

水飞蓟提取物的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性研究

黄凰, 张莹莹, 胡余明, 易传祝, 周月婵

摘要:**目的** 研究水飞蓟提取物的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性。**方法** 根据 GB 15193.3-2003、GB 15193.4-2003、GB 15193.5-2003、GB 15193.7-2003、GB 15193.13-2003, 采用小鼠急性经口毒性试验、三项遗传毒性试验 (Ames 试验、骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验)、90d 喂养实验对水飞蓟提取物的安全性毒理学进行研究。**结果** 水飞蓟提取物对雌、雄昆明种小鼠的最大耐受剂量 (MTD) 均大于 20.0g/kg·bw, 属无毒级; Ames 试验、骨髓嗜多染红细胞微核试验、小鼠精子畸形试验结果均为阴性, 90d 喂养试验各剂量组大鼠体重增加、食物摄入量、食物利用率、脏器/体重比值与对照组比较均无异常, 血液学指标和生化指标值在正常范围内, 大鼠主要脏器组织未见有意义的病理学改变; 未观察到有害作用剂量大于 2.5g/kg·bw。**结论** 在本实验条件下, 水飞蓟提取物未见明显毒副作用。

关键词:水飞蓟提取物; 急性毒性; 遗传毒性; 亚慢性毒性

Acute toxicity, genotoxicity and subchronic toxicity of Silymarine extracts

HUANG Huang, ZHANG Ying-ying, HU Yu-ming, YI Chuan-zhu, ZHOU Yue-chan

(Hunan Provincial Center for Control and Prevention, Changsha 410005, China)

作者简介: 黄凰 (1980-), 女, 湖南湘潭人, 硕士研究生学历, 主管技师, 主要从事实验室质量管理工作。

通讯作者: 胡余明, 副主任技师, Email: huyuming@vip.sina.com

Corresponding author: HU Yu-ming, E-mail: huyuming@vip.sina.com

Abstract:Objective To research the acute toxicity, genotoxicity and subchronic toxicity of silymarine extracts according to GB 15193.3-2003, GB 15193.4-2003, GB 15193.5-2003, GB 15193.7-2003 and GB 15193.13-2003. **Methods** Test of maximum tolerated dose, Ames test, born marrow cell micronucleus test, mice sperm abnormality test and 90-day feeding study in rats were used to assess the safety of silymarine extracts. **Results** The maximum tolerated dose (MTD) in mice of silymarine extracts were greater than 20.0g/kg·bw. Ames test, micronucleus test and sperm shape abnormality were negative. No significant differences were found in body weight gain, food intake, food lization rates and the ratio of organ weight between test groups and control group in 90d feeding study. Haematological parameters and serum biochemical indices all fell into the ranges of normal values. No meaningful histological changes were observed in the rats' main tissues. The no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) is more than 2.5g/kg·bw. **Conclusions** No significant toxic effects were found in Silymarine extracts in this study.

Key words: Silymarine extracts; Acute toxicity; Genotoxicity; Subchronic toxicity

水飞蓟为菊科植物水飞蓟 [*Silibum marianum* (L.) Gaertn]的干燥成熟果实, 具有清热解毒、疏肝利胆的传统功效^[1]。现代研究发现, 水飞蓟提取物的有效成分为水飞蓟素, 具有护肝、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力等多种生理活性^[2~5]。除临床应用外, 水飞蓟作为保健食品的原料也日渐受到人们关注。目前国内外对水飞蓟的研究主要集中在其功效方面, 而有关食用安全性的研究较少, 本实验通过对水飞蓟提取物的急性毒性、遗传毒性和亚慢性毒性进行研究, 为水飞蓟的进一步研究开发提供毒理学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 受试物 水飞蓟提取物粉末，由陕西某生物技术有限公司提供，成人每日推荐量为 0.00833g/kg.bw。

1.1.2 实验动物及主要仪器 SPF 级昆明种小鼠、SD 大鼠及饲料由长沙市天勤生物技术有限公司提供，实验动物生产许可证号为 SCXK(湘)2009-0012。。

实验动物使用许可证号为 SYXK(湘)2010-0011。饲养环境为屏障环境，温度为 22~24℃。主要仪器为 SYSMEX XT-2000i 全自动血球计数仪和 BECKMAN COULTER AU680 全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 小鼠急性毒性试验 根据 GB 15193.3-2003，采用最大耐受量试验。选用昆明种小鼠 20 只，体重为 $19.9 \pm 1.2\text{g}$ ，雌雄各半。取受试物 50.00g 加 1%羧甲基纤维素钠至 100ml，给小鼠一日内间隔 4 小时经口灌胃 2 次，每次灌胃体积为 $0.2\text{ml}/10\text{g}\cdot\text{bw}$ ，累积剂量为 $20.00\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 。灌胃前禁食 16h，灌胃后连续观察两周，记录中毒表现及死亡情况。

