

編號：CCMP97-RD-020

# 硃砂經水飛法炮製後在鼯鼠體內的吸收， 排泄及神經行為毒性的探討

楊榮森、蕭水銀  
國立臺灣大學

## 摘 要

硃砂在神農本草經，歸屬於有效無毒的上品藥物，二千多年來，中醫師廣泛使用硃砂治療心神不寧，驚癲癩狂、失眠多夢、咽喉腫痛及癰疽瘡瘍等宿疾。由於水飛硃砂含硫化汞成分95%以上，而且極不易溶解於任何溶劑，因此硃砂在體內吸收，排泄、組織分布及對組織細胞的親和力及生物作用機制等等，應與劇毒甲基汞有很大的差異性，因此，本研究計畫的目的，在於闡明硃砂藥理及毒理動力學及作用學（即硃砂在鼯鼠體內的吸收，排泄及組之分佈的研究）。

本研究餵水飛硃砂後，再分析其在鼯鼠體內吸收，排泄及組織分佈。由於市售水飛硃砂種類很多，我們先選擇三種，經ICP/mass分析所含Hg及其他微量元素，結果顯示編號硃砂C所含有毒金屬(Pb,Cd,As)最低，因此本研究均採用硃砂C，另外硃砂劑量的選擇，乃根據我們實驗室研究結果，在低劑量10mg/kg/day 5週，仍安全，由此我們設計使用硃砂劑量為30,100,300/mg/kg/day，餵食十八天，期能在各組織Hg含量足夠能測得到。實驗結果，硃砂對

鼯鼠神經行為的影響是活動量稍降，情緒稍低，跳躍探索些微下降，對攀爬運動平衡功能及學習記憶功能尚無影響，腦組織氧自由基稍降，而NO在低劑量增加，高劑量下降，Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase在腦組織不同部位作用不同，總體而言，低劑量促進，高劑量有抑制現象。分析鼯鼠各組織，尿液及糞便Hg含量，結果顯示各組織含Hg總量排行依序（由大到小）為腎臟，毛髮，血液，肝臟，腸，尿液，腦，胃，心臟及脾臟。而尿液及糞便Hg含量，隨劑量及累積時日餵食而逐漸增加，總和各組織吸收Hg量及糞便Hg排泄量，估算硃砂在鼯鼠體內之吸收與劑量有密切相關，低劑量（30及100mg/kg/day）吸收率約5%，但高劑量吸收率為1.6%，因此，硃砂排泄率低劑量為95%，高劑量為98.4%，本實驗結果，闡明硃砂的毒性遠不如一般所熟

知的劇毒甲基汞（吸收率大於90%），也証實以前我們實驗結果顯示硃砂神經毒性是甲基汞的五千分之一至一千分之一。至於高劑量(300mg/kg/day)硃砂在腸胃吸收，不如低劑量的原因，據推測可能高劑量對腸胃吸收以有不良的作用產生，此推測有待以後做實驗證實。

有關硃砂降低活動量（鎮靜安神作用）及其他神經行為之作用，是很重要的議題，依照我們過去初步的研究，有些行為作用是可逆性的，但我們必須強調硃砂品質非常有關係，有些是受硃砂含重金屬，有可能導致不可逆性傷害，由本研究結果及過去歷年的實驗結果，初步評估：(1)在嚴格管制的優良水飛硃砂。(2)中醫師嚴謹的調控硃砂劑量。(3)短暫的使用期限限制（5-7天）。(4)現仍無硃砂的取代品。則硃砂在中醫藥品項可考慮存在，但此重要議題仍須再以專題做進一步的研究。

關鍵詞：水飛硃砂、鼯鼠、神經行為、吸收、排泄、組織分佈

# **Studies on Absorption, Excretion and Neurobehavioral Toxicities of Cinnabar Purified by Water Floating Processing in Mice**

Yang,R.S, Lin-Shiau,S.Y.

National Taiwan University

## **ABSTRACT**

This study focused on the absorption excretion and tissue distribution of cinnabar fed to mice. The quality and metal contaminants of three commercial cinnabar samples were analyzed by ICP/mass. The results showed that one of them had much smaller contaminant of Pb, Cd and As. Thus, cinnabar C was used throughout the experiments. The dosage of cinnabar chosen (30, 100 and 300mg/kg/day) according to our previous results would not produce renal and hepatic toxicity. During the period of cinnabar administration, the changes of neurobehavioral effects were continuously monitored. It indicated that cinnabar exhibited a slight depressant effect on locomotor activities, jump and exploring behavior, a slight decrease in retention time in open field of plus maze. There were no significant effect on climbing and rotarod motor equilibrium performance. The free radical production in brain was decreased by high dose, and NO production was increased by low dose but increased by high dose, while Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity was also increased by low dose and decreased by high dose of cinnabar. The tissue contents of Hg in various tissues showed that kidney is the highest and then hair, blood, liver, intestine, urine, brain, stomach, heart and spleen in order. The amount excreted in urine and feces were gradually increased following the continuous feeding, suggesting the cumulative effects of cinnabar. The estimated absorption rates of cinnabar were 4.5%, 5.5% and 1.6% in response to the doses of 30, 100 and 300mg/kg/day respectively. Accordingly, the excretion rate of cinnabar in feces were 95.5%, 94.5% and 98.6% respectively, suggesting that the higher doses of cinnabar were limited by the lowering absorption. These findings provide a fact that cinnabar

is actually not so toxic as the well-known toxic methylmercury (the absorption rate is greater than 90%), because of its very poor absorption. These results were also correlated our previous findings that the neurotoxic effect of cinnabar is ranging one thousandth to five thousandth of that of methylmercury.

Keywords: Cinnabar, mice, neurobehavioral effect, absorption, excretion, tissue distribution

## 壹、前言

硃砂在神農本草經<sup>1-5</sup>，歸屬於有效無毒的上品藥物，二千多年來，中醫師廣泛使用硃砂治療心神不寧，驚癲癩狂、失眠多夢、咽喉腫痛及癰疽瘡瘍等宿疾。由於硃砂藥材研末水飛精製，除去雜質後，含硫化汞成分95%以上，於是有些人認為汞化物包括硫化汞、甲基汞、硫柳汞(thimerosal)及氯化汞等等，統稱為劇毒，主張硃砂不宜臨床使用，結果有紛紛禁用的趨勢。其實所謂劇毒的汞化物，應以甲基汞為首，其他汞化物由於其化學構造，在體液內溶解度，脂溶性及水溶性，種種物化的差異性<sup>6-8</sup>，導致不同汞化物，在體內吸收，排泄、組織分布及對組織細胞的親和力及生物作用機制等等，均有很大差異性，結果導致不同汞化物的藥理作用及毒性，會有非常大的分歧，尤其是自古以來，中醫師使用的硃砂（硫化汞），由於水溶性極小，連強酸王水都不能溶解，所以有關硃砂的藥理作用及毒性研究很少，一般外行人把硃砂當作劇毒的深冤，也就無從申訴。最近我們很感謝中醫藥委員會的資助，得以研究硃砂及硫化汞的神經毒性（主要著重於活動量及運動神經傷害作用），發現硃砂在動物（天竺鼠、大鼠及鼯鼠）的神經毒性約為甲基汞的五千分之一至一千分之一<sup>9-12</sup>，依照不同作用部位及不同神經毒性，而有些差異，從這些研究結果，我們的結論是硃砂是屬於微毒的化合物，比我們所研究的氯化銅之神經毒還低，所以不能一概而論，認為所有汞化物都如甲基汞，全部歸納為劇毒，由於經費及人力有限，我們尚未研究有關硃砂在體內的吸收，排泄、組織分布與其產生神經毒性的相關性，期望能藉本計畫研究，闡明硃砂藥理及毒理動力學及作用學。

