34.24±0.26$^{\#}$	127.49±1.88$^{*\#}$	7.29±0.57$^{\#}$	25.72±0.66*
TDFE-L	49.84±1.32$^{*\#}$	145.28±2.08$^{*\#\dagger}$	9.89±0.32$^{*\#\dagger}$	26.65±0.42*
TDFE-M	47.25±0.88$^{*\#\dagger}$	135.78±3.46$^{*\#\dagger}$	8.41±0.21$^{*\#\dagger}$	26.56±0.96*
TDFE-H	39.10±2.41$^{*\#\dagger}$	133.64±3.07$^{*\#\dagger}$	7.71±0.35$^{*\#}$	26.22±0.88*

Note:ALT:Alanine aminotransferase;AST:Aspartate aminotransferase;TBIL:Total bilirubin;ALB:Albumin.

2.4.5　对血脂的影响　如表 6 所示,相较于 Control 组,Model 组 LDL-C、TG 和 TC 浓度显著升高($P<0.05$),HDL-C 浓度则显著降低,提示模型小鼠存在潜在的心血管风险。与 Model 组相比,Aspirin 组和 TDFE 处理组的 LDL-C、TG 和 TC 浓度都有不同程度降低,HDL-C 浓度则显著升高($P<0.05$),表明 Aspirin 和 TDFE 处理能够调节血脂代谢,改善血脂异常状况,对血管具有一定的保护作用。对比 TDFE 各剂量组,发现一定的剂量依赖性趋势,随着 TDFE 剂量增加,对血脂代谢的调节作用亦越显著,高剂量 TDFE 处理下小鼠表现出相对良好的脂质代谢能力。

表 6　不同处理对小鼠血浆血脂水平的影响

Table 6　Effects of different treatments on plasma lipid levels in mice　　mmol·L^{-1}

组别 Group	高密度脂蛋白胆固醇浓度 HDL-C concentration	低密度脂蛋白胆固醇浓度 LDL-C concentration	甘油三酯浓度 TG concentration	总胆固醇浓度 TC concentration
Control	0.79±0.03	0.45±0.01	0.83±0.03	1.65±0.05
Model	2.23±0.31*	0.19±0.02*	1.45±0.03*	5.04±0.11*
Aspirin	1.43±0.14$^{*\#}$	0.45±0.01$^{\#}$	0.85±0.03$^{\#}$	2.91±0.05$^{*\#}$
TDFE-L	1.98±0.24$^{*\#\dagger}$	0.26±0.02$^{*\#\dagger}$	1.18±0.04$^{*\#\dagger}$	4.62±0.39$^{*\#\dagger}$
TDFE-M	1.67±0.06$^{*\#}$	0.29±0.04$^{*\#\dagger}$	1.15±0.04$^{*\#\dagger}$	4.66±0.12$^{*\#\dagger}$
TDFE-H	1.86±0.07$^{*\#\dagger}$	0.32±0.01$^{*\#\dagger)}$	0.94±0.06$^{*\#\dagger}$	3.72±0.08$^{*\#\dagger}$

Note:HDL-C:High-density lipoprotein cholesterol;LDL-C:Low-density lipoprotein cholesterol;TG:Triglyceride;TC:Total cholesterol.

2.5　各组小鼠肝脏病理组织学形态

如图 4 所示,Control 组肝脏组织被膜结构清晰,肝小叶结构清晰,肝窦正常,细胞核圆且居中,小叶中央为中央静脉,少见静脉淤血。Model 组肝小叶分界不明显,细胞肿胀,胞质疏松淡染,粒细胞积聚,偶见

