

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2024.80536

水飞蓟提取物对大鼠的 28 d 经口毒性

姬海南¹ 赵 潺¹ 林子君² 佟 娜² 陈博文³ 周时蒙³
刘鸣畅¹ 沈国林¹ 张梦玲¹

(1. 中国检验检疫科学研究院化学品安全研究所, 北京 100176; 2. 国家市场监督管理总局食品审评中心, 北京 100022; 3. 中国检验检疫科学研究院综合检测中心, 北京 100176)

摘要: [目的] 评价水飞蓟提取物对大鼠的 28 d 经口毒性。[方法] 采用 SD 大鼠作为模式动物, 研究水飞蓟提取物对大鼠体重及器官系数、生化指标、血常规及凝血指标、肝脏病理的影响并探讨其安全性。[结果] 水飞蓟提取物对大鼠体重及器官系数、生化指标、血常规及凝血指标、肝脏病理学均无不利影响。水飞蓟提取物干预可能通过调节大鼠血浆氨基酸代谢信号通路以及肝脏核黄素代谢、淀粉和蔗糖代谢、鞘脂代谢信号通路, 促进大鼠机体健康。[结论] 在试验研究的剂量和条件下, 水飞蓟提取物安全性好。

关键词: 水飞蓟; 毒性研究; 肝脏; 血浆; 代谢组学

The 28-day oral toxicity of the extract of *Silybum marianum* in rats

Ji Hainan¹ ZHAO Chan¹ LIN Zijun² TONG Na² CHEN Bowen³ ZHOU Shimeng³
LIU Mingchang¹ SHEN Guolin¹ ZHANG Mengling¹

(1. Institute of Chemicals Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;
2. Center for Food Evaluation, State Administration for Market Regulation, Beijing 100022, China;
3. Comprehensive Testing Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to assess the 28-day oral toxicity of *Silybum marianum* extract in rats. [Methods] SD rats were administered *S. marianum* extract, and effects on body weight, organ coefficients, biochemical indicators, blood routine and hemagglutination indicators, and liver pathology were evaluated to determine safety. [Results] *S. marianum* extract showed no adverse effects on body weight, organ coefficients, biochemical indicators, blood routine and coagulation indicators, or liver pathology. Additionally, *S. marianum* extract appeared to positively influence pathways related to plasma amino acid metabolism, liver riboflavin metabolism, carbohydrate metabolism, and sphingolipid metabolism, contributing to overall health benefits in rats. [Conclusion] *S. marianum* extract was deemed safe Under the dosage and conditions of this study.

Keywords: *Silybum marianum*; toxicity studies; liver; plasma; metabolomics

水飞蓟 (*Silybum marianum* L. Gaert.) 为菊科水飞蓟属植物, 以干燥成熟的果实入药, 性味苦、凉, 具有清热解毒、疏肝利胆等功效^[1]。水飞蓟中含有水飞蓟素, 其为黄酮木脂素的混合物, 主要含有水飞蓟宾, 以及水飞蓟碱、水飞蓟宁、槲皮素和花旗松素, 其中水飞蓟宾的生物活性最高, 约占水飞蓟素的 50%~70%^[2]。水飞蓟素具有抗氧化、降脂、抗高血压、抗糖尿病、抗动脉粥样硬化、抗肥胖、保肝和抗癌功效^[3-7]。

近年来, 水飞蓟提取物被逐渐应用于保健食品领域, 除了保肝作用外, 还具有抗骨质疏松、抗阿尔茨海默病、抗帕金森病和抗糖尿病的作用, 因此其安全性非常重要。水飞蓟宾、水飞蓟宁和水飞蓟汀在 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下不具有细胞毒性和遗传毒性^[8]。在大鼠孕期和哺乳期间服用水飞蓟素不会显著改变后代在初始发育和成年行为中的形态功能变化, 表明在妊娠和哺乳期间使用水飞蓟素是安全的^[9]。水飞蓟素可抑制噻虫嗪诱导的雄性大鼠神

基金项目: 国家市场监督管理总局化学品质量安全监测能力提升专项(编号: 2013810-24-004)

通信作者: 张梦玲(1991—), 女, 中国检验检疫科学研究院助理研究员, 博士。E-mail: zhangmengling1991@163.com

收稿日期: 2024-06-12 改回日期: 2024-09-01

经毒性,且未观察到任何副作用^[10]。水飞蓟素具有低药物相互作用,且对人体细胞色素P-450无不利影响,即使在700 mg的高剂量(每天3次,持续24周)下也具有良好的耐受性^[11]。水飞蓟干预对马来西亚非酒精性脂肪性肝患者的耐受性良好,未观察到毒性作用^[12]。综上,水飞蓟提取物的毒性评价主要集中在生理生化指标上,忽视了对其内在机制的探索。

代谢组学具有覆盖面广、灵敏度高、可重复性好的特点^[13]。目前,代谢组学可通过研究植物提取物干预对生物内源性代谢谱的变化来探索植物提取物毒性及其内在机制,在植物提取物毒性评价中具有独特优势^[14]。生物体内源性代谢物的整体变化是代谢途径中所有相关基因表达或相关酶活性变化的最终体现,而生物体内源性代谢物的整体变化与生物体的生理状态直接相关^[15]。但目前有关代谢组学在水飞蓟提取物毒性评价中的应用尚未见报道。研究拟通过生化指标、血常规、血凝、肝脏病理学、血浆及肝脏代谢组学角度评价水飞蓟提取物干预大鼠28 d经口毒性,旨在为水飞蓟提取物作为保健食品原料的安全性提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物、试剂及仪器

SD雄性大鼠:50~100 g, SPF级,北京维通利华实验动物技术有限公司;

水飞蓟提取物:由水飞蓟籽榨油后90%乙醇提取精制而成;

无水乙醇:分析纯,天津市化学试剂三厂;

甲酸、甲酸铵:分析纯, Sigma-Aldrich公司;

甲醇、乙腈:色谱纯,德国Fisher公司;

高分辨质谱仪:QE-Orbitrap型,美国Thermo公司;

超高效液相色谱仪:DIONEX Ultimate 3000型,美国Thermo公司;

高速冷冻离心机:Micro CL 21R型,美国Thermo公司;

扫片机:Proscanner APro 5型,澳大利亚Amos Scientific Pty公司。

1.2 试验方法

1.2.1 水飞蓟提取物样品处理 称取100 mg样品,加入5倍50%甲醇溶液超声溶解,10 000 r/min离心10 min,吸取上清50 μ L,其他步骤参照文献[16]。

1.2.2 水飞蓟提取物全成分分析 参照文献[16]。

1.2.3 水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾A、水飞蓟宾B、异水飞蓟宾A、异水飞蓟宾B及花旗松素定量检测 色谱条件:A为水(含2 mmol/L甲酸铵和0.1%甲酸),D为甲醇;梯度洗脱程序:0~1.5 min,15%~40% D;1.5~8.0 min,40% D;8.0~8.1 min,40%~15% D;8.1~10.0 min,15% D;分析时间10.0 min,每次进样5 μ L,流速0.25 mL/min,色谱柱为

ACQUITY BEH C₁₈(1.7 μ m, 2.1 mm \times 50 mm),色谱柱温度30 $^{\circ}$ C,自动进样器温度4 $^{\circ}$ C。在电喷雾离子源(ESI)负离子PRM模式下采集数据,喷雾电压(-)2 800 V;蒸发温度350 $^{\circ}$ C;鞘气压40 Arbitrary;辅助气压10 Arbitrary;毛细管温度320 $^{\circ}$ C;S-lens RF:50。水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾A、水飞蓟宾B、异水飞蓟宾A、异水飞蓟宾B(-):481.114 02/125.024 17,花旗松素(-):303.051 03/125.024 17,甲苯磺丁脲(IS):269.096 54/170.197 91。

1.2.4 动物分组及处理 SD雄性大鼠适应性喂养3~5 d,完成动物检疫,确认动物健康后开展试验。动物饲养条件:温度20~26 $^{\circ}$ C,相对湿度40%~70%,光照12 h,明暗交替。试验前禁食24 h,自由饮水。