1.2.2 Ames 试验 根据 GB 15193.4-2003，采用经鉴定符合要求的鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 4 株菌株进行试验。试验设 5000、1000、200、40、 $8\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个剂量组，同时设自发回变、溶剂对照和阳性突变剂对照。采用平板掺入法，对 5 个剂量组同时予以加与不加 S-9 的试验，每组做 3 个平行皿，如果受试物的回变菌落数超过自发回变菌落数的 2 倍以上，并有剂量—反应关系者定为阳性。整套试验在相同试验条件下重复一次并分别统计。

1.2.3 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 根据 GB 15193.5-2003，采用间隔 24h 两次经口灌胃法进行试验。取体重为 $27.6 \pm 1.5\text{g}$ 的昆明种小鼠 50 只，随机分为 5 组，每组 10 只，雌雄各半。以 $0.04\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 剂量的环磷酰胺为阳性对照，1%羧甲基纤维素钠为阴性对照。试验组高、中、低剂量分别为 $10.00\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 、 $5.00\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 、 $2.50\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 。末次给样后 6h 颈椎脱臼处死动物，取胸骨骨髓涂片，计数嗜多染红细胞(PCE)微核发生率，按 χ^2 检验统计分

析。

1.2.4 小鼠精子畸形试验 根据 GB 15193.7-2003, 取体重 $29.5 \pm 2.8\text{g}$ 的雄性昆明种小鼠 25 只, 随机分为 5 组, 每组 5 只。阳性对照、阴性对照和高、中、低试验组设置同 1.2.3。每日灌胃一次, 连续 5d, 于末次灌胃后的第 30d 处死动物, 取附睾精子涂片计算畸变精子发生率, 按 χ^2 检验统计分析。

1.2.5 90d 喂养试验 根据 GB 15193.13-2003, 取体重 $75.9 \pm 8.2\text{g}$ 的 SD 大鼠 80 只, 雌雄各半。将实验动物随机分为四组。设低、中、高受试物组剂量分别为 $0.833\text{g/kg}\cdot\text{bw}$ 、 $1.667\text{g/kg}\cdot\text{bw}$ 、 $2.500\text{g/kg}\cdot\text{bw}$, 约相当于人体推荐剂量的 100、200、300 倍。对照组给予等体积的 1% 羧甲基纤维素钠, 每日灌胃一次 ($1.0\text{ml}/100\text{g}\cdot\text{bw}$), 连续 90d。实验期间每周加食 2~3 次, 记录给食量和剩食量, 每周称一次体重。计算动物增重、食物利用率, 测定血常规、生化等血液学指标。肉眼观察脏器的一般病变, 称量并计算脏器比值。对肝、肾、脾、胃、肠、睾丸、卵巢作病理切片检查。

1.2.6 统计分析 实验数据用 Excel、Spss11.5 软件进行统计分析。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 水飞蓟提取物对小鼠急性毒性的影响 以 $20.00\text{g/kg}\cdot\text{bw}$ 剂量的水飞蓟提取物给两种性别的昆明种小鼠灌胃后未见明显中毒症状, 观察 14d 无死亡。第 15d 处死受试动物, 肝、脾、肾、胃、肠、心、肺等主要脏器未见明显异常改变。水飞蓟提取物对昆明种雌、雄小鼠的最大耐受剂量 (MTD) 大于 $20.00\text{g/kg}\cdot\text{bw}$ 。

2.2 水飞蓟提取物对遗传毒性的影响

2.2.1 Ames 试验 对 4 株试验菌株，在加与不加 S-9 条件下，各剂量组回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍，亦无剂量—反应关系，表明水飞蓟提取物为诱变阴性。数据略。

2.2.2 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 雄鼠低、中、高剂量组微核率分别为（1.0±1.0）‰、（0.6±0.9）‰、（1.4±0.9）‰，与阴性对照组（0.8±0.8）‰比较差异无统计学意义，而环磷酰胺组微核率（24.6±3.0）‰与阴性对照组比较差异有统计学意义（P<0.05）；雌鼠低、中、高剂量组微核率分别为（1.2±0.4）‰、（0.8±1.1）‰、（1.0±0.7）‰，与阴性对照组（1.6±0.5）‰比较差异无统计学意义，而环磷酰胺组微核率（23.2±3.0）‰与阴性对照组比较差异有统计学意义（P<0.05）。