最近有關硫柳汞(thimerosal)加入疫苗內，當作抗菌防腐劑，在美國醫藥界及世界衛生組織(WHO)努力探討硫柳汞是否會有神經毒性如引發小兒自閉症及對神經發育有障礙的嚴重問題，有關疫苗內硫柳汞的神經傷害問題目前仍在探討中<sup>13-19</sup>。由於硃砂與硫柳汞的物化性質很不同，硫柳汞很易溶於水，而硃砂極不易溶，所以要引發類似的神經毒性，恐怕有效劑量會有很大差距，最懇切的答案，是要我們去作實驗，確實闡明產生神經毒性的劑量及安全的劑量，解決此問題，對我們祖先使用硃砂治病的疑惑，或許有些許答案。

目前由於社會及家庭的結構與環境因素的變遷，促使全世界人類在神經精神領域的疾病如憂鬱症、自閉症、精神分裂症、健忘症、巴金森氏症等等的罹患率直線上升，因此有關硃砂及其他汞化物的神經毒性，評估方法及項目，也朝向著重於神經精神及行為情緒等各方面的神經毒性之研究，基於人類的健康應著重於身心靈三方面的健全，因此硃砂的

臨床使用，對人類的神經精神及行為情緒的可能神經毒性，被列為研究重點之一。我們於本計畫使用鼯鼠測試水飛精製的硃砂，研究其對神經行為的變異作用，並探求其在實驗條件下的安全及致毒之劑量，然後研究硃砂在鼯鼠胃腸之吸收，排泄及其在各組之分布。有關神經毒性的測試，研究方法很多，本計畫所研究的項目，偏重於神經精神及行為情緒相關的心智活動，例如學習記憶的智力活動，情緒開朗或抑鬱孤僻的情感，或喜愛群居或自閉孤獨的性格測試，均與心智情緒相關的研究，有關硃砂對鼯鼠的心智行為及情緒的影響，很值得我們去探究，所得結果將是我們瞭解硃砂對人類心智行為及情緒的第一步。總合本計畫所研究的項目是：1. 鼯鼠的社交行為(social interaction)。2. 十字迷宮開闊區(open field)及封秘區(closed field)之嗜選值，代表心情開朗或憂鬱傾向。3. 探索行為（對新奇物質的喜好及探索）。4. 鎮靜寧神及活動量之偵測。5. 攀爬能力(climbing)。6. 水迷宮學習及記憶功能。7. 運動及平衡功能。8. 腦組織NO<sub>x</sub>產生量及過氧化脂質(LPO)產量的變化。9. 鼯鼠血液、尿液、糞便及各組織(腦、肝、腎、心、肺及脾臟)汞含量之測定。以上九項實驗測試，所得結果，以便闡明硃砂對鼯鼠神經精神及行為情緒等各方面的影響，而且由各組織及排泄物之汞含量，得知硃砂在體內的吸收，排泄及組織分布的藥物及毒物動力學，藉以闡明硃砂引起鼯鼠神經精神的致毒作用與腦組織汞含量的相關性，除此之外，腦組織NO<sub>x</sub>及LPO的變化，得以提供硃砂對腦組織的生化訊息途徑的影響，因而揭曉其可能作用的相關機制，期望本計畫全新的研究結果，對於硃砂在臨床上使用於寧神定驚的作用原理，也能由本研究的成果而探知。

NO (Nitric oxide)在腦神經是一種重要的訊息傳遞物質，在glutamnergic神經末稍分泌glutamate，作用於神經鍵後NMDA受體後，增加[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>，進而活化nNOS，製造NO，而產生的NO會逆向回饋至神經鍵前，促進glutamate釋放，所以NO是腦神經的訊息傳遞物質。但NO本身是一種自由基，若NO產量太多，會與細胞內O<sub>2</sub><sup>-</sup>反應變成ONOO<sup>-</sup>，此乃活性最大的自由基會與大分子如脂質、蛋白質及DNA產生氧化作用，變成過氧化脂質，破壞神經組織構造，過去有研究指出，汞化物會改變NO及氧自由基，因此，我們也於本計畫內，研究NO產量及LPO，希望能與硃砂對腦組織功能的影響之相關性，作進一步的探討。

總之，我們在本計畫研究水飛硃砂在鼯鼠體內的吸收、排泄、組織分布與其產生神經行為毒性或神經藥理作用的相關性，對於二千多年來臨床上使用硃砂的可能機制，有別於其他汞化物，期能提供實驗的證據闡明之。

## 貳、研究方法及進行步驟

### 一、實驗鼯鼠及硃砂：

我們採用4-5週(18-25g)雄性ICR種鼯鼠，分別供以下的實驗使用。且每籠放置5~6隻，動物中心具有中央空調系統及照明設備，將室溫維持於攝氏 $22\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ，濕溫測維持在40~60%，人工照明設備以12小時為單位進行日夜變化。

本研究所擬使用的水飛硃砂，將請中醫藥委員會研發組協助採購，目前具有GMP藥廠製造的硃砂有萬國、阮芳、福銓興等等，我們擬將購得的硃砂先經消化預先處理後，以ICP/mass分析汞及硫含量，以確定其純度後，再使用於動物實驗。

### 二、社會行為測試焦慮感的行為：

若藥物焦慮感，因而不安褪縮的行為，可藉由測試其與同伴的互動頻率來評估。依照guy及gardner(1995)之方法，在尚未給藥前，先將二隻鼯鼠放置測試籠內，照射微弱紅光(40W)，記錄其互動，包括互相聞味，修飾或攀爬動作，記錄五分鐘內發生頻率，作為基本值。經過藥物處理後的鼯鼠，另外換一隻新的未處理藥物的同伴，一起放置於測試籠內，記錄五分鐘內發生的互動頻率，與基本值比較若有生物統計的降低時，顯示藥物致使鼯鼠產生焦慮感，減少社交行為，與人類自閉症有類似的狀況。

### 三、十字迷宮及攀爬能力：

依照Shekhar(1993)方法測試，在十字迷宮內記錄鼯鼠進入開闊宮(open field)、密封宮(closed field)及中央宮(central decision area)的頻率及時段，若藥物致使焦慮感增加或抑鬱不開朗的情緒，則增加進入密封宮的頻率及時段，這是最常使用於評估焦慮不安或躁動的評估方法。另外，若有躁動行為，則攀爬及設法爬出測試籠機率也會變高。

### 四、鼯鼠活動量之測定

運動量之測定是使用我們實驗室的研究方法(Chuu et al. 2001)<sup>21</sup>，使用動物運動量測定裝置(TruScan photobeam Tracking)記錄，鼯鼠腹腔注射不同劑量之PMMA(10-50mg/kg/day)，或餵食乙醇(10%-30%, 10ml/kg/day)單用或併用依照產生作用大小，再調整劑量，各種活動行為的變化(包括垂直和平行的走動，自體旋轉，重復性擺動，移動頻率，移動速

度，習慣性姿勢），本儀器自動記錄用來評估毒品對運動活性和行為表現之變化，特別是針對毒品對活動量及致毒之行為表徵。注射毒品約10分鐘後將動物放入裝置內適應5分鐘，再開始記錄，觀察並連續記錄1小時。（每隔10分鐘記錄一次move episodes、move time、move distance、jumps、stereotypic episodes等），實驗時間為上午八時至下午六時。對照組均給予生理食鹽水。