水飞蓟提取物推荐人体食用量为0.5 g/(60 kg \cdot BW \cdot d)(以提取物计算),根据GB 15193.22—2014,设置低、中、高剂量组分别为0.21、0.42、0.83 g/kg \cdot BW,分别相当于人体推荐摄入量的25、50、100倍,另设溶剂对照组。每组12只,灌胃给药,连续4周。正常对照组给予等体积的生理盐水。给药期间试验大鼠自由摄取食物和饮水,末次给药24 h后,大鼠经麻醉后取血放置于预放肝素钠的离心管中,5 000 r/min离心10 min,取部分血浆冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱,部分血浆用于血液学和生化指标检测,然后通过二氧化碳吸入法剖杀大鼠收集样本。收集大鼠的肝脏、肾脏、脾脏、睾丸、心脏、脑、肺称重后,一部分采用4%多聚甲醛常温固定;另一部分立即放于液氮中,随后转移至-80 $^{\circ}$ C保存。

1.2.5 生化指标分析 参照滑志民等^[17]的方法略修改。灌胃水飞蓟提取物4周后,收集血液,离心后得到血清。采用全自动生化仪检测血清中酶类生化指标(谷丙转氨酶、谷草转氨酶、谷氨酰转氨酶、碱性磷酸酶)及非酶类生化指标(甘油三酯、总胆固醇、葡萄糖、总蛋白、白蛋白、肌酐、尿酸氮)水平。采用电解质分析仪检测血清中电解质类检测指标(钠、钾、氯)水平。

1.2.6 血常规分析 参照杨森等^[18]的方法略修改。灌胃水飞蓟提取物4周后,收集血液。采用血细胞分析仪检测全血中白细胞、红细胞、血红蛋白、红细胞比容、血小板、中性粒细胞、淋巴细胞水平。

1.2.7 血凝分析 参照徐艳芳等^[19]的方法略修改。灌胃水飞蓟提取物4周后,收集血液。采用半自动血凝分析仪检测全血的活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间。

1.2.8 肝脏H&E染色 参照文献[20]。

1.2.9 血浆和肝脏代谢组学分析 采用超纯水(含50%甲醇),按 $m_{\text{样品}}:V_{\text{超纯水}}$ 为1:10(g/mL)将大鼠肝脏样品进行匀浆,取血浆和肝脏匀浆液50 μ L,加入450 μ L含内标($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}=1:1$)的沉淀剂,涡旋混匀60 s,13 000 r/min离心10 min,吸取100 μ L,采用高分辨质谱仪进行检测^[20]。

1.2.10 数据统计 参照文献[21]的方法略修改,所有试验均进行 3 次及 3 次以上的独立试验,结果表示为平均值±标准差。使用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行统计分析。为了进行统计比较,先评估数据是否呈正态分布,再对正态分布数据进行方差齐性分析,若数据通过方差齐性检验,则进行两组比较的 *t* 检验和方差分析。若数据不呈正态分布,使用非参数检验。所有情况下,双尾概率 $P < 0.05$ 为统计差异显著。

2 结果与分析

2.1 成分分析

由图 1 和图 2 可知,水飞蓟提取物中含有水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾 A、水飞蓟宾 B、异水飞蓟宾 A、异水飞蓟宾 B、花旗松素。水飞蓟提取物中异水飞蓟宾 B 含量最高,其他依次为水飞蓟宁、水飞蓟亭、异水飞蓟宾 A、水飞蓟宾 A、异水飞蓟宾 B 和花旗松素。