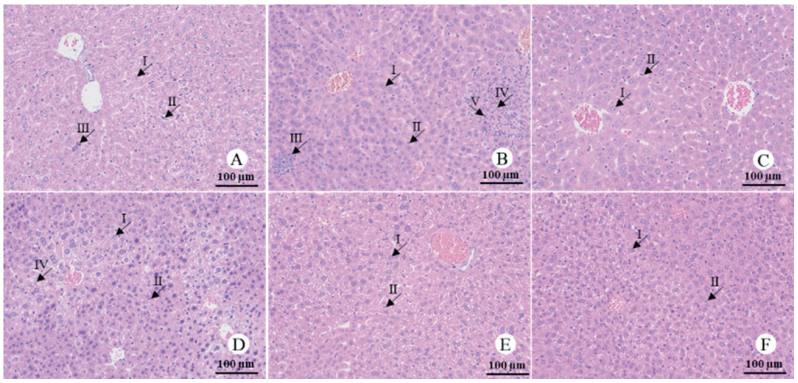


图 4　各组小鼠肝脏组织 HE 染色结果

Fig. 4　HE staining results of liver tissues of mice in each group

A. Control;B. Model;C. Aspirin;D. TDFE-L;E. TDFE-M;F. TDFE-H.

图中箭头Ⅰ所指为正常肝细胞;箭头Ⅱ所指为巨噬细胞;箭头Ⅲ所指为粒细胞灶;箭头Ⅳ所指为肝细胞点状坏死;箭头Ⅴ所指为炎性浸润。In the figure, arrow Ⅰ refers to normal hepatocytes; arrow Ⅱ refers to macrophages; arrow Ⅲ refers to granulocyte foci; arrow Ⅳ refers to hepatocyte punctate necrosis; and arrow Ⅴ refers to inflammatory infiltration.

肝细胞点状坏死,且出现大量炎性浸润,表明肝脏出现异常状态。与 Model 相比,Aspirin、TDFE-M 和 TDFE-H 组的肝小叶结构略有恢复,未见粒细胞积聚和炎性浸润,静脉内淤血减少。TDFE-M 组比 TDFE-L 组略有改善,TDFE-H 组和 Aspirin 组差异不明显。

2.6 各组小鼠尾巴病理组织学形态

如图 5 所示,Control 组小鼠血管结构清晰可辨,肌肉组织完整。Model 组小鼠尾静脉血栓明显,真皮层血管内也可见大量血栓。与 Model 组相比,TDFE-L、TDFE-M、TDFE-H 组及 Aspirin 组血栓均有不同程度减轻,TDFE 剂量越高,效果越明显,且 TDFE-H 组与 Aspirin 组差异不明显。

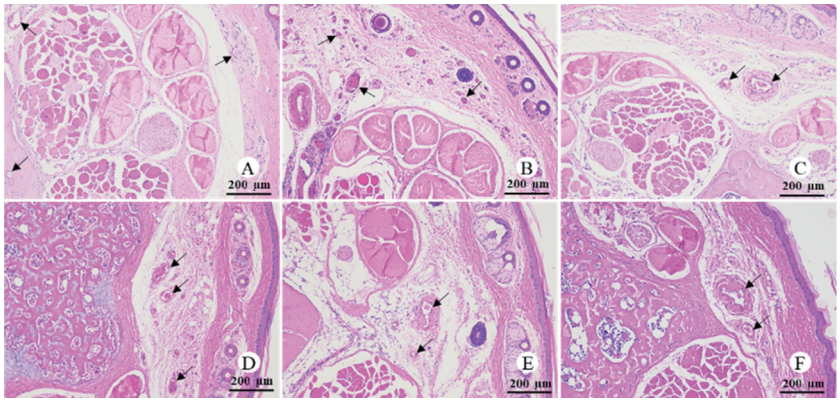


图 5 各组小鼠尾部组织 HE 染色结果

Fig. 5 HE staining results of tail tissues of mice in each group

A. Control;B. Model;C. Aspirin;D. TDFE-L;E. TDFE-M;F. TDFE-H.

图中箭头所指为静脉血管。Arrows in the diagram refer to the venous vessels.