### 五、水迷宮Morris water maze(測定毒品之神經毒性，對鼯鼠學習記憶之影響)

依照我們研究室的設備及方法，並依Morris方法修飾實驗<sup>22</sup>。一個大圓形游泳池（直徑2公尺，深0.6公尺），內裝水(25±1°C)達水深0.3公尺，並加2L牛乳，使水混濁，不見隱藏的月台（a hidden escape platform，直徑21公分），埋在1/4區隔之中央位置，台面距水面1公分，該游泳池區隔四等分(NE、NW、SE及SW)，鼯鼠以面向池邊放入水中，使之自由游泳，記錄其發現月台之時間，或以90秒為限，就將該鼠抓起，放在月台上，如此每天訓練四次，連續訓練九天。分別計算每天四次找到月台所需時間的平均值，由於學習及記憶，所需時間愈來愈縮短(memory consolidation)，但若遭受到毒品傷害，導致學習記憶變差時，就可能使尋找時間曲線圖的slope減緩。我們計畫注射毒品或在學習過程中，每日繼續注射一次，連續五日或九日，以評估毒品對學習及記憶的影響。在九日學習後，即第36次游泳後24小時，將月台移走，測量90秒內鼯鼠在游泳池中，那一個區域(NE、NW、SE、SW)所花的時間最多(probe trial)，若是在原先放置月台之區域所停留的時間比別的區域長，則表示該小鼠記得月台放置的位置，若停止訓練後不同時段，測其對月台位置的記憶可維持多久(memory retention)，如此，可測知毒品對記憶獲得及記憶保留的影響。

### 六、測量脂質過氧化、NO及Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase活性：

#### (一) 組織脂質過氧化(Lipid per-oxidation)之測定：

脂質過氧化(Lipid per-oxidation)之測定是參考參考Kim, et al., 2001.等人的方法<sup>24</sup>加以修飾。鼯鼠在給予藥物後，利用pentobarbital (50mg/Kg)麻醉後，將鼯鼠犧牲並取出其腦部組織至於-70°C冰箱中保存。將不同部位之組織（大、小腦、腦幹）取100毫克置於1ml之緩衝液中，以均質機將其均質化。取20ul之均質液於96-Well中，加入65ul R1 reagent (10.3 mM N-methyl-2-phenylindole in acetonitrile)

及15ul 37% HCl，於45°C反應60分鐘後，利用ELISA Reader-測定590nm吸光值，並用BCA kit校正樣品之總蛋白質量(Total protein)。

### (二) 一氧化氮(NO)測定：

腦部一氧化氮分析方法是依據我們實驗室之研究方法(Chuu et al., 2001. and Young et al., 2001.)<sup>21, 25</sup>。鼯鼠在給予藥物後，利用pentobarbital (50mg/Kg)麻醉後，將鼯鼠犧牲並取出腦部組織置於-70°C冰箱中保存。將不同部位之組織(大、小腦、腦幹)取100毫克置於1ml之緩衝液中，以均質機將其均質化。取出均質液100 $\mu$ l並加入4°C過氯酸(0.4N HClO<sub>4</sub>)100 $\mu$ l去蛋白質，以12000rpm速度離心，取上清液10 $\mu$ l，注入一氧化氮分析儀(NO<sub>A</sub>-280)，在VCl<sub>3</sub>還原作用下，將NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>還原成NO<sup>-</sup>，再與O<sub>3</sub>反應成活化態NO<sub>2</sub>，以化學發光感測器偵測NO<sub>2</sub>的濃度。

### (三) 血中一氧化氮變化測定：

血中一氧化氮(NO)濃度依我們已發表之方法測定(Chuu.et.al., 2001)<sup>21</sup>：鼯鼠在給予藥物後，取鼯鼠眼窩靜脈血75ul，加95%酒精75ul (1:1)，混合均勻後，置入4°C冰箱約12-16小時去蛋白質。取出樣品，以12000rpm速度離心，取上清液10ul，注入一氧化氮分析儀(NO<sub>A</sub>-280)，在VCl<sub>3</sub>還原作用下，將NO<sub>2</sub><sup>-</sup>及NO<sub>3</sub><sup>-</sup>還原成NO<sup>-</sup>，再與O<sub>3</sub>反應成活化態NO<sub>2</sub>，以化學發光感測器偵測NO<sub>2</sub>的濃度。給予藥物組與對照組之血中NO比較研究之。

### (四) Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - ATPase測定：

依據我們實驗室之研究方法(Young et al.,2001.)<sup>25</sup>參考Balestrino et al. 1999<sup>26</sup>及Liang and Knox, 1999<sup>27</sup>等人法加以修飾。以ATP為substrate，測反應後磷酸(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)產生的量。以Malachite green (0.045%)，4.5% Ammonium Molybdate做為PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>的呈色劑，用34% sodium citrate來終止ATPase的反應，使用spectrophotometer測630nm的吸光值。用ouabain (1mM)抑制Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity，因此測得Mg<sup>2+</sup>-ATPase，另一組沒加Ouabain所得的值為Total Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase，二者相減即為Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity，以尋求給予藥物後對鼯鼠腦及其他組織之Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase活性所造成之影響。

## 七、以ICP/mass方法測汞含量：

按照我們實驗室已發表的方法<sup>11, 12</sup>先將樣品預先處理後，再請清大以ICP/mass測總汞含量。

有關水飛砵砂在鼯鼠體內吸收及排泄的研究，我們將依據以前的研

究結果，先選擇硃砂劑量0.1g/kg/day，（若有需要或增加或減少劑量，以便調節適當劑量），每組鼯鼠約6-8隻，連續餵食五天，在餵食硃砂前一天(Day 0)，先於代謝籠集尿液及糞便，以便測量汞的正常對照基本值，接著每隔1日(day2, day4, day6)，再收集尿液及糞便，鼯鼠於day6 sacrificed後，收集血液，並分離肝、腎、心、肺及腦組織，以便定量汞總含量。樣品的預先處理：秤取適量組織（約1公克），或1ml全血或1ml尿液、糞便（0.01-0.1公克，或視汞含量而調整）。加王水後，放置57-62°C處置，詳細步驟請參考已發表的論文11, 12之後，再以ICP/macs或Zeeman atomic absorption spectrophotometer（汞含量較高者如糞便）定量汞含量，硃砂的吸收有分率之計算：以餵食硃砂的總量，除各組織及體液之汞總含量，以百分比表示之。硃砂的排泄量，則由三次(day2, day4, day6)尿液及糞便之汞含量，以內插法，估計day1, day3及day5的排泄量，再把這些排泄量總和，除以餵食硃砂總量，可計算排泄量佔餵食總量的百分比。除此之外，我們將由腦組織中汞含量，與硃砂對鼯鼠產生神經行為的變異的大小對照，其間之相關性，將與文獻上所發表甲基汞對神經行為有作用時，其腦組織的汞含量作比照探討其相關。

#### 八、實驗數據統計：

實驗數據以平均值±標準偏差(Mean±S.E.)表示，而每組實驗數目皆在三次以上。實驗組別相互間之差異以ANOVA followed by Dunnett加以評估， $P < 0.05$ 者表示具統計學上的差異。

## 參、研究結果

### 一、砒砂元素分析

三種市售砒砂之元素分析結果如表一，砒砂A、B及C之比較結果，顯示砒砂A、B及C所含有毒元素如Pb (ppm)分別為611、401及8，As (ppm)為2.4、0.7及0.17，Cd (ppm)為3.5、3.2及0.23，而Hg (ppm,mg/g)分別為650565 (995)、550465 (805)及625000 (916) (圖二)。結果顯示砒砂產生鎮靜作用的有效量約10mg/kg/day，此劑量連續給予五周左右，才產生神經毒性，因此，本計畫選擇實驗的劑量分別為30、100及300mg/kg/day，連續餵食十八日，同時收集尿液及糞便，然後犧牲鼯鼠，取各組織器官，血液及毛髮，並作汞含量分析，計算砒砂吸收，排泄及組之分布。

### 二、鼯鼠活動量，跳躍及探索行為

如圖二所示，三種不同劑量(30、100、300mg/kg/day)的砒砂餵食十八天，對鼯鼠體重沒有意義的影響，鼯鼠毛髮各種行為動作也都正常。而活動量只有些許下降(圖三)，休止期略增(圖四)，而跳躍探索行為在後期有明顯下降作用(圖五)，垂直探索行為也在後期有下降。