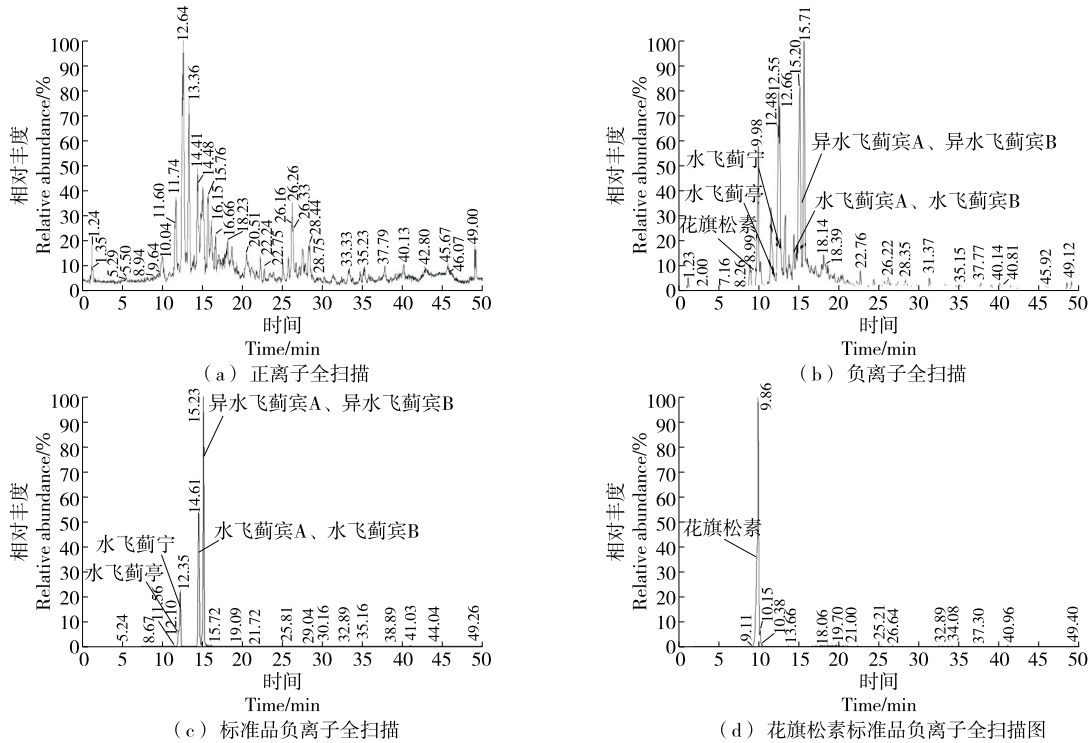


图 1 水飞蓟提取物全成分分析

Figure 1 Complete component analysis of *S. manalttlm* extract

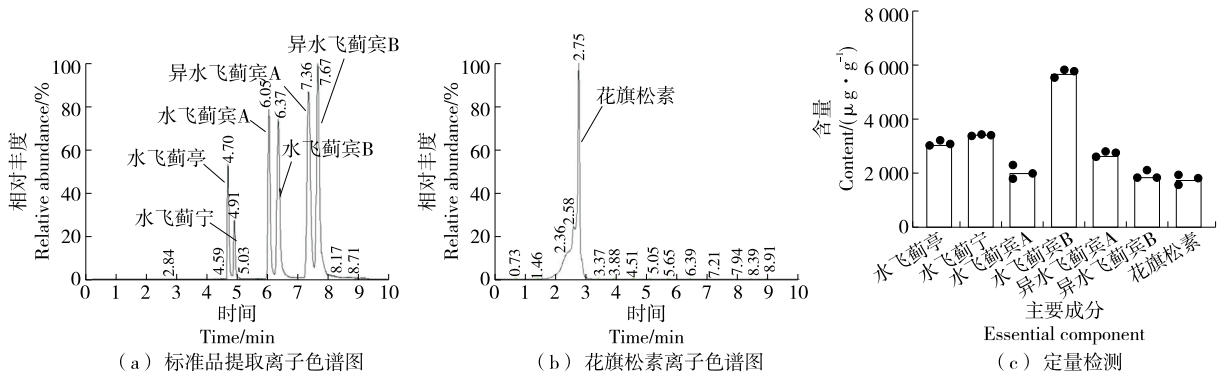


图 2 水飞蓟提取物成分分析

Figure 2 Composition analysis of *S. manalttlm* extract

2.2 对大鼠体重及器官系数的影响

大鼠基因组中约包含 25 000 个基因,其中 90% 的基因与

人类的相匹配。与小鼠相比,大鼠在进行试验操作时更容易处理、表现出更少的应激反应、生理学特征明显^[22]。体重及器

官系数是表征机体健康状态的最直观指标,其异常与干预物质的副作用密切相关^[23]。由图3可知,对照组、低、中、高剂量

水飞蓟组之间的体重及各器官系数(肝脏、肾脏、脾脏、睾丸、心脏、脑、肺)无显著性差异,与韩超等^[24]的研究结果一致。

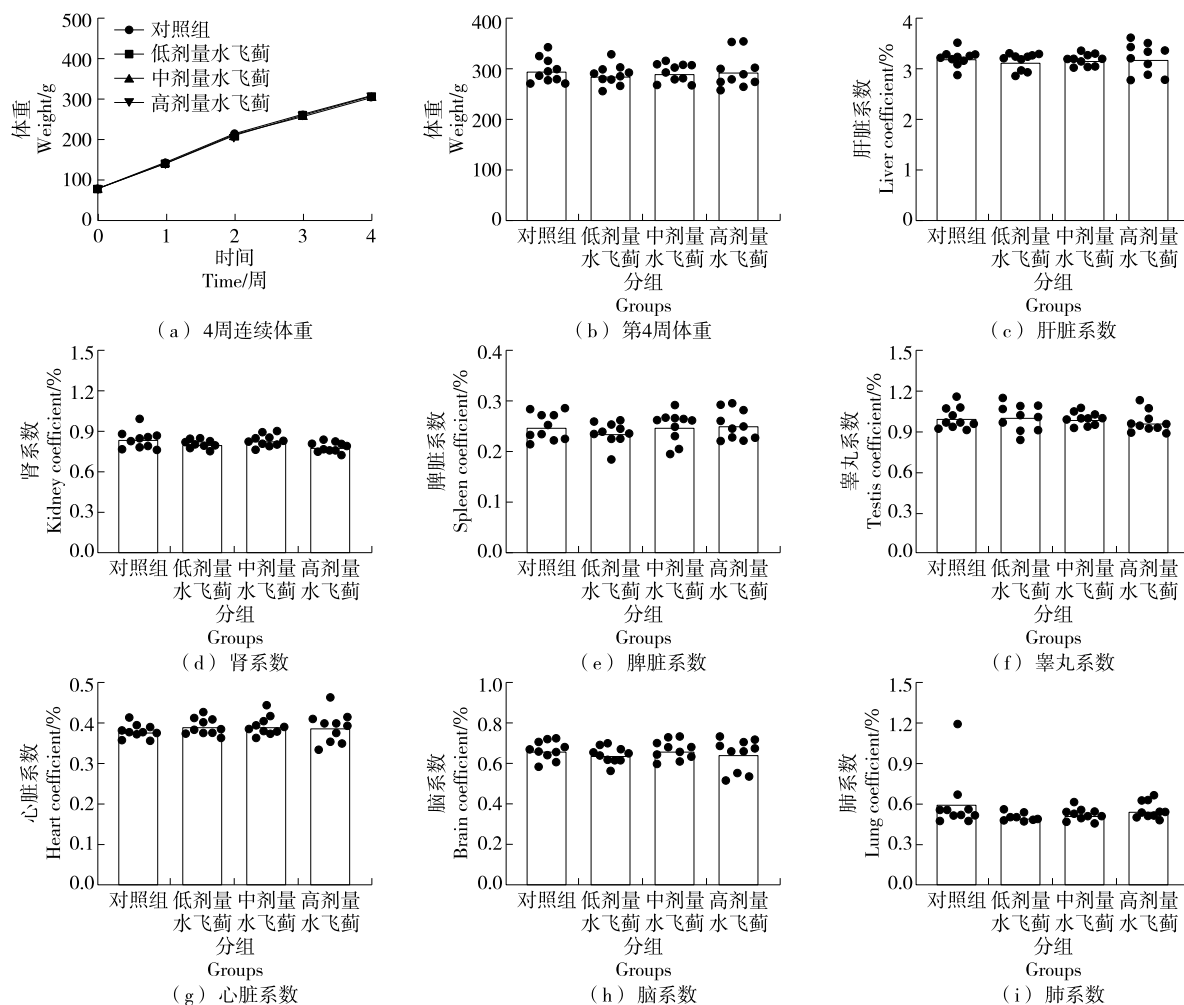


图3 水飞蓟提取物对大鼠体重及器官系数的影响

Figure 3 The effect of *S. manalttm* extract on body weight and organ coefficients in rats

2.3 对大鼠生化指标的影响

生化指标通常用来检测和反映碳水化合物、脂类、蛋白质、尿液、肝胆、心血管、胃肠道的代谢,对毒性病理学靶器官的确定具有重要的参考价值和解释意义^[25]。由图4可知,与对照组相比,低、中、高水飞蓟提取物组对酶类生化指标(谷丙转氨酶、谷草转氨酶、谷氨酰转氨酶、碱性磷酸酶)、非酶类生化指标(甘油三酯、总胆固醇、葡萄糖、总蛋白、白蛋白、血肌酐、尿酸氮)及电解质类检测指标(钠、钾、氯)均无显著性差异,与文献^[26-28]的研究结果一致。

2.4 对大鼠血常规及凝血的影响

由图5可知,与对照组相比,中、高剂量水飞蓟提取物可显著增加红细胞、血红蛋白及红细胞比容。与对照组相比,所有干预剂量的水飞蓟提取物均未改变白细胞、血小板、中性粒细胞、淋巴细胞、活化部分凝血活酶时间及及

凝血酶原时间。红细胞、血红蛋白、红细胞比容增加分为生理性增加及病理性增加两种情况。高原生活、运动及生活习惯改变是引起生理性增加的主要原因,可自行改善;成人先天性心脏病、慢性阻塞性肺疾病、心力衰竭、肺纤维化等是引起病理性增加的主要原因,需重点关注^[29-30]。综上,水飞蓟干预引起的大鼠红细胞、血红蛋白及红细胞比容变化为生理性的。

2.5 对大鼠肝脏病理结构的影响

组织病理学评估是物质非临床安全性评价工作中的重要环节,是确定物质潜在毒性的“金标准”^[31-32]。由图6可知,所有试验组肝脏组织细胞质保存完好,细胞核和核仁突出,中央静脉清晰可见,肝细胞整齐分布在中心静脉周围,细胞排列整齐;未发现弥漫性的泡沫样及气球样脂肪变性。