2.7 TDFE 主要化学成分分析

采用 UPLC-MS 技术对 TDFE 进行化学成分分析,共鉴定出 260 个化合物。基于峰面积归一化法计算,相对含量大于 1.00%的化合物有 19 种(表 7)。主要可归为以下 3 大类:脂肪酸类,占比 36.51%,以戊酸、α-亚麻酸、棕榈酸、硬脂酸为主;苯丙素类,占比 18.10%,包括异香兰素、丁香酚等;杂环化合物及其他类,占比 15.76%,以烟酸、香芹酮等为代表。据相关文献报道,α-亚麻酸不仅可直接抑制血栓形成,还具有

表 7 TDFE 中的主要化学成分

Table 7 Main chemical components in TDFE

化合物 Compound	保留时间/min Retention time	离子模式 Ionic mode	分子离子峰 Molecular ion peaks	碎片离子 Fragment ions	误差/ppm Deviation	分子式 Molecular formula	相对含量/% Relative content
戊酸 Valeric acid	6.083	NEG	102.094 6	101.060 2	1.11	$C_5H_{10}O_2$	11.68
α-亚麻酸 α-linolenic acid	7.351	NEG	278.426 2	277.216 2	0.46	$C_{18}H_{30}O_2$	11.61
吡咯-2-羧酸 Pyrrole-2-carboxylic acid	6.399	POS	125.111 0	110.059 3	0.99	$C_5H_5NO_2$	7.27
异香兰素 Isovanillin	9.044	POS	152.104 8	152.069 8	0.05	$C_8H_8O_3$	6.31
丁香酚 Eugenol	15.310	POS	164.190 0	164.092 0	0.06	$C_{10}H_{12}O_2$	5.72
丙戊酸 Valproic acid	7.265	POS	144.211 0	144.047 0	0.12	$C_8H_{16}O_2$	3.96
棕榈酸 Palmitic acid	7.982	NEG	256.432 0	255.231 8	0.49	$C_{16}H_{32}O_2$	3.24
烟酸 Nicotinate	6.145	POS	123.111 0	124.038 6	0.80	$C_6H_5NO_2$	3.19
异丁香酚 Isoeugenol	12.070	NEG	164.190 0	164.044 8	0.10	$C_{10}H_{12}O_2$	2.49
千里光酸 Senecioic acid	8.074	POS	100.115 0	100.075 0	0.04	$C_5H_8O_2$	2.30
对羟基苯乙酮 4′-hydroxyacetophenone	5.195	NEG	136.157 1	135.044 5	0.86	$C_8H_8O_2$	2.24
(+)-(*S*)-香芹酮 (+)-(*S*)-carvone	12.607	NEG	150.222 2	149.060 1	0.81	$C_{10}H_{14}O$	1.77
1,3-二棕榈酸-2-山梨酸-甘油三酯 Glyceride-1,3-dipalmito-2-sorbate	16.500	POS	712.060 0	713.450 3	0.35	$C_{42}H_{78}O_8$	1.57
硬脂酸 Stearic acid	10.326	NEG	284.447 0	283.263 0	0.45	$C_{18}H_{36}O_2$	1.47
3-甲氧基酪胺 3-methoxytyramine	3.064	NEG	167.215 4	166.050 3	0.72	$C_9H_{13}NO_2$	1.34
2-羟基-3-甲基丁酸 2-hydroxy-3-methylbutyric acid	5.468	NEG	118.130 0	117.055 1	0.96	$C_5H_{10}O_3$	1.33
3-羟基-2-甲基吡啶 3-hydroxy-2-methylpyridine	1.803	NEG	109.125 0	108.045 0	1.05	C_6H_7NO	1.23
羟基异己酸 Hydroxyisocaproic acid	4.157	NEG	132.167 8	131.070 8	0.87	$C_6H_{12}O_3$	1.13
十一酸 Undecanoic acid	11.229	NEG	186.290 0	185.153 9	0.65	$C_{11}H_{22}O_2$	1.00

注:POS 为正离子模式,NEG 为负离子模式。

Note:POS is the positive ion mode,NEG is the negative ion mode.