### 三、鼯鼠情緒，攀爬及運動平衡功能

鼯鼠在十字迷宮自由行動，選擇留在開放室(open field)任其探索觀望(情緒開朗活潑)或留在密室(close field)冷靜或嚴重時有抑鬱現象，結果如圖七所示，砒砂有輕微的使鼯鼠花在開放室稍短(圖七A)，而在密室時間稍長(圖七B)。對攀爬能力有些許促進(圖八)，但對運動平衡功能沒有意義的影響(圖九)。

### 四、鼯鼠水迷宮學習記憶的行為

鼯鼠在水迷宮尋找平台的所需時間，顯示其學習記憶的功能，實驗結果發現砒砂餵食十天，對鼯鼠學習記憶不具有意義的影響(圖十A及B)，但在砒砂餵食十五天及十七天時，可明顯延長找到平台所需量的時間(圖十C及D)。

### 五、鼯鼠腦組織訊息傳遞生化質

鼯鼠腦組織氧自由基產生量，低劑量砒砂(30mg/kg/day)不具影響

(圖十一)，但高劑量(100/mg/kg/day)，則有明顯抑制作用，對NO產生量，腦組織不同部位的變化有異(圖十二)，一般而言，低劑量硃砂是促進但高劑量硃砂有減少NO的產生量。硃砂對NO生成酶活性影響(圖十三)，三種劑量均有促進作用。硃砂對 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性影響(圖十四)，依硃砂不同劑量及腦組織不同部位之作用有異，在大腦皮質，小腦及腦橋是抑制作用，但在紋狀體及海馬迴有促進作用，然而硃砂在 $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ 活性比較不明顯，只有在紋狀體，低劑量硃砂呈促進而高濃度呈抑制作用(圖十二B)。

#### 六、硃砂吸收率及麩鼠各組織Hg含量

硃砂以三種不同劑量(0.03、0.1及0.3g/kg/day)，餵食十八天後，測定各組織Hg之總含量(如圖十五至圖二十五)所示，分別顯示腦，心臟，肝臟，腎臟，胃，腸，脾臟，血液，毛髮及尿液中Hg總含量。計算各別組織Hg含量為各組織Hg總量之百分比，如圖二十五A、B及C所示，以腎臟Hg含量百分比為最高，其次依序遞減如下：毛髮，血液，肝臟，腸，尿液，腦，胃，心臟及脾臟。測量糞便中Hg含量是為硃砂未被吸收之排泄量(如圖二十六)所示，硃砂低劑量0.03及0.1g/kg/day之總排泄量分別為95.5%及94.5%，而高劑量(0.3g/kg/day)之硃砂，排泄量增至98.4%，因此，三種不同劑量硃砂的吸收百分比，以低劑量比高劑量良好，分別為4.9%、5.5%及1.65%。

另外，分析每日尿液及糞便含Hg，顯示Hg含量隨著累積餵食而逐漸增加(圖二十四)，總和尿液及糞便Hg總含量的結果，顯示與餵食的劑量成比例。

## 肆、研究討論

- 一、市售水飛硃砂含鉛鎘量差異很大，將來必須制定法規，定鉛鎘含量上限。
- 二、硃砂在腸胃吸收因劑量而異，低劑量5%左右，高劑量只有1.6%。
- 三、硃砂在腸胃吸收遠比甲基汞差（大於90%），此實驗證據說明硃砂毒性遠比甲基汞少，不應把硃砂歸納於劇毒的汞化物。
- 四、有關硃砂降低活動量（鎮靜安神作用）及其他神經行為之作用，是很重要的議題，依照我們過去初步的研究，有些行為作用是可逆性的，如分別餵食(1g/kg/day)鼯鼠硃砂及HgS13天後，測活動量有降低活動量，前者是不可逆性，但後者是可逆性(Chuu et al.2001)<sup>24</sup>。顯示不同神經毒性的可逆性有差異，這些是我們實驗室使用大劑量硃砂所得的初步結果，至於在臨床小劑量的硃砂作用之可逆性，應該專題研究來揭密才適當。但我們必須強調硃砂品質非常有關係，有些是受硃砂含重金屬，有可能導致不可逆性傷害，由本研究結果及過去歷年的實驗結果，初步評估：
  - (一) 在嚴格管制的優良水飛硃砂。
  - (二) 中醫師嚴謹的調控硃砂劑量。
  - (三) 短暫的使用期限限制（5-7天）。
  - (四) 現仍無硃砂的取代品。

硃砂在中醫藥品項可考慮存在，但此重要議題仍須再以專題做進一步的研究。

## 伍、研究結論與建議

本研究計的重點在於探討水飛硃砂餵食後，在鼯鼠體內吸收，排泄及各組織分佈。首先我們分析市售三種水飛珠砂A、B、C、D（代號），以ICP/mass分析汞含量及其他微量元素，結果發現此三種硃砂含Pb量差異很大、最高為611ppm、其次401ppm及8ppm、而Cd含量依序為3.5、3.2及0.23ppm因此，選擇硃砂C作本實驗的材料，此結果顯示市售硃砂的品質仍然有差異，因此有必要訂定法規，市售水飛珠砂有害重金屬的含量。

研究硃砂的吸收，排泄及組織分佈，為了組織Hg含量足夠精確定量，但在餵食硃砂期間，硃砂對肝、腎及其他組織器官之功能沒有損傷，而不影響吸收及排泄，因此，選擇適當的硃砂餵食劑量很重要，根據我們以前的實驗結果顯示，硃砂0.01g/kg/day 5週，仍未產生明顯神經毒，因此，本研究選擇硃砂三種劑量，分別為0.03、0.1及0.3g/kg/day，十八天。經過慎選水飛硃砂品系及適當劑量及餵食期間後，我們測量硃砂對鼯鼠神經行為的影響，發現只有輕微抑制活動量，跳躍探索及開放十字迷宮之停留時間，對攀爬及運動平衡功能，尚未影響。對腦組織氧自由基下降，NO及Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase活性在低劑量增加高劑量降低，鼯鼠體重正常，外觀活潑正常，所以在試驗期間，硃砂尚無明顯毒性產生。

分析鼯鼠各組織Hg總含量，發現腎及肝居高，而腦組織仍可偵測到Hg含量顯示硃砂經胃腸吸收，仍能分布於腦組織，產生神經系統的作用，硃砂與甲基汞一樣，在腎臟濃度最高，只是硃砂在胃腸吸收率只有4.5%及5.5%而高劑量只吸收1.6%顯示胃腸吸收能力仍有其極限，有能力把高劑量(0.3g/kg/day)的硃砂排出高達98.4%，這些結果產明我們之前的實驗結果，發現硃砂神經毒性比一般氯化銅，氯化鎘小，所以一般人把硃砂歸納為與甲基汞一樣劇毒，是錯誤的。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號CCMP97-RD-020提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. 唐·蘇敬等，新修本草，聯群出版社，1955。
2. 明·李時珍，本草綱目，人民衛生出版社，1957。
3. 宋·錢乙，小兒藥証直訣，人民衛生出版社，1958。
4. 神農本草經，商務印書館，台北，1955。
5. 江金德，中藥科學藥性大辭典，大眾書局，台北，1991。
6. Liu SH. Lin-Shiau SY. Studies on mercury-induced myotonia in the mouse diaphragm. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 1992; 319, 86-100.
7. Moller MB. Localization of mercury in CNS of the rat. V. Inhalation exposure to metallic mercury. *Arch Toxicol*. 1992; 66: 79-89.
8. InSug., Sugandha Datar., Cameron J. Koch., Irving M. Shapiro. And Bruce J. Shenker. Mercuric compounds inhibit human monocyte function by inducing apoptosis: evidence for formation of reactive oxygen species, development of mitochondrial membrane permeability transition and loss of reductive reserve. *Toxicology*. 1997; 124, 211-224.
9. Chuu, JJ. Yi-Ho Young, Shing-Hwa Liu, Shoei-Yn Lin-Shiau. Neurotoxicity of mercury sulfide in the vestibular ocular reflex system of guinea-pigs. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2001, 364, 249-258, 2001.
10. Chun, JJ. Shing-Hwa Liu, Shoei-Yn Lin-Shiau. Effects of methyl mercury, mercuric sulfide and cinnabar on active avoidance response, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities and tissue mercury contents in rats. *Proceedings of the National Science Council*. 2001, 25, 128-136.
11. Chuu JJ. Hsu CJ. Lin-Shiau, SY. Abnormal auditory brainstem responses in mice treated with mercurial compounds: Involvement of excessive nitric oxide. *Toxicology*. 162:11-22. 2001.
12. Young, Y.H., Chuu, J.J, Liu, S.H., AND Lin-Shiau, S.Y., Neurotoxicological mechanism of cinnabar and mercuric sulfide on vestibular-ocular reflex system in guinea-pigs. *Toxicol.Sci*. 67, 256- 263, 2001.
13. Related Articles, Links Kurt TL. ACMT position statement: the Iom report on thimerosal and autism. *J Med Toxicol*. 2006 Dec; 2(4): 170-1.
14. Related Articles, Links Harappanahally GV, Trask CL, Mandelbaum DE. Vaccines and autism: an update. *Med Health R I*. 2007 Oct; 90(10): 308-10.
15. Berman RF, Pessah IN, Mouton PR, Mav D, J., Harry J. Low Level Neonatal Thimerosal Exposure: Further Evaluation of Altered Neurotoxic Potential in