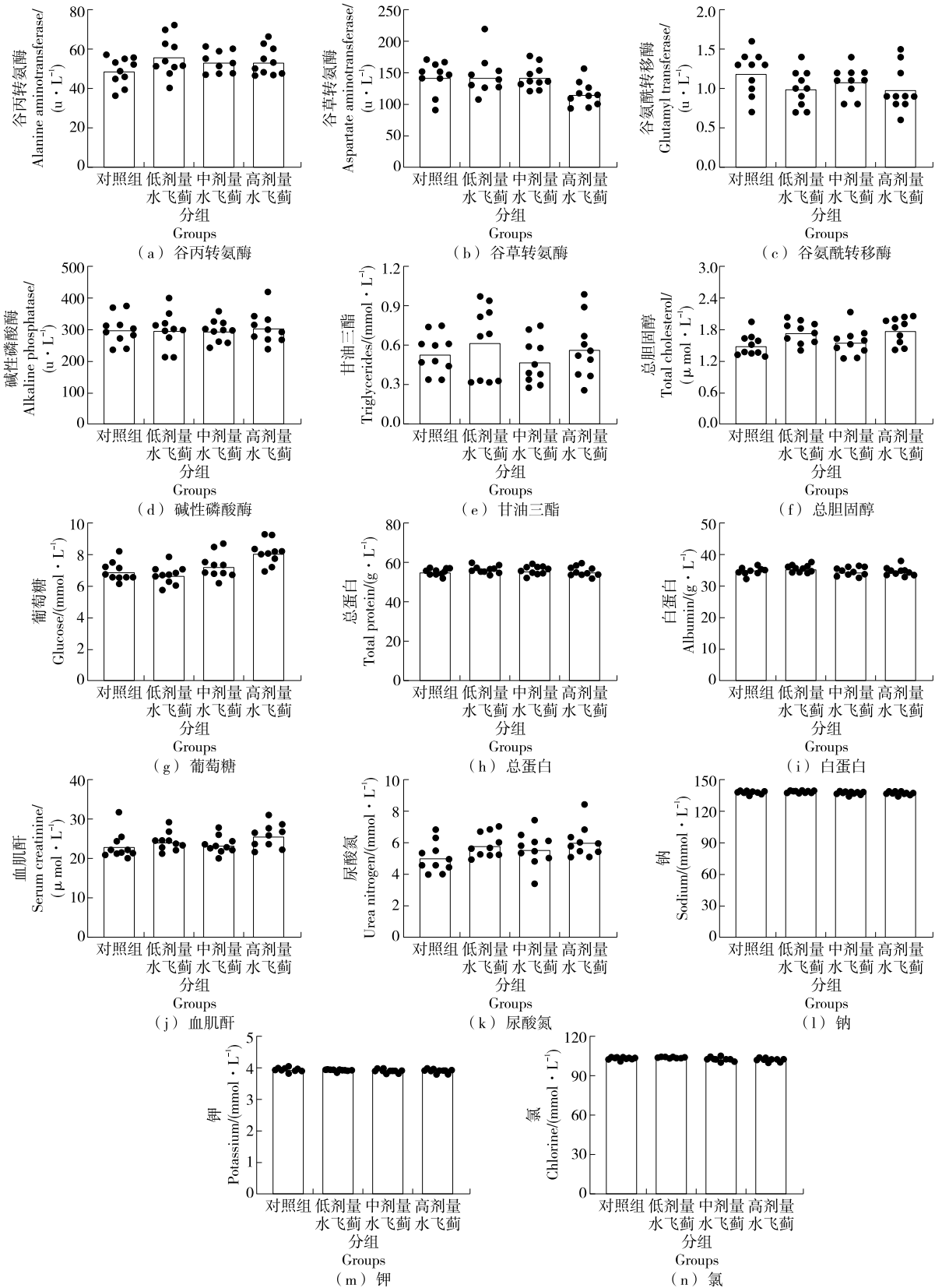


图 4 水飞蓟提取物对大鼠生化指标的影响

Figure 4 The effect of *S. manalttm* extract on biochemical indicators in rats

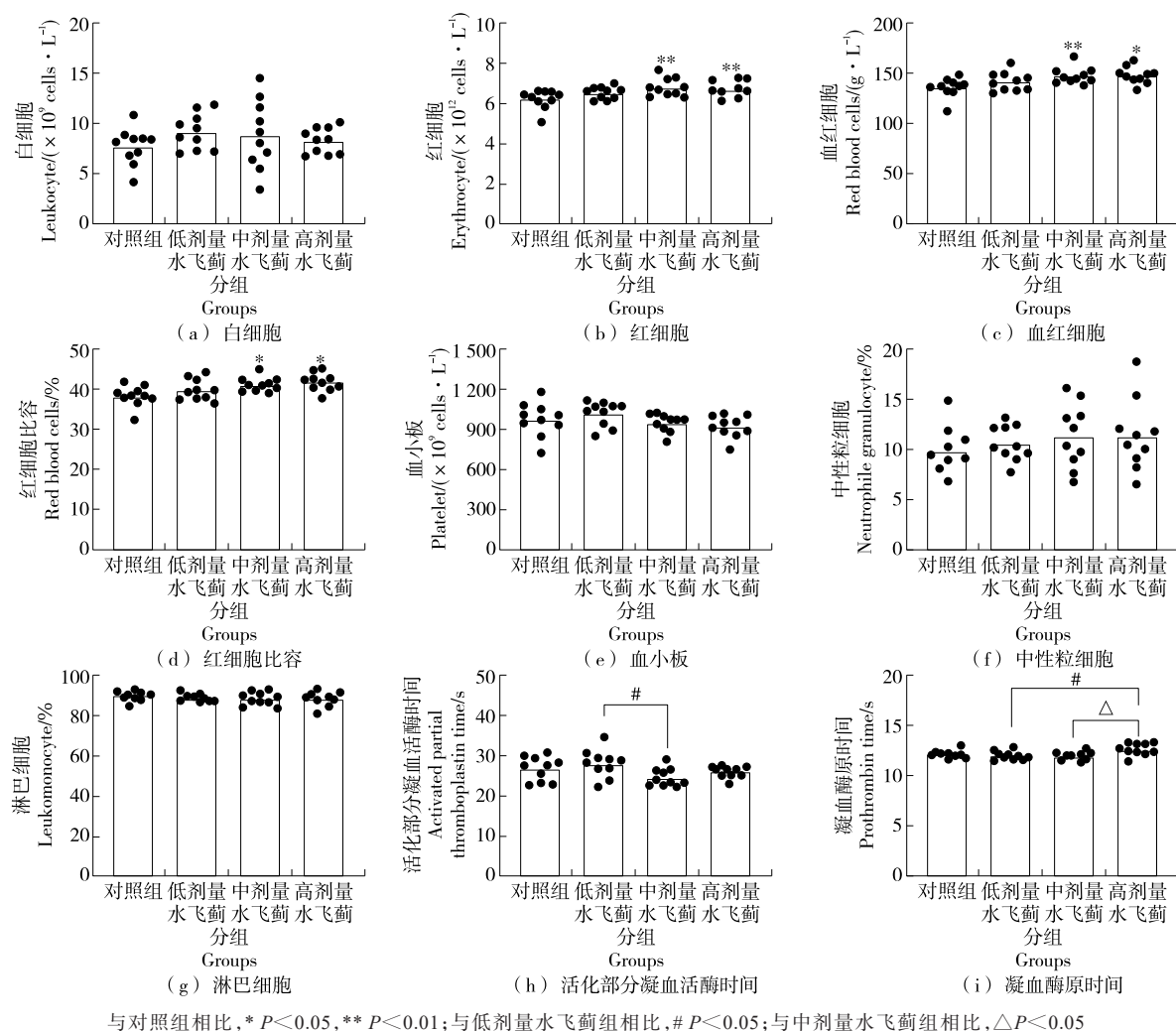


图5 水飞蓟提取物对大鼠血常规及凝血的影响

Figure 5 The effect of *S. manaltlm* extract on blood parameters and blood coagulation in rats

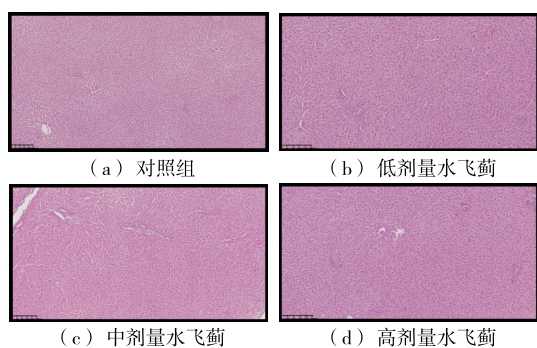


图6 水飞蓟提取物对大鼠肝脏病理结构的影响

Figure 6 The effect of *S. manaltlm* extract on the pathological structure of rat livers

2.6 对大鼠血浆代谢组学的影响

根据文献[33],利用Metaboanalyst 5.0中的Statistical Analysis模块计算PCA和PLS-DA。由图7(a)和图7(b)

可知,对照组和水飞蓟提取物不同剂量组之间均能彻底分开,模型参数:精确度为0.575, $R^2=0.93749$, $Q^2=0.8042$,通过PLS-DA方法对各组的代谢物差异进行分析,选择VIP>1的内源性物质进一步分析水飞蓟提取物对血浆代谢通路的影响,结果见表1。由表1可知,血浆中内源性代谢物VIP>1的共48种,其中有25种内源性物质比例上升,18种下降,说明水飞蓟提取物可影响大鼠血浆内源性物质的代谢分泌。