心血管保护及抗炎活性[12]；异香兰素[13]、丁香酚[14]等亦具有抗炎活性；烟酸[15]具有抗炎及扩张血管作用等。基于上述研究和文献报道，推测 TDFE 中的 α-亚麻酸、异香兰素等化合物可能通过多靶点对凝血-炎症-纤溶网络进行调控，进而发挥抑制血栓形成的作用。

2.8　TDFE 抗血栓的网络药理学分析

如图 6 所示，采用网络药理学方法系统分析了 TDFE 抗血栓的作用机制。从 156 个药物靶点与 1 205 个血栓靶点中筛选出 46 个交集靶点（图 6-A），构成后续分析的基础数据集。这些交集靶点经蛋白互作



图 6　TDFE 主要化学成分的抗血栓网络药理学分析

Fig. 6　Antithrombotic network pharmacological analysis of main chemical constituents in TDFE

A. 与血栓交集靶点 Intersection targets with thrombosis；B. 抗血栓核心靶点 Antithrombotic core targets；C. 抗血栓的核心靶点 KEGG 通路富集分析气泡图 Bubble plot of KEGG pathway enrichment analysis for antithrombotic core targets；D. 抗血栓的核心靶点 GO 富集条形图 GO enrichment bar graph of antithrombotic core targets；E. TDFE“活性成分-核心靶点-通路”图 “Active ingredient-core target-pathway” diagram of TDFE.

分析(图6-B)发现,以IL-6为核心枢纽,与MYC(骨髓细胞瘤癌基因)、PTGS2(前列腺素内过氧化物合酶2)、ICAM-1(细胞间黏附因子1)、PPARG(过氧化物酶体增殖激活受体γ)等形成紧密的互作网络。

进一步将上述靶点进行通路富集,结果(图6-C)显示,它们主要富集于VEGF和AGE-RAGE信号通路,提示IL-6等核心靶点可能通过调控这些通路发挥作用。与此同时,GO功能注释结果(图6-D)表明,这些靶点还参与miRNA转录调控等生物过程,从转录层面补充了靶点的功能特征。最终构建的靶点-通路网络(图6-E)表明,TDFE中丁香酚、α-亚麻酸、烟酸和异香兰素等活性成分,通过作用于IL-6、KDR(激酶插入结构域受体)、SRC(原癌基因酪氨酸蛋白激酶Src)等核心靶点,最终作用于"脂质与动脉粥样硬化通路"等信号通路,形成了"药物-活性成分-核心靶点-信号通路"四级血栓调控网络。

3 讨论与结论

血栓模型是研究心血管疾病的重要病理模型。本研究选用角叉菜胶诱导的小鼠尾部血栓模型,因其血栓发生在尾部,可方便观察和测量血栓的程度。本试验中Model组小鼠血栓发生率为100%,表明模型成功建立。

本研究发现,丹参内生细菌 *Bacillus* sp. TD16发酵提取物TDFE可显著缩短小鼠角叉菜胶诱导形成的鼠尾静脉血栓长度,表现出了防治血栓的效果。在血栓性疾病的治疗过程中常用凝血4项来监测凝血指标。其中APTT是内源性凝血途径筛查指标,PT是外源性凝血途径筛查指标[16],TT是共同凝血途径筛查指标[17],FIB是一种具有凝血功能的急性反应蛋白[18]。本研究中,角叉菜胶处理后小鼠的APTT、PT、TT显著缩短,FIB含量大幅增加,表明机体处于高凝的异常状态。而Aspirin和TDFE处理后可有效改善这一状态,反映了它们在凝血与纤溶调节中的积极作用。TDFE的效果呈剂量依赖性,表明TDFE可同时抑制内源性和外源性凝血途径,通过抑制凝血酶生成及激活纤溶系统起到抗血栓作用。