- SJL Mice. *Toxicol Sci.* 2007 Oct 31; ahead of print.
16. Thompson WW, Price C, Goodson B, Shay DK, Benson P, Hinrichsen VL, Lewis E, Eriksen E, Ray P, Marcy SM, Dunn J, Jackson LA, Lieu TA, Black S, Stewart G, Weintraub ES, Davis RL, DeStefano F; Vaccine Safety Datalink Team. Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. *N Engl J Med.* 2007 Sep 27; 357(13): 1281-92.
  17. Offit PA. Thimerosal and vaccines—a cautionary tale. *N Engl J Med.* 2007 Sep 27; 357(13): 1278-9.
  18. Geier DA, Geier MR., A prospective study of thimerosal-containing Rho(D)-immune globulin administration as a risk factor for autistic disorders., *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007 May; 20(5): 385-90.
  19. National Advisory Committee on Immunization (NACI)., Thimerosal: updated statement. An Advisory Committee Statement (ACS). *Can Commun Dis Rep.* 2007 Jul 1; 33(ACS-6): 1-13.
  20. Guy AP, Gardner CR (1985) Pharmacological characterization of a modified social interaction model of anxiety in the rat. *Neuropsychobiology* 13: 194-200.
  21. Shekhar A (1993) GABA receptors in the region of the dorsomedial hypothalamus of rats regulate anxiety in the elevated plus-maze test. I. Behavioral measures. *Brain Res* 627:9-16.
  22. Morris, R.G.M. Development of a watermaze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47-60, 1984.
  23. Kim HJ.,Soh Y.,Jang JH., Lee JS.,Oh YJ. and Surh YJ. Differential Cell Death Induced by Salsolinol with and without Copper: Possible Role of Reactive Oxygen Species. *Mol Pharmacol* 60: 440-449, 2001.
  24. Jiunn-Jye CHUU, Shing-Hwa LIU and Shoei-Yn LIN-SHIAU. Effects of Methyl Mercury, Mercuric Sulfide and Cinnabar on Active Avoidance Responses, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activities and Tissue Mercury Contents in Rats. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC (B)*, 25, 128-136, 2001.

## 柒、表、圖

表一、市售三種硃砂的金屬成分及含量之偵測（單位ppm）

| 原藥廠名稱 | …水飛硃砂      | …硃砂        | …辰砂        |
|-------|------------|------------|------------|
| 代號    | Cinnabar-A | Cinnabar-B | Cinnabar-C |
| Hg    | 650565     | 550465     | 625000     |
| Sb    | 84.7       | 24.1       | 1.14       |
| Ca    | 54.0       | 32.8       | 17.1       |
| Pb    | 610.6      | 401        | 7.96       |
| Se    | 156.8      | 5.79       | 3.24       |
| Mg    | 33.0       | 20.84      | 4.72       |
| Zn    | 37.5       | 30.1       | 3.24       |
| As    | 2.39       | 0.70       | 0.17       |
| Cd    | 3.53       | 3.24       | 0.23       |
| Te    | 1.03       | 0.56       | 0.12       |
| Cu    | 1.03       | 0.74       | 0.40       |
| W     | 0.63       | 0.74       | 0.29       |

表二、各組織Hg含量

| 劑量(mg/kg/day) | Hg content(mean+SE) |          |              |         |              |
|---------------|---------------------|----------|--------------|---------|--------------|
|               | Brain               | Heart    | Kidney       | Spleen  | Liver        |
| SALINE        | 30.2+2.2            | 6.5+0.9  | 51.7+5.3     | -0.2    | 26.4+6.9     |
| CINNABAR 30   | 21.7+4.8            | 4.4+0.5  | 223.2+47.8   | 1.9+0.2 | 86.9+22.8    |
| CINNABAR 100  | 64.8+1.5            | 23.2+5.4 | 544.8+329.6  | 3.3+0.6 | 332.3+119.4  |
| CINNABAR 300  | 190.0               | 79.7     | 1744.5+154.3 | 8.2+1.9 | 1481.6+704.6 |

表三、各組織Hg含量

| 劑量(mg/kg/day) | Hg content(mean+SE) |            |            |              |
|---------------|---------------------|------------|------------|--------------|
|               | Stomach             | Intestine  | Hair       | blood        |
| SALINE        | -13.4               | 15.8       | 140.8      | 13.9+6.6     |
| CINNABAR 30   | 6.2                 | 100.0      | 102.9+6.3  | 111.9+8.1    |
| CINNABAR 100  | 90.7+15.5           | 324.2+82.4 | 347.8      | 286.6+167.1  |
| CINNABAR 300  | 155.8+3.6           | 1032.7+6   | 1744.6+0.6 | 1071.6+220.8 |

表四、各組織重量

| 劑量<br>(mg/kg/) | 組織重量   |               |              |        |              |               |              |              |                |
|----------------|--------|---------------|--------------|--------|--------------|---------------|--------------|--------------|----------------|
|                | Brain  | Heart         | Kidney       | Spleen | Liver        | Stomach       | Intestine    | Hair         | blood(ul)      |
| SALINE         | 39±6.2 | 219±9.1       | 344±34.      | 92±9.3 | 378±38.      | 284±21        | 281±30.      | 138±12       | 480±86.2       |
| CINNABA<br>R   | 38±9.3 | 191±14        | 390±18.<br>4 | 89±6.2 | 394±26.<br>7 | 265±13.7<br>8 | 340±28.<br>3 | 142±23.<br>3 | 880±177.2      |
| CINNABA<br>R   | 68±3.7 | 266±29.3      | 375±28.<br>3 | 182±15 | 495±29.<br>4 | 539±25.9      | 539±25.<br>9 | 140±28.<br>6 | 1040±186       |
| CINNABA<br>R   | 45±2.7 | 201±11.2<br>2 | 309±16.<br>1 | 120±10 | 431±37.<br>2 | 269±5.33      | 445±51.<br>1 | 142±22.<br>2 | 1040±276.<br>8 |

表五、尿液Hg含量

| 劑量(mg/kg/day) | Hg含量   |       |       |       |        |       |
|---------------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|
|               | 0      | 1     | 3     | 7     | 9      | 16    |
| day           |        |       |       |       |        |       |
| SALINE        | -0.063 | 0.233 | 0.139 | 0.133 | 0.118  | 0.167 |
| CINNABAR 30   | -0.155 | 12.57 | 10.01 | 15.84 | 33.92  | 33.92 |
| CINNABAR 100  | -0.063 | 15.69 | 21.87 | 21.13 | 48.33  | 48.33 |
| CINNABAR 300  | -0.175 | 36.19 | 28.73 | 67.92 | 101.17 |       |