进一步利用MetaboAnalyst5.0网站分析水飞蓟提取物对血浆内源性物质相关代谢通路的影响,结果见表2。由表2可知,在所富集的通路中,共有11条信号通路的影响因子>0.1。排名前3的信号通路为苯丙氨酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,组氨酸代谢,均为氨基酸代谢途径。说明水飞蓟提取物给药28 d后,主要影响大鼠血浆氨基酸的合成和代谢,从而导致大鼠血浆中内源性物质含量变化。氨基酸对于机体代谢、生物合成、

表 1 对照组和水飞蓟提取物处理组的血浆差异代谢物

Table 1 Differential metabolites in plasma between control group and the groups treated with *S. manalttlm* extract

代谢物	VIP	低剂量组比对照组	中剂量组比对照组	高剂量组比对照组
苯乙胺	6.080 9	79.1±39.9	131.6±53.3	97.0±47.7
组胺	6.028 4	78.6±30.9	55.1±21.9	46.6±16.3
	5.042 2	67.2±31.0	142.7±56.0	278.0±77.1
胞嘧啶	4.418 1	105.5±38.2	71.3±21.9	58.5±22.4
	4.129 1	519.4±124.4	590.0±106.4	730.5±107.4
肌酐	3.186 4	77.6±46.9	435.8±130.5	491.3±228.1
	3.049 7	85.2±14.4	104.3±17.2	396.8±269.4
	2.905 8	1 437.1±143.1	1 513.7±308.7	1 882.0±293.7
瓜氨酸	2.865 8	72.9±32.7	70.5±26.1	75.1±27.7
	2.830 1	127.9±31.7	132.5±51.4	176.3±44.3
硫酸胆固醇	2.710 2	225.7±83.9	253.1±66.9	336.4±109.4
植物鞘氨醇	2.520 3	82.1±25.2	112.1±25.2	318.4±201.4
硬脂酸	2.442 2	79.1±22.0	65.8±15.9	57.8±10.3
	2.438 0	103.3±13.3	125.1±9.9	127.8±14.8
	2.380 4	103.7±18.4	120.9±24.5	122.9±25.4
腺嘌呤	2.369 6	104.2±23.0	86.3±32.1	76.4±31.9
	2.321 3	89.6±11.0	106.5±24.5	142.9±29.4
烟酰胺	2.321 1	116.1±22.8	133.5±19.6	157.7±25.1
3-甲基-2-氧代丁酸	2.293 3	71.9±14.4	44.2±21.4	24.9±5.0
	2.219 6	115.0±29.5	131.7±15.8	141.9±33.7
	2.212 5	87.7±11.1	81.2±22.7	79.9±7.9
	2.155 5	123.2±42.8	144.9±41.5	202.7±56.6
	2.146 3	109.0±50.0	163.8±28.4	171.5±47.6
L-缬氨酸	2.045 8	93.5±12.0	110.4 ±12.3	102.9±20.5
胸腺嘧啶	1.791 4	78.7±21.2	67.3±35.3	60.3±27.9
	1.751 8	128.0±47.1	163.0±26.3	175.9±19.3
	1.717 8	1 503.4±149.3	1 451.7±253.1	2 079.7±206.5
	1.699 7	105.6±27.2	130.5±25.4	132.3±32.7
9-氧代壬酸	1.647 7	58.0±11.7	47.2±6.3	34.6±4.3
棕榈酸	1.642 7	108.9±31.4	85.2±23.8	93.0±30.9
	1.620 2	122.5±30.2	138.1±50.4	156.1±38.4
甘氨酸	1.604 5	92.0±33.2	74.4±29.2	74.7±36.0
苹果酸	1.553 2	91.4±11.9	84.3±19.2	80.2±13.6
	1.458 0	77.1±23.9	96.1±29.0	111.8±57.1
	1.443 8	76.1±11.6	92.5±16.4	237.8±173.3
3-羟基-3-甲基-2-氧代丁酸	1.427 1	96.8±20.5	85.0±22.8	67.6±14.0
L-组氨酸	1.390 3	87.9±34.0	84.6±29.1	70.5±22.2
乳酸	1.343 0	96.4±28.1	119.5±19.1	112.2±25.3
L-苯丙氨酸	1.340 1	125.9±16.2	163.5±31.7	222.8±96.0
	1.330 5	94.8±27.2	132.2±21.8	781.9±353.2
花生四烯酸	1.296 8	133.3±77.1	128.5±52.3	149.9±49.0
2-氧代丁酸	1.281 2	33.6±23.8	18.9±3.9	19.0±2.6
	1.224 9	97.0±23.8	107.4±25.6	121.1±41.0
	1.183 2	107.5±21.3	109.6±18.5	129.1±32.1
3-氧代丙戊酸	1.150 6	76.3±10.8	50.9±13.0	48.3±6.9
	1.1470	138.7±23.6	162.8±25.8	175.4±19.8
	1.122 8	118.3±34.3	132.5±27.8	145.2±29.1
壬酸	1.008 1	143.0±51.8	173.7±57.5	223.9±85.6

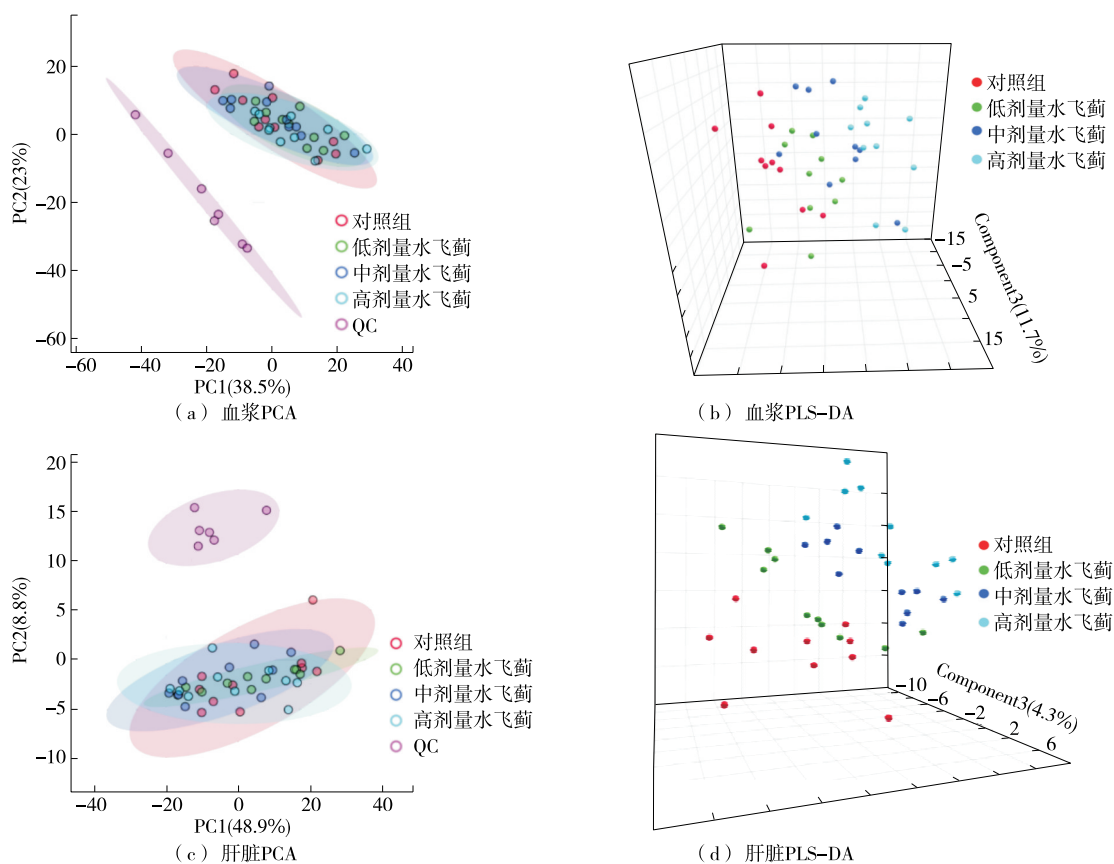


图7 水飞蓟提取物对大鼠血浆、肝脏代谢组学的影响

Figure 7 The effect of *S. manalttlm* extract on metabolome of plasma and liver of rats