炎症介导了血栓的形成与发展,而角叉菜胶能使局部血流降低并诱导组织释放大量的炎性物质,破坏正常血管内皮细胞维持血凝与纤溶系统之间的平衡关系[10],促进血栓形成。在IL-1β的刺激下,白细胞迁移至炎症区域,促进血栓形成[18]。TNF-α是由活化的单核细胞、巨噬细胞产生的一种强烈促炎症因子[19],可促进血栓形成,同时IL-1β和TNF-α还可促进IL-6的释放,影响血栓的发展。本试验中使用角叉菜胶后,小鼠血浆中IL-6、IL-1β和TNF-α浓度显著升高,而Aspirin和TDFE处理可以降低各炎症因子的水平,显示出TDFE在减轻炎症反应方面的潜力。

血栓烷A_2(TXA_2)是很强的血小板聚集激活剂[20],它能够引起血小板聚集和促进血管收缩,但其半衰期仅30 s,故采用检测其稳定水解产物TXB_2来推测TXA_2含量[21]。t-PA、PAI-1主要由内皮细胞产生,是衡量纤溶系统的重要指标,如果二者之间的平衡遭到破坏,将引发血栓的形成。t-PA主要是诱导纤维蛋白降解,PAI-1是纤溶酶原活化物抑制物,其主要是抑制t-PA作用。本试验结果显示,使用角叉菜胶处理后小鼠血液t-PA浓度降低,TXB_2和PAI-1浓度显著升高,提示其纤溶功能受抑制。Aspirin和TDFE组小鼠的t-PA浓度上升,而TXB_2和PAI-1浓度明显下降,纤溶功能得以恢复,表明TDFE可通过调节纤溶系统来抑制血栓形成,其作用机制与Aspirin相似。

本研究中,Model组小鼠表现出明显的肝脏损伤,其肝功能指标及血脂水平呈现异常状态。Aspirin和TDFE组能有效改善肝脏功能,且随着TDFE剂量增加,肝功能指标及血脂水平逐渐接近Control组,表明TDFE对肝损伤及高血脂有一定的改善作用。TDFE的作用具有明显的剂量依赖性,表现出良好的脂质代谢调节能力。

UPLC-MS分析鉴定出TDFE中含丁香酚、α-亚麻酸、烟酸和异香兰素等19种主要化学成分。网络药理学分析结果表明,PPI网络筛选出的血栓治疗关键靶点为IL-6、PPARG、ICAM-1、MYC、PTGS2,这些靶点均参与炎症反应和脂质代谢过程。KEGG通路富集分析结果显示,TDFE抗血栓作用可能通过多通路协同实现,主要涉及脂质代谢和炎症相关通路。其中,"脂质与动脉粥样硬化通路"可能为核心通路,该通路可调节NF-κB、mTOR相关下游通路,进而参与防止血栓形成的调控过程。因此推测,TDFE中的丁香酚、α-亚麻酸、烟酸和异香兰素等成分可能通过调节NF-κB、mTOR相关的炎症及脂质代谢通路发挥抗血栓作用。

本研究证实,丹参内生细菌 *Bacillus* sp. TD16的发酵产物TDFE在50~200 $mg\cdot kg^{-1}$的剂量范围内,可通过多靶点调控凝血-炎症-纤溶网络,显著抑制角叉菜胶诱导的小鼠尾静脉血栓形成。经UPLC-MS分

析,α-亚麻酸、异香兰素等化合物可能是 TDFE 发挥抗血栓活性的物质基础。相较于传统抗血栓药物,TDFE 作为天然来源产物,具有安全性和独特的作用机制优势,有望开发成为新型的防治血栓药物。

参考文献 References:

[1] 黄攀登,董利平,吴佳宏,等. 贝前列素钠联合阿加曲班对老年动脉硬化闭塞症甲襞微循环及行走距离的影响[J]. 中国现代医学杂志,2023,33(1):82-87.
Huang P D,Dong L P,Wu J H,et al. Effects of Beraprostina combined with Argatroban on nailfold microcirculation and walking distance in elderly patients with arteriosclerosis obliterans[J]. China Journal of Modern Medicine,2023,33(1):82-87(in Chinese with English abstract).