表六、尿液容量

| 劑量(mg/kg/day) | 尿液容量(ul)(mean+SE) |
|---------------|-------------------|
| SALINE        | 323.9+85.3        |
| CINNABAR 30   | 228.9+77.3        |
| CINNABAR 100  | 196.4+73.5        |
| CINNABAR 300  | 291.1+73.9        |

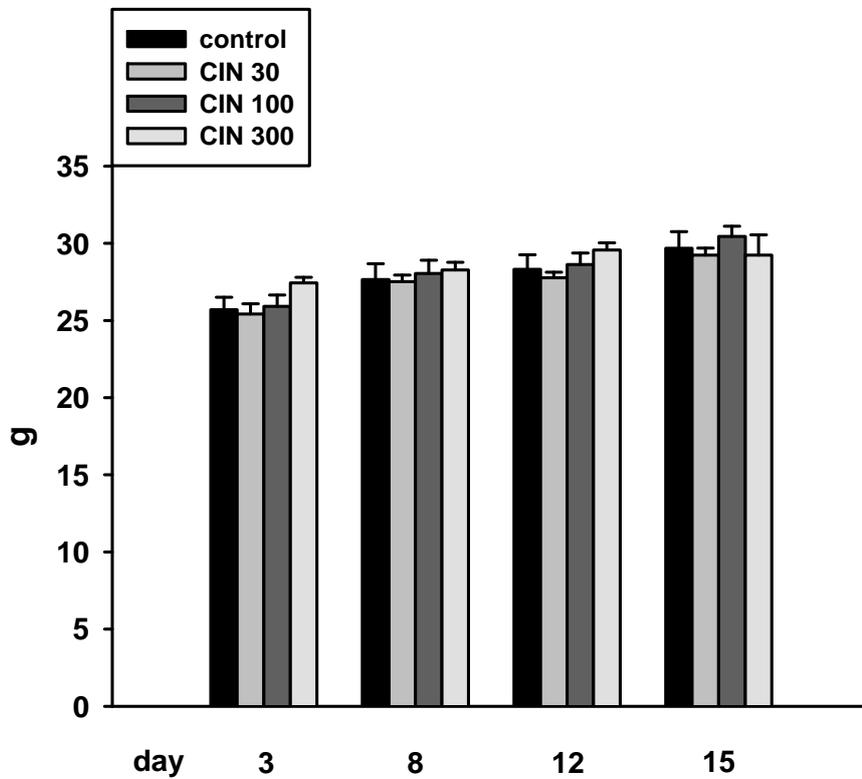
表七、糞便Hg含量

| 劑量(mg/kg/day) | Hg 含量  |        |         |         |          |           |
|---------------|--------|--------|---------|---------|----------|-----------|
|               | 0      | 1      | 3       | 7       | 9        | 15        |
| day           |        |        |         |         |          |           |
| SALINE        | -0.019 | -0.003 | -0.029  | 0       | -0.031   | 0.147     |
| CINNABAR 30   | -0.022 | 0.0896 | 0.1488  | 0.9408  | 0.9408   | 12.992    |
| CINNABAR 100  | -0.009 | 0.744  | 2.0592  | 3.432   | 9.3184   | 16.128    |
| CINNABAR 300  | -0.029 | 5.9904 | 56.2848 | 68.3928 | 103.3472 | 469.37376 |

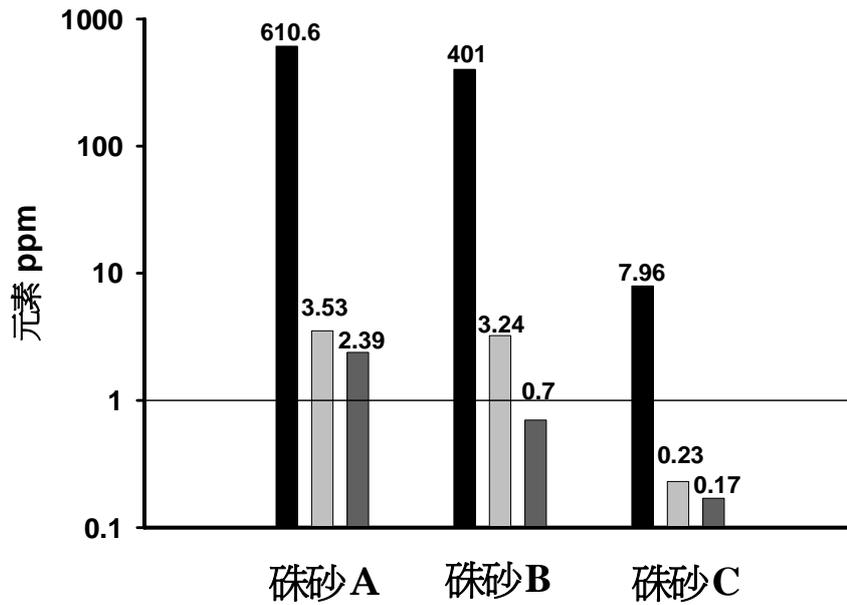
表八、糞便重量

| 劑量(mg/kg/day) | 糞便容量(mg)(mean±SE) |
|---------------|-------------------|
| SALINE        | 178.8±53.8        |
| CINNABAR 30   | 100.4±28.6        |
| CINNABAR 100  | 94.4±23.1         |
| CINNABAR 300  | 81.5±21.5         |