氧化还原平衡、免疫功能调控至关重要^[34]。研究^[35]发现, 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷可通过调节氨基酸代谢改善糖尿病肾病的肾功能, 表现为色氨酸代谢及酪氨酸代谢显著性上调。载有圆球菌的胆汁体可改善高胆固醇血症小鼠的脂质积累和氨基酸代谢, 表现为小鼠血清氨基酸代谢, 特别是支链氨基酸代谢显著性上调, 进一步发现氨基酸代谢增加是改善小鼠脂质积累和炎症反应的重要机制^[36]。结合血生化分析、血常规分析和凝血分析的结果, 水飞蓟提取物可能通过调节大鼠血浆氨基酸的合成和代谢, 促进大鼠机体健康。

2.7 对大鼠肝脏代谢组学的影响

利用Metaboanalyst5.0中的Statistical Analysis模块计算PCA和PLS-DA。由图7(c)和图7(d)可知, 对照组和水飞蓟提取物不同剂量给药组之间均能彻底分开, 模型参数: 精确度为0.7, $R^2=0.9641$, $Q^2=0.68028$, 通过PLS-DA方法对各组代谢物差异进行分析, 选择VIP>1的内源性物质进一步分析水飞蓟提取物对肝脏代谢通路的影响, 结果见表3。

由表3可知, 肝脏中内源性代谢物VIP>1的共48种, 其中有24种内源性物质比例上升, 24种下降, 说明水飞蓟

表2 水飞蓟提取物对血浆代谢通路的影响

Table 2 Analysis of the effects of *S. manalttlm* extract on the metabolic pathways

信号通路	总计	对接点	标准差	影响因子
苯丙氨酸代谢	10	2	0.3107	0.5952
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	4	1	0.4817	0.5000
组氨酸代谢	16	2	0.3830	0.4098
花生四烯酸代谢	44	1	1.0000	0.2893
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	34	2	0.7438	0.2846
精氨酸生物合成	14	1	1.0000	0.2284
鞘脂代谢	32	3	0.3107	0.2170
烟酸和烟酰胺代谢	15	1	1.0000	0.1943
乙醛酸和二羧酸代谢	32	3	0.3107	0.1376
柠檬酸循环(TCA循环)	20	2	0.3879	0.1345
甘油磷脂代谢	36	2	0.7555	0.1219

提取物可影响大鼠肝脏内源性物质的代谢分泌。进一步利用MetaboAnalyst5.0网站分析水飞蓟提取物对肝脏内源性物质相关代谢通路的影响, 结果见表4。由表4可知,

表 3 对照组和水飞蓟提取物处理组的肝脏差异代谢物

Table 3 Differential metabolites in liver between control group and the groups treated with *S. manaltlm* extract

代谢物	VIP	低剂量组比对照组	中剂量组比对照组	高剂量组比对照组
苯乙胺	10.519 0	77.6±26.6	132.2±57.2	113.8±49.9
	5.832 0	103.2±9.9	83.7±24.5	93.1±22.9
烟酰胺	5.301 7	101.4±9.7	106.0±9.0	119.9±8.7
苹果酸	3.581 8	129.8±16.9	149.0±22.5	136.8±20.9
6-羟基嘌呤	3.293 1	94.4±12.3	108.1±7.5	120.6±14.0
3-甲基组氨酸	3.194 4	237.6±85.9	410.7±129.4	581.8±128.7
	3.067 6	102.5±14.3	83.5±23.5	75.1±28.8
	2.735 8	74.3±20.0	55.6±25.5	57.0±21.5
L-缬氨酸	2.729 8	92.3±13.6	107.0±16.2	96.6±15.8
	2.644 5	94.0±7.7	89.7±8.8	88.8±18.7
	2.482 6	100.5±11.8	90.0±13.8	88.4±17.5
	2.449 7	72.9±17.0	70.9±7.8	72.1±12.2
乳酸	2.406 2	127.3±18.5	105.7±25.4	136.8±30.9
	2.403 2	99.4±16.9	86.0±32.6	69.4±31.4
	2.266 9	79.9±15.1	75.5±16.1	69.4±17.6
胞嘧啶	2.127 7	118.5±29.2	88.1±34.2	59.8±16.8
组胺	2.009 2	111.5±58.1	189.3±52.2	112.1±34.0
	1.875 4	149.7±18.3	137.7±9.1	129.9±11.8
	1.771 6	104.6±53.8	72.5±33.8	72.1±34.1
肌酐	1.724 3	140.6±78.7	157.0±15.5	166.1±24.3
L-焦谷氨酸	1.690 7	116.5±19.1	124.5±32.8	130.4±49.4
	1.665 1	84.2±15.9	72.8±14.6	60.2±17.4
花生四烯酸	1.655 1	80.2±50.3	58.2±30.7	68.3±31.6
	1.437 8	149.3±19.7	138.6±11.3	133.0±12.2
植物鞘氨醇	1.432 3	76.0±39.5	70.8±22.4	67.7±25.3
	1.419 9	74.0±11.4	66.5±12.8	54.8±12.1
	1.411 4	163.8±23.3	162.8±13.2	138.2±14.4
二十二碳六烯酸	1.375 6	83.6±21.1	58.4±29.2	50.4±19.8
	1.333 0	78.0±13.6	106.0±29.3	92.1±26.5
2-羟基丁酸	1.310 8	132.5±23.1	129.5±33.0	151.7±29.8
左旋肉碱	1.241 8	89.9±14.9	94.5±17.3	114.0±16.2
瓜氨酸	1.197 3	74.2±30.1	63.7±24.1	119.5±32.9
	1.187 5	169.1±20.0	179.6±10.3	159.5±14.9
L-色氨酸	1.177 3	406.5±203.8	480.5±200.3	461.6±219.0
	1.148 4	74.3±3.8	71.9±10.9	71.1±10.0
3-氨基丁酸	1.134 7	175.8±63.2	172.7±37.4	160.3±65.9
	1.116 0	78.7±9.5	87.4±13.7	77.8±16.5
	1.106 2	93.6±25.0	88.3±14.2	94.6±15.4
泛酸	1.105 0	106.6±15.9	109.9±14.1	102.4±12.1
	1.093 3	78.5±12.3	106.6±40.8	112.1±38.3
黄嘌呤	1.089 3	110.2±22.0	119.0±28.6	139.4±39.4
核黄素	1.069 8	111.5±15.9	126.9±29.0	133.6±33.7
二氢鞘氨醇	1.068 0	127.2±19.0	95.9±45.4	68.2±27.1
琥珀酸	1.066 5	130.5±49.4	68.6±31.7	38.7±22.0
D-葡萄糖	1.055 4	107.4±25.4	126.6±31.1	134.3±49.8
鹅去氧胆酸甘氨酸结合物	1.047 0	80.8±20.0	71.2±36.9	43.9±19.7
	1.037 0	122.3±35.1	92.5±26.6	67.2±31.0
3-羟基-3-甲基-2-氧代丁酸	1.003 3	125.5±14.0	134.1±43.2	133.2±34.2

在所富集到的通路中,共有10条信号通路的影响因子 >0.1 。排名前3的信号通路为核黄素代谢、淀粉和蔗糖代谢、鞘脂代谢。说明水飞蓟提取物给药28 d后,主要影响大鼠肝脏核黄素代谢、淀粉和蔗糖代谢、鞘脂代谢,从而导致大鼠肝脏中内源性物质含量变化。

表4 水飞蓟提取物对肝脏代谢通路的影响

Table 4 Analysis of the effects of *S. manaltlm* extract on liver metabolic pathways

信号通路	总计	对接点	标准差	影响因子
核黄素代谢	4	1	0.654 8	0.500 0
淀粉和蔗糖代谢	18	1	1.000 0	0.420 7
鞘脂代谢	32	4	0.206 7	0.295 4
花生四烯酸代谢	44	1	1.000 0	0.289 3
苯丙氨酸代谢	10	1	1.000 0	0.238 1
精氨酸生物合成	14	1	1.000 0	0.228 4
烟酸和烟酰胺代谢	15	1	1.000 0	0.194 3
组氨酸代谢	16	2	0.654 8	0.188 5
色氨酸代谢	41	1	1.000 0	0.143 1
甘油磷脂代谢	36	2	0.979 3	0.121 9