[2] 郑佳莉,应珂,许丽萍,等. 新型磺酰胺类化合物 SZ427 的抗血小板聚集作用[J]. 沈阳药科大学学报,2017,34(2):164-168.
Zheng J L, Ying K, Xu L P, et al. Effect of new sulfonamide compounds SZ427 on antiplatelet aggregation [J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University,2017,34(2):164-168(in Chinese with English abstract).

[3] 徐晓薇,陈步星,魏欣,等. 达比加群酯在心房颤动患者经导管射频消融术围术期抗凝治疗中的安全性和有效性研究[J]. 中国全科医学,2016,19(22):2681-2685.
Xu X W,Chen B X,Wei X,et al. Safety and efficacy of dabigatran in anticoagulation therapy in the perioperative period of radiofrequency catheter ablation for patients with atrial fibrillation[J]. Chinese General Practice,2016,19(22):2681-2685(in Chinese with English abstract).

[4] 王松立,王睿峰,谢操,等. 血栓靶向递药系统研究进展[J]. 中国医药工业杂志,2018,49(7):885-892.
Wang S L,Wang R F,Xie C,et al. Research progress of thrombus targeted drug delivery system[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals,2018,49(7):885-892(in Chinese with English abstract).

[5] 周钱留,刘元恺,张媛媛,等. 口服抗血栓药物的不良反应及毒副作用研究进展[J]. 药学研究,2020,39(9):525-530,535.
Zhou Q L,Liu Y K,Zhang Y Y,et al. Advances on adverse reactions and toxic side effects of oral antithrombotic drugs[J]. Journal of Pharmaceutical Research,2020,39(9):525-530,535(in Chinese with English abstract).

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典　一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:407.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I[M]. Beijing:China Medical Science Press,2020:407(in Chinese).

[7] 靳锦,赵庆,张晓梅,等. 植物内生菌活性代谢产物最新研究进展[J]. 微生物学杂志,2018,38(3):103-113.
Jin J,Zhao Q,Zhang X M,et al. Research progress on bioactive products from endophytes[J]. Journal of Microbiology,2018,38(3):103-113(in Chinese with English abstract).

[8] 龚铃,刘贵金,张鑫,等. 血蛭康胶囊提取工艺优化及其体外抗凝、溶栓活性研究[J]. 中成药,2023,45(6):1969-1972.
Gong L,Liu G J,Zhang X,et al. Optimization of extraction process of Xuezhikang capsule and its anticoagulant and thrombolytic activities *in vitro*[J]. Chinese Traditional Patent Medicine,2023,45(6):1969-1972(in Chinese).

[9] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学,2004,9(9):1069-1072.
Huang J H,Huang X H,Chen Z Y,et al. Dose conversion among different animals and healthy volunteers in pharmacological study[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics,2004,9(9):1069-1072(in Chinese with English abstract).

[10] 韩子逸,沈诗怡,张金鑫,等. 角叉菜胶诱导的慢性血栓小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报,2021,29(1):78-84.
Han Z Y,Shen S Y,Zhang J X,et al. Preliminary establishment of chronic thrombus model in mice[J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica,2021,29(1):78-84(in Chinese with English abstract).

[11] 余华军,伍俊,吴尚,等. 麒麟菜多肽对血小板聚集及角叉菜胶诱导的小鼠尾部血栓形成的影响[J]. 解放军医学杂志,2018,43(2):96-100.
Yu H J,Wu J,Wu S,et al. Effects of Eucheuma peptides on platelet aggregation and mouse tail thrombosis induced by carrageenan[J]. Medical Journal of Chinese PLA,2018,43(2):96-100(in Chinese with English abstract).