2.2.3 小鼠精子畸形试验 水飞蓟提取物对小鼠精子畸形发生率未产生明显改变，各剂量组与阴性对照组比较差异无统计学意义（P>0.05），而环磷酰胺组与阴性对照组比较差异有统计学意义（P<0.05）。见表 1。

表 1 水飞蓟提取物对小鼠精子畸形发生率的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

组 别	动物数 (只)	受检精 子数(个)	畸形 总数	畸形率(%) ($\bar{x} \pm s$)		各类精子畸形的构成比(%)						
						无 钩	香蕉 形	胖 头	无定 形	尾折 叠	双 头	双 尾
高剂量组	5	5000	118	2.36	± 0.23	26.3	12.7	21.2	39.8	0.0	0.0	0.0
中剂量组	5	5000	112	2.24	± 0.36	31.3	13.4	18.8	36.6	0.0	0.0	0.0
低剂量组	5	5000	121	2.42	± 0.33	37.2	14.9	15.7	32.2	0.0	0.0	0.0
阴性对照	5	5000	115	2.30	± 0.19	35.7	13.9	13.0	37.4	0.0	0.0	0.0
阳性对照	5	5000	426	8.52	± 1.46 [*]	24.9	24.4	22.1	28.4	0.0	0.0	0.2

2.3 水飞蓟提取物对 SD 大鼠亚慢性毒性的影响

90d 喂养试验期间，对照组和 3 个剂量组动物生长发育良好，摄食、饮水、大小便活动均正常。未观察到任何异常行为和体征。

2.3.1 水飞蓟提取物对大鼠体重增长、进食量、食物利用率的影响 各剂量组大鼠体重、增重、进食量、食物利用率与对照组比较差异无统计学意义 (P>0.05)。见表 2。

表 2 水飞蓟提取物 90d 喂养对大鼠体重、食物总摄入量 and 食物利用率的影响 (x̄ ± s)

性别	组别	动物数(n)	始重(g)	末重(g)	增重(g)	食物总摄入量(g)	食物利用率(%)
雄	对 照 组	10	75.4 ± 9.2	492.4 ± 34.2	417.0 ± 35.0	2339.5 ± 106.2	17.8 ± 1.2
	低剂量组	10	76.1 ± 8.9	496.1 ± 38.7	419.9 ± 38.1	2314.1 ± 107.9	18.1 ± 1.0
	中剂量组	10	76.0 ± 8.0	492.6 ± 27.2	416.5 ± 31.8	2324.2 ± 113.3	17.9 ± 1.0
	高剂量组	10	76.1 ± 8.9	498.9 ± 34.6	422.8 ± 32.8	2331.0 ± 123.2	18.1 ± 0.7
雌	对 照 组	10	75.8 ± 9.0	362.8 ± 31.1	287.0 ± 30.1	2066.1 ± 132.4	13.9 ± 1.3
	低剂量组	10	75.8 ± 8.5	366.4 ± 28.5	290.6 ± 27.4	2073.2 ± 128.4	14.0 ± 1.4
	中剂量组	10	76.0 ± 7.7	369.1 ± 29.5	293.2 ± 31.6	2063.4 ± 130.5	14.2 ± 1.4
	高剂量组	10	76.3 ± 8.4	365.6 ± 30.9	289.3 ± 32.4	2079.9 ± 125.1	13.9 ± 1.1

2.3.2 水飞蓟提取物对大鼠血液学指标的影响 各剂量组大鼠实验末期血液生化指标与对照组比较，差异无统计学意义 (P>0.05)。见表 3。

表 3 水飞蓟提取物 90d 喂养对大鼠血液学检查结果 (x̄ ± s)

性别	组别	动物数(n)	红细胞总数(10 ¹² /L)	血红蛋白(g/L)	白细胞计数(10 ⁹ /L)	血小板总数(10 ⁹ /L)
雄	对照组	10	7.74 ± 0.32	141 ± 7	7.97 ± 2.38	681 ± 110
	低剂量	10	7.43 ± 0.42	138 ± 10	8.62 ± 1.03	713 ± 161
	中剂量	10	7.41 ± 0.54	137 ± 7	8.93 ± 2.14	640 ± 151
	高剂量	10	7.73 ± 0.31	138 ± 8	8.96 ± 1.98	672 ± 185