核黄素(维生素B₂)是一种水溶性维生素,为高等生物的必需营养素。核黄素不能内源性合成,主要通过饮食摄入来满足需求^[37]。核黄素在线粒体能量代谢、应激反应、维生素和辅因子生物合成等基本细胞过程中起着至关重要的作用^[38]。淀粉和蔗糖代谢是主要的糖代谢途径,也是饮食中的主要能源物质。鞘脂分子(特别是神经酰胺、1-磷酸鞘氨醇)具有重要的生物活性,参与细胞增殖、分化、基因表达及凋亡等生理过程^[39]。Lu等^[40]研究显示,口服灵芝酸A可显著减轻饮酒小鼠肝脏脂质过度蓄积和病理改变,且核黄素代谢是灵芝酸A在肝脏中变化最显著的信号通路。罗汉果苷V与罗汉果提取物可减轻过敏性肺炎小鼠肝脏氧化应激损伤,且核黄素代谢是罗汉果苷V和罗汉果提取物在肝脏中调控的最核心代谢途径^[41]。红树莓果实多酚提取物可减轻高脂饮食诱发的非酒精性脂肪性肝病小鼠肝脏损伤,核黄素代谢、淀粉和蔗糖代谢为红树莓果实多酚提取物在肝脏中主要影响的信号通路^[42]。黑木耳黑色素对减轻酒精引起的肝损伤具有潜在的有益作用,且淀粉和蔗糖代谢是黑木耳黑色素显著调节的信号通路^[43]。口服荞麦可显著改善高脂高胆固醇饮食小鼠肝脏脂质代谢异常,补充荞麦对肝脏淀粉和蔗糖代谢具有显著的调节作用^[44]。小檗碱可抑制高脂饮食诱导的高脂血症小鼠肝脏损伤,且鞘脂代谢是小檗碱在肝脏中调控的主要代谢途径^[45]。茵栀黄颗粒可减轻非酒精性脂肪性肝病小鼠肝脏炎症,且鞘脂代谢是茵栀黄颗粒在肝脏中主要调节的信号通路^[46]。结合生生化分

析、肝脏病理的结果可知,水飞蓟提取物可能通过调节大鼠核黄素代谢、淀粉和蔗糖代谢、鞘脂代谢,促进大鼠机体健康。

3 结论

试验表明,水飞蓟提取物干预除了显著增加大鼠红细胞、血红细胞和红细胞比容外,对大鼠体重及器官系数、生化指标、血常规、肝脏病理形态均无显著性影响。水飞蓟提取物干预可能通过影响血浆苯丙氨酸代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,组氨酸代谢信号通路;肝脏核黄素代谢、淀粉和蔗糖代谢、鞘脂代谢信号通路,促进大鼠机体健康。综上,水飞蓟提取物的安全性好。28 d经口毒性试验仅为短期毒理学评价,后期需进一步进行水飞蓟提取物90 d经口毒性试验。

参考文献

- [1] FALLAH M, DAVOODVANDI A, NIKMANZAR S, et al. Silymarin (milk thistle extract) as a therapeutic agent in gastrointestinal cancer[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 142: 112024.
- [2] WADHWA K, PAHWA R, KUMAR M, et al. Mechanistic insights into the pharmacological significance of silymarin[J]. *Molecules*, 2022, 27(16): 5 327.
- [3] 王嘉康,唐浩国,陈静,等. 水飞蓟素对 *S. aureus* ATCC25923 生物膜及其毒力因子的影响[J]. *食品与机械*, 2024, 40(3): 26-32, 43.
WANG J K, TANG H G, CHEN J, et al. Effects of silymarin on *S. aureus* ATCC25923 biofilm and its virulence factors[J]. *Food & Machinery*, 2024, 40(3): 26-32, 43.
- [4] LIU Y, WU M, RE M, et al. From medical herb to functional food: development of a fermented milk containing silybin and protein from milk thistle[J]. *Foods*, 2023, 12(6): 1 308.
- [5] HAMMOUDA S, GHZAIEL I, PICON-PAGES P, et al. Nigella and milk thistle seed oils: potential cytoprotective effects against 7β -hydroxycholesterol-induced toxicity on SH-SY5Y cells[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(6): 797.
- [6] BORYMSKA W, ZYCH M, DUDEK S, et al. Silymarin from milk thistle fruits counteracts selected pathological changes in the lenses of type 1 diabetic rats[J]. *Nutrients*, 2022, 14(7): 1 450.
- [7] TAJMOHAMMADI A, RAZAVI B M, HOSSEINZADEH H. Silybum marianum (milk thistle) and its main constituent, silymarin, as a potential therapeutic plant in metabolic syndrome: a review[J]. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(10): 1 933-1 949.
- [8] KREN V, VALENTOVA K. Silybin and its congeners: from traditional medicine to molecular effects[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39(6): 1 264-1 281.
- [9] BARBOSA C C, NISHIMURA A N, SANTOS M L D, et al.