[12] 杜倩. 亚麻籽环肽 CLB 靶向调控 α-亚麻酸代谢协同抗心血管炎症的作用及机制研究[D]. 南昌:南昌大学,2024.
Du Q. Study on the synergistic anti-cardiovascular inflammatory effects and mechanism of flaxseed cyclipeptides CLB targeting the regulation of alpha-linolenic acid metabolism[D]. Nanchang:Nanchang University,2024(in Chinese with English abstract).

[13] 陈永柱,周希志,郭亚明,等. 鹿筋的常温浸提工艺与化学成分分析及提取物抗炎镇痛活性研究[J]. 中草药,2024,55(18):6186-6195.
Chen Y Z,Zhou X Z,Guo Y M,et al. Study on extraction process of deer sinew at room temperature,chemical composition analysis,and anti-inflammatory and analgesic activities of extract[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs,2024,55(18):6186-6195(in Chinese with English abstract).

[14] 刘旭,潘寅川,杨亚军,等. 阿司匹林丁香酚酯对体外脂多糖诱导小鼠巨噬细胞炎症反应的抑制效应[J]. 畜牧兽医学报,2022,53(11):4048-4057.
Liu X,Pan Y C,Yang Y J,et al. Inhibiting effect of aspirin eugenol ester on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in mouse macrophages *in vitro*[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica,2022,53(11):4048-4057(in Chinese with English abstract).

[15] 龙凡,梅文亮,许兰娇,等. 烟酸的生物学功能及其在畜禽生产中的应用[J]. 动物营养学报,2022,34(7):4143-4154.
Long F,Mei W L,Xu L J,et al. Biological functions of niacin and its application in livestock and poultry production[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition,2022,34(7):4143-4154(in Chinese with English abstract).

[16] 林晓坚,袁兆伟,潘彩燕,等. 红景天苷对小鼠抗血小板活性和抗血栓作用[J]. 贵州医科大学学报,2019,44(9):1039-1043,1048.
Lin X J,Yuan Z W,Pan C Y,et al. Experimental study on aantithrombotic effect of salidroside[J]. Journal of Guizhou Medical University,2019,44(9):1039-1043,1048(in Chinese with English abstract).

[17] Ma C L,Yang L,Wang L H. Correlation of serum C-peptide,soluble intercellular adhesion molecule-1,and NLRP3 inflammasome-related inflammatory factor interleukin-1 β after brain magnetic resonance imaging examination with cerebral small vessel disease[J]. Contrast Media & Molecular Imaging,2022,2022:4379847.

[18] 苟园园,姚隆,曹洁. 高甘油三酯血症性急性胰腺炎凝血指标与*D*-二聚体水平变化及其预测疾病严重程度的价值[J]. 中南大学学报(医学版),2023,48(7):1050-1058.
Gou Y Y,Yao L,Cao J. Changes in coagulation indices and *D*-dimer levels in hypertriglyceridemic acute pancreatitis and their value in predicting disease severity[J]. Journal of Central South University(Medical Science),2023,48(7):1050-1058(in Chinese with English abstract).

[19] 陆旭. 肿瘤坏死因子-α 通过影响激活转录因子 2 上调 Rhcg 表达致脑氨升高引起脑水肿的机制研究[D]. 沈阳:中国医科大学,2023.
Lu X. The mechanism of tumor necrosis factor-α up-regulation of Rhcg expression by activating transcription factor 2 resulting in elevated cerebral ammonia and cerebral edema[D]. Shenyang:China Medical University,2023(in Chinese with English abstract).

[20] Murphy P T,Grace S,Glavey S,et al. Rivaroxaban may increase platelet activation *in vivo* via thromboxane A2[J]. Circulation Research,2019,125(2):e9.

[21] 彭文绣,陈健华,梅丹,等. 阿司匹林抵抗的研究现状及工作启示[J]. 中国药学杂志,2017,52(14):1285-1290.
Peng W X,Chen J H,Mei D,et al. Brief analysis of aspirin resistance and its implications[J]. Chinese Pharmaceutical Journal,2017,52(14):1285-1290(in Chinese with English abstract).

责任编辑:范雪梅