	对照组	10	7.73 ± 0.29	141 ± 7	8.95 ± 3.00	598 ± 97
雌	低剂量	10	7.45 ± 0.41	139 ± 9	8.73 ± 0.99	650 ± 124
	中剂量	10	7.48 ± 0.55	137 ± 8	9.50 ± 1.99	574 ± 105
	高剂量	10	7.74 ± 0.34	139 ± 7	8.99 ± 1.95	609 ± 135

2.3.3 水飞蓟提取物对大鼠血生化指标的影响 各剂量组大鼠实验末期血生化指标与对照组比较，差异无统计学意义（P≥0.05）。见表 4。

表 4 水飞蓟提取物 90d 喂养对大鼠生化检验结果（ $\bar{x} \pm s$ ）

性别	组别	动物数 (n)	谷丙转氨酶 (U/L)	谷草转氨酶 (U/L)	总蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)	胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	尿素氮 (mmol/L)	肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	血糖 (mmol/L)
雄	对照组	10	49.46 \pm 9.26	147.27 \pm 20.48	66.65 \pm 2.36	33.19 \pm 1.91	1.94 \pm 0.29	1.13 \pm 0.37	4.72 \pm 0.94	46.32 \pm 1.32	4.39 \pm 0.65
	低剂量	10	53.21 \pm 9.47	141.40 \pm 20.72	68.17 \pm 4.02	33.36 \pm 2.36	2.03 \pm 0.38	1.15 \pm 0.23	4.87 \pm 0.78	46.69 \pm 2.82	4.44 \pm 0.46
	中剂量	10	52.43 \pm 5.22	140.69 \pm 21.33	66.87 \pm 1.31	32.60 \pm 1.36	2.09 \pm 0.29	1.02 \pm 0.20	4.75 \pm 0.75	45.59 \pm 2.81	4.58 \pm 0.33
	高剂量	10	50.49 \pm 8.69	138.04 \pm 20.69	66.90 \pm 5.37	32.97 \pm 1.70	2.12 \pm 0.25	1.03 \pm 0.30	4.92 \pm 0.90	45.12 \pm 2.63	4.54 \pm 0.69
雌	对照组	10	42.46 \pm 6.93	146.33 \pm 18.60	70.10 \pm 5.69	34.62 \pm 2.46	2.06 \pm 0.22	0.98 \pm 0.20	5.47 \pm 0.58	45.22 \pm 2.39	5.31 \pm 0.45
	低剂量	10	43.00 \pm 6.88	142.80 \pm 12.39	70.34 \pm 4.21	34.80 \pm 2.46	2.18 \pm 0.32	1.08 \pm 0.27	5.56 \pm 0.97	47.18 \pm 2.19	5.57 \pm 0.95
	中剂量	10	43.88 \pm 8.45	138.48 \pm 16.82	69.43 \pm 3.93	34.41 \pm 3.31	2.13 \pm 0.28	0.94 \pm 0.23	5.54 \pm 0.94	47.42 \pm 2.16	5.26 \pm 0.52

3.4 水飞蓟提取物对大鼠脏器/体重比值的影响 各剂量组大鼠脏器/体重比值与对照组比较，差异无统计学意义（ $P \geq 0.05$ ）。见表 5。

表 5 水飞蓟提取物 90d 喂养对大鼠脏器/体重比值的影响（ $\bar{x} \pm s$ ）

性别	组别	动物数(只)	肝脏/体重(%)	脾脏/体重(%)	肾脏/体重(%)	睾丸/体重(%)
雄	对 照 组	10	3.04 \pm 0.18	0.30 \pm 0.07	0.64 \pm 0.05	0.86 \pm 0.11
	低剂量组	10	3.09 \pm 0.21	0.29 \pm 0.05	0.63 \pm 0.07	0.84 \pm 0.09
	中剂量组	10	3.05 \pm 0.22	0.28 \pm 0.05	0.62 \pm 0.06	0.86 \pm 0.11
	高剂量组	10	3.03 \pm 0.19	0.28 \pm 0.07	0.66 \pm 0.07	0.84 \pm 0.13
雌	对 照 组	10	3.14 \pm 0.66	0.31 \pm 0.07	0.62 \pm 0.13	---
	低剂量组	10	3.19 \pm 0.49	0.30 \pm 0.08	0.63 \pm 0.08	---
	中剂量组	10	3.20 \pm 0.36	0.29 \pm 0.08	0.66 \pm 0.10	---
	高剂量组	10	3.12 \pm 0.40	0.31 \pm 0.07	0.64 \pm 0.11	---