body weight

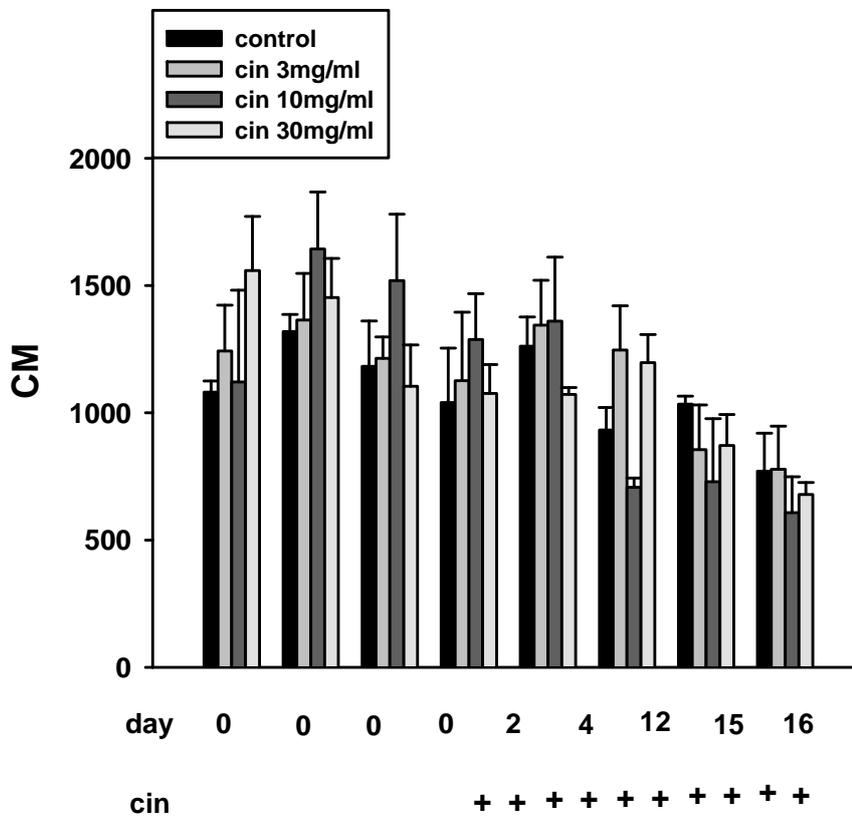


圖一 小鼠體重變化



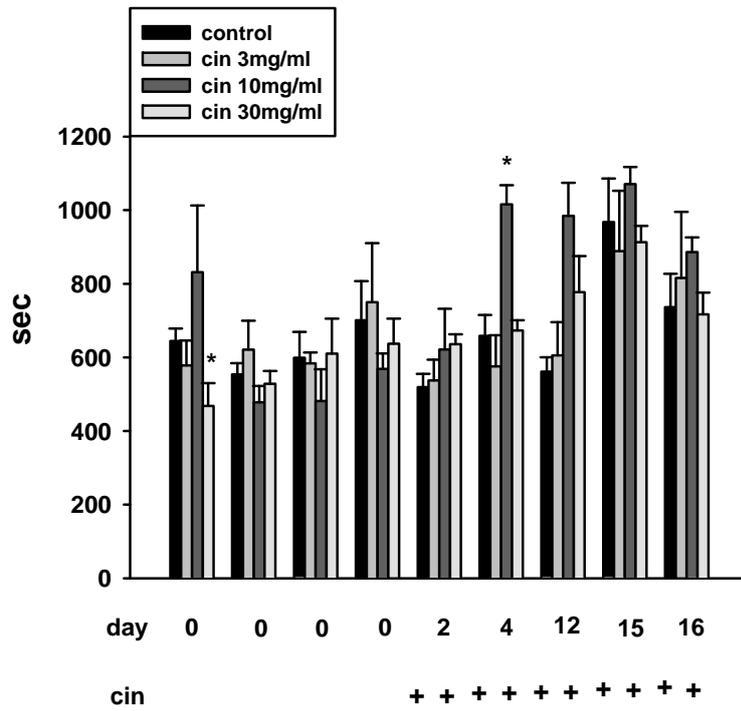
圖二 三種硃砂含 Pd.Cd.As 之比較

EAB AML\_DISTANCE



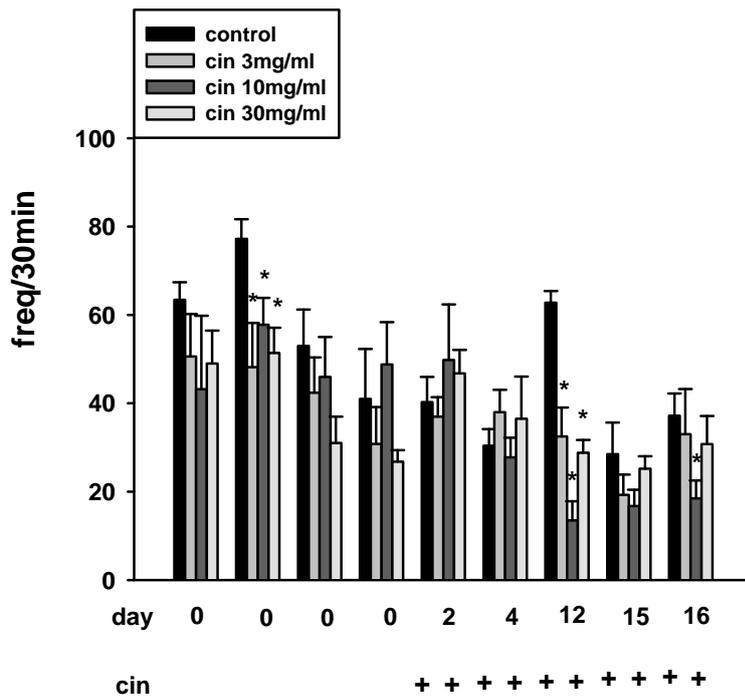
圖三 硃砂對鼯鼠活動量的影響

### REST\_TIME



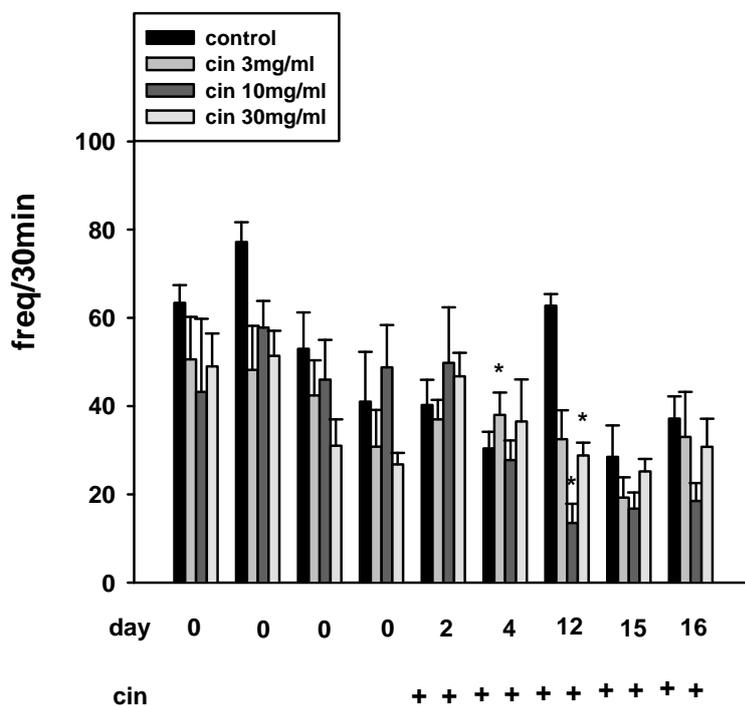
圖四 硃砂對鼯鼠休止期的影響

### JUMPS



圖五 硃砂對鼯鼠跳躍探索行為的影響

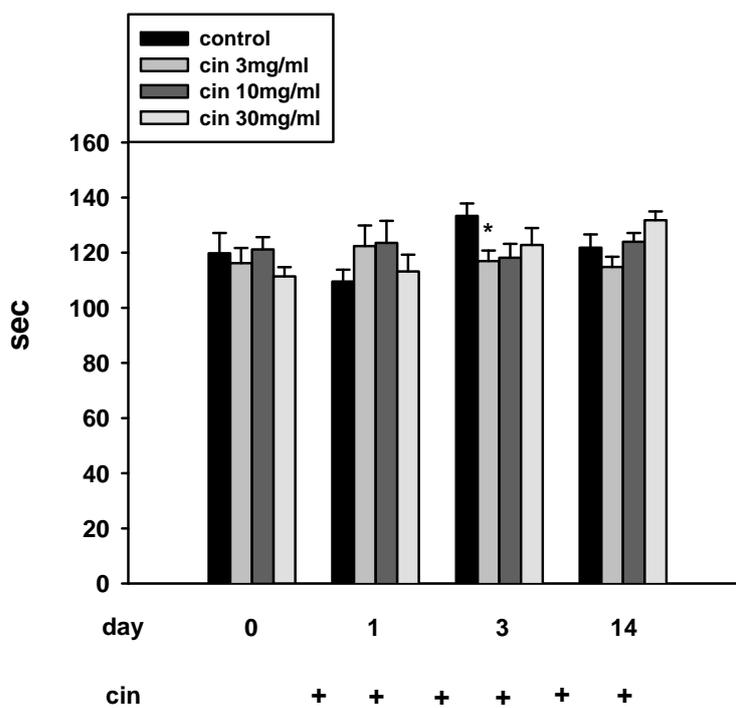
### V-PLANE\_ENTRIES



圖六、硃砂對鼯鼠垂直探索行為的影響

A

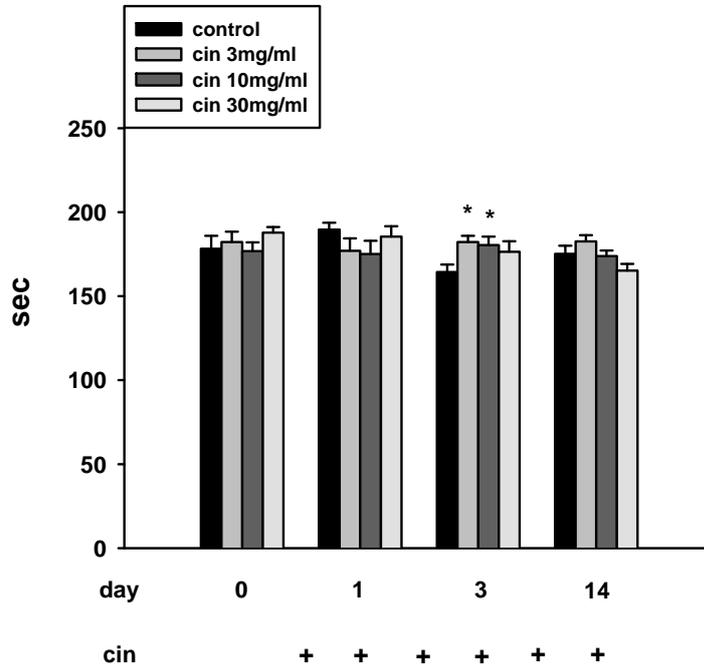
### PLUS MAZE(open field)