- Silymarin administration during pregnancy and breastfeeding: evaluation of initial development and adult behavior of mice[J]. *Neurotoxicology*, 2020, 78: 64-70.
- [10] HABOTTA O, ATEYA A, SALEH R M, et al. Thiamethoxam evoked neural oxido-inflammatory stress in male rats through modulation of Nrf2/NF-kB/iNOS signaling and inflammatory cytokines: neuroprotective effect of Silymarin[J]. *Neurotoxicology*, 2023, 96: 28-36.
- [11] SOLEIMANI V, DELGHANDI P S, MOALLEM S A, et al. Safety and toxicity of silymarin, the major constituent of milk thistle extract: an updated review[J]. *Phytotherapy Research*, 2019, 33(6): 1 627-1 638.
- [12] WAH KHEONG C, NIK MUSTAPHA N R, MAHADEVA S. A randomized trial of silymarin for the treatment of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2017, 15(12): 1 940-1 949.
- [13] 李宏, 李丹, 李丽娟, 等. 基于¹H-NMR代谢组学研究辛硫磷诱导鲫鱼代谢变化[J]. *食品与机械*, 2023, 39(5): 21-26.
- LI H, LI D, LI L J, et al. Study on metabolic changes of crucian carp induced by phoxim based on ¹H-NMR metabolomics[J]. *Food & Machinery*, 2023, 39(5): 21-26.
- [14] REN X, LIN L, SUN Q, et al. Metabolomics-based safety evaluation of acute exposure to electronic cigarettes in mice[J]. *Science of Total Environments*, 2022, 839: 156392.
- [15] LUAN H, WANG X, CAI Z, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: targeting the crosstalk between gut microbiota and brain in neurodegenerative disorders[J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2019, 38(1): 22-33.
- [16] 崔媛, 李海山, 宋乃宁, 等. 马兜铃酸 I 影响小鼠肝脏脂肪酸 β 氧化和糖代谢以及 TCA 循环的代谢组学研究[J]. *中国药物警戒*, 2019, 16(8): 449-466.
- CUI Y, LI H S, SONG N L, et al. Metabonomics reveals that aristolochic acid I affects β -oxidation of fatty acids, glucose metabolism and the TCA cycle in the mice liver[J]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance*, 2019, 16(8): 449-466.
- [17] 滑志民, 杨守凤, 陈斌, 等. 复合益生菌对中华田园犬营养物质观消化率、血清生化指标和粪便菌群的影响[J]. *饲料工业*, 2024, 45(18): 126-132.
- HUA Z M, YANG S F, CHEN B, et al. Effects of compound probiotics on apparent digestibility of nutrients, serum biochemical indexes and fecal flora in Chinese rural dogs[J]. *Feed Industry*, 2024, 45(18): 126-132.
- [18] 杨森, 肖普辉. 益生菌发酵饲料对羔羊生长性能、血常规及免疫力的影响[J]. *饲料研究*, 2024(9): 37-41.
- YANG S, XIAO P H. Effects of probiotic fermented feed on growth performance, blood routine, and immunity of lambs[J]. *Feed Research*, 2024(9): 37-41.
- [19] 徐艳芳, 吴巧玲, 池艳华. 注射用白眉蛇毒凝血酶联合艾司奥美拉唑钠治疗急性上消化道出血的临床效果[J]. *临床合理用药*, 2024, 17(5): 93-96.
- XU Y F, WU Q L, CHI Y H. Clinical effect of hemocoagulase combined with esomeprazole sodium for injection in the treatment of acute upper gastrointestinal bleeding[J]. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2024, 17(5): 93-96.
- [20] 姬海南, 佟娜, 刘畅, 等. 吴茱萸不同提取方式差异化学物质和毒性物质基础研究[J]. *中国药物警戒*, 2022, 19(12): 1 309-1 314, 1 320.
- JI H N, TONG N, LIU C, et al. Variations of chemical substances and toxic substances of *Evodia rutaecarpa* using different extraction methods[J]. *Chinese Journal of Pharmacovigilance*, 2022, 19(12): 1 309-1 314, 1 320.
- [21] 张梦玲. 柑橘川陈皮素对缺氧诱导的滋养层细胞凋亡的保护作用及机制研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2021: 18.
- ZHANG M L. Study on the protective effect and mechanism of citrus nobiletin on the apoptosis of trophoblast cells induced by hypoxia[D]. Changsha: Hunan University, 2021: 18.
- [22] LI Y, SU H, YIN Z P, et al. Metabolism, tissue distribution and excretion of taxifolin in rat[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 150: 112959.
- [23] LAUNHOLT T L, KRISTIANSEN C B, HJORTH P. Safety and side effects of apple vinegar intake and its effect on metabolic parameters and body weight: a systematic review[J]. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(6): 2 273-2 289.
- [24] 韩超, 石丽丽, 赵金鹏, 等. 水飞蓟的毒理学安全性评价[J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(6): 20-24.
- HAN C, SHI L L, ZHAO J P, et al. Toxicological safety evaluation of milk thistle[J]. *Food and Nutrition in China*, 2018, 24(6): 20-24.
- [25] 孔庆喜, 罗曼, 赵煜, 等. 临床生化指标在新药临床前研究中的毒理学意义[J]. *药物评价研究*, 2014, 37(5): 472-475.
- KONG Q X, LUO M, ZHAO Y, et al. Toxicological significance of clinical biochemical indicators in preclinical studies for new drugs[J]. *Drug Evaluation Research*, 2014, 37(5): 472-475.
- [26] 郭思瑞, 邝咏梅, 何笑荣, 等. 水飞蓟宾胶囊保肝作用的药理学研究进展[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2024, 24(1): 116-118, 123.
- GUO S R, KUANG Y M, HE X R, et al. Pharmaceutical progress on hepatoprotective effects of silibinin capsules[J]. *Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China*, 2024, 24(1): 116-118, 123.
- [27] 郑子恢, 潘慧杰, 何颖, 等. 水飞蓟宾联合多烯磷脂酰胆碱治疗脂肪肝有效性及安全性系统评价[J]. *中国药业*, 2023, 32(2): 109-116.
- ZHEN Z H, PAN H J, HE Y, et al. Efficacy and safety of silybin combined with polyene phosphatidylcholine in the treatment of fatty liver: a systematic review[J]. *China Pharmaceuticals*, 2023, 32(2): 109-116.
- [28] 张凡. 水飞蓟宾葡甲胺片联合复方甘草酸苷片治疗脂肪肝的临床疗效和安全性探讨[J]. *系统医学*, 2022, 7(12): 91-94.

- ZHANG F. Clinical efficacy and safety of silibinin meglumine tablets combined with compound glycyrrhizin tablets in the treatment of fatty liver[J]. *Systems Medicine*, 2022, 7(12): 91-94.
- [29] LASSILA R, WEISEL J W. Role of red blood cells in clinically relevant bleeding tendencies and complications[J]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2023, 21(11): 3 024-3 032.
- [30] CHEN M, LENG Y, HE C, et al. Red blood cells: a potential delivery system[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 288.
- [31] VAN DER LAAK J, LITJENS G, CIOMPI F. Deep learning in histopathology: the path to the clinic[J]. *Nature Medicine*, 2021, 27(5): 775-784.
- [32] SZABO A, OMERALFAROUG A, BJELLAAS T, et al. The effects of fumonisin B(1) at the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) and 5-times above on the renal histology and lipidome of rats[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 18: 113333.
- [33] 姬海南, 康辉, 李海山, 等. 基于UPLC-MS研究纳米二氧化钛对成年小鼠血浆代谢谱的影响[J]. *中国新药杂志*, 2021, 30(14): 1 323-1 333.
- JI H N, KANG H, LI H S, et al. Investigation on the effect of nano-TiO₂ on the plasma metabolic spectrum in mice based on UPLC-MS[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2021, 30(14): 1 323-1 333.
- [34] TABE Y, LORENZI P L, KONOPLEVA M. Amino acid metabolism in hematologic malignancies and the era of targeted therapy[J]. *Blood*, 2019, 134(13): 1 014-1 023.
- [35] LI Y X, LU Y P, TANG D, et al. Anthocyanin improves kidney function in diabetic kidney disease by regulating amino acid metabolism[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2022, 20(1): 510.
- [36] LIU C, GUO Y, CHENG Y, et al. Torularhodin-loaded bilosomes ameliorate lipid accumulation and amino acid metabolism in hypercholesterolemic mice[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2023, 71(7): 3 250-3 260.
- [37] BALASUBRAMANIAM S, CHRISTODOULOU J, RAHMAN S. Disorders of riboflavin metabolism[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2019, 42(4): 608-619.
- [38] MOSEGAARD S, DIPACE G, BROSS P, et al. Riboflavin deficiency-implications for general human health and inborn errors of metabolism[J]. *International Journal of Molecular Science*, 2020, 21(11): 3 847.
- [39] LAI Y, TIAN Y, YOU X, et al. Effects of sphingolipid metabolism disorders on endothelial cells[J]. *Lipids in Health Disease*, 2022, 21(1): 101.
- [40] LU X C, WU Q, CAO Y J, et al. Ganoderic acid a from ganoderma lucidum protects against alcoholic liver injury through ameliorating the lipid metabolism and modulating the intestinal microbial composition[J]. *Food & Function*, 2022, 13(10): 5 820-5 837.
- [41] LIU Y, WANG J, DOU T, et al. The liver metabolic features of mogroside v compared to siraitia grosvenorii fruit extract in allergic pneumonia mice[J]. *Molecular Immunology*, 2022, 145: 80-87.
- [42] QIN Y, FAN R, LIU Y, et al. Exploring the potential mechanism of *Rubus corchorifolius* L. fruit polyphenol-rich extract in mitigating non-alcoholic fatty liver disease by integration of metabolomics and transcriptomics profiling[J]. *Food & Function*, 2023, 14(20): 9 295-9 308.
- [43] LIN Y, CHEN H, CAO Y, et al. Auricularia auricula melanin protects against alcoholic liver injury and modulates intestinal microbiota composition in mice exposed to alcohol intake[J]. *Foods*, 2021, 10(10): 2 436.
- [44] HUANG Z R, DENG J C, LI Q Y, et al. Protective mechanism of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* moench.) against nonalcoholic fatty liver disease associated with dyslipidemia in mice fed a high-fat and high-cholesterol diet [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(24): 6 530-6 543.
- [45] CHEN Y, LI K, ZHAO H, et al. Integrated lipidomics and network pharmacology analysis to reveal the mechanisms of berberine in the treatment of hyperlipidemia[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2022, 20(1): 412.
- [46] TAN Y, HUANG Z, LIU Y, et al. Integrated serum pharmacochimistry, 16S rRNA sequencing and metabolomics to reveal the material basis and mechanism of Yinzhihuang granule against non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 310: 116418.