2.3.5 大体解剖及组织学检查结果 大体解剖肉眼观察各脏器未见明显异常；组织学切片检查可见各剂量组肝、脾、肾、肠、胃、睾丸、卵巢与对照组比较均无有意义的病理改变。

3 讨论

水飞蓟又名水飞雉、奶蓟，原产于地中海沿岸，是欧洲民间常用于治疗肝胆疾病的一种草药，自 1972 引入我国以来，逐渐在辽宁、黑龙江、陕西等地广泛种植^[7]。水飞蓟果实药用有效成分的总提取物即水飞蓟素，其中以水飞蓟宾的含量最高^[8]。过往主要着重于水飞蓟素作为保肝药物方面的研究，近年来发现水飞蓟素还具有明显的抗脂质过氧化、清除自由基、抗肿瘤等功能^[4~6]。

水飞蓟作为保健食品的原料同样有着广阔的市场前景。有研究者提出，将水飞蓟素进行化学改性，提高水溶性，有利于将其作为机理明确的功能因子添加到各类食品或饮料当中，制成保健食品或饮料^[8]。目前国内对水飞蓟资源的利用主要是以提取水飞蓟素为主，对种籽中油和蛋白的提取利用为辅，提取剩下的饼粕作为饲料或肥料。有报道水飞蓟粕对小鼠的急性经口 $LD_{50} > 15\text{g/kg}\cdot\text{BW}$ ^[9]，为无毒级；也有人对水飞蓟籽油的亚慢性毒性进行研究，得出其对 SD 大鼠的最大未观察到有害作用剂量为 $10\text{ml/kg}\cdot\text{BW}$ ^[10]，无明显毒副作用。而关于水飞蓟总提取物安全性方面的研究尚属空白。

本实验条件下，水飞蓟提取物对雌、雄昆明种小鼠最大耐受剂量 $MTD > 20\text{g/kg}\cdot\text{BW}$ ，根据急性毒性分级标准，属无毒级；通过体外试验系统、体内体细胞及生殖细胞试验的系统检测，均未发现遗传毒理学方面的改变；对 SD 大鼠 90d 喂养试验显示，动物生长发育正常，试验期间未见中毒症状及死亡，肝、脾、肾、肠、胃、睾丸、卵巢等主要器官未见明显病理学改变，体重、食物利用率、脏器比值、血液学等生理生化指标均未见异常，最大未观察到有害作用剂量为 $2.500\text{g/kg}\cdot\text{BW}$ ，达成人推荐日摄入量的 300 倍。由此可见，水飞蓟提取物在本实验条件下基本无毒副作用，本研究为其开发成为功

能食品的原料提供了安全性的毒理学试验依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 [S].2010 版.
- [2] 冀润利, 赵青娥.水飞蓟素对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J].中国应用生理学杂志, 2012,28(3):279-287.
- [3] 计慧.水飞蓟素和虎杖提取物对高脂血症模型小鼠脂质代谢的影响及其机制[J].世界华人消化杂志,2014,22(21):3072-3076.
- [4] 刘敏, 肖颖, 左爱仁, 等.槲皮素、根皮素、水飞蓟宾清除自由基和抑制脂质过氧化活性研究 [J]. 中成药, 2012, 34(4):753-756.
- [5] Sadava D, Kane SE. Silibinin reverses drug resistance in human small-cell lung carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2013, 339(1):102-106.
- [6] Lu W, Lin C, King TD, et al. Silibinin inhibits Wnt/ β -catenin signaling by suppressing Wnt co-receptor LRP6 expression in human prostate and breast cancer cells[J]. Cell Signal, 2012, 24 (12):2291-2296.
- [7]杨明, 丁立威.水飞蓟产销历史、现状与后市分析[J].特种经济动植物,2013,03:19-22.
- [8]徐德峰, 张卫明, 史劲松, 等. 国内水飞蓟资源利用现状与展望 [J]. 食品研究与开发, 2007, 28(2):157—161.
- [9]朱淑云, 徐启迪, 陈晓东,等.水飞蓟粕对小鼠的急性毒性[J].江苏农业科学,2012, 40(2):231—232.
- [10] 杨鸿武, 谢韬, 牛璐, 等.水飞蓟籽油的亚慢性毒性研究[J].中国卫生检验杂志, 2014, 24(1):55-57.