圖七-A、硃砂對鼯鼠在開放十字迷宮停留期間的影響

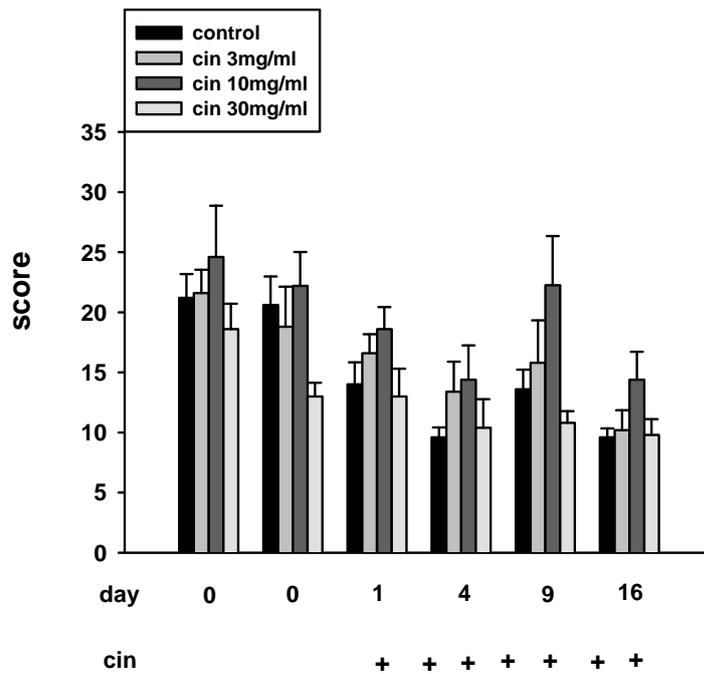
B

PLUS MAZE(close field)



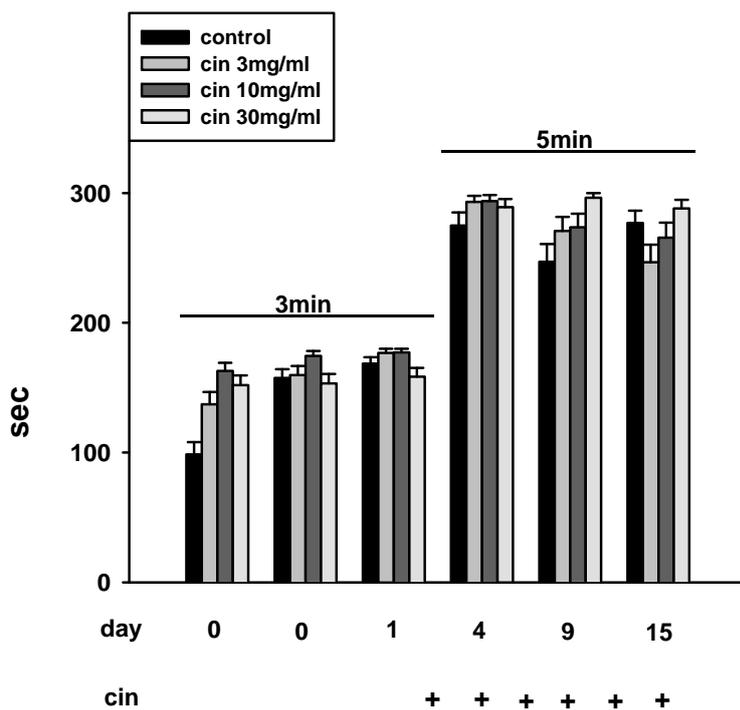
圖七-B 硃砂對鼯鼠在密室十字迷宮停留期間的影響

CLIMBING



圖八 硃砂對鼯鼠攀爬能力的影響

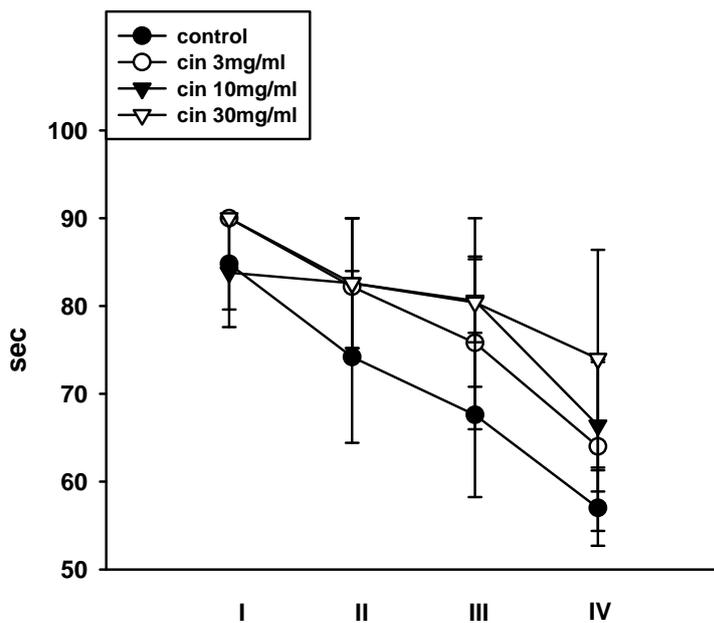
EAB rotarod 60rpm retention time



圖九 硃砂對鼯鼠運動平衡功能的影響

A

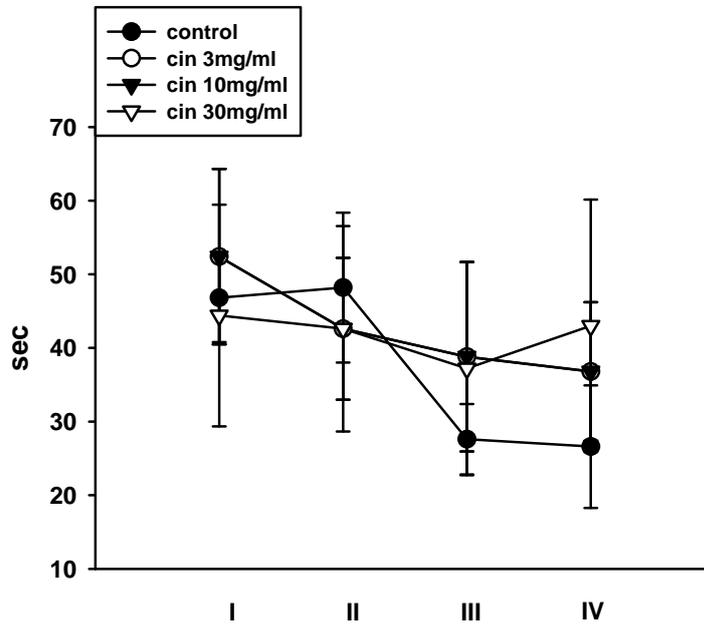
EAB water maze(day0) 給藥前



圖十-A-D 硃砂對鼯鼠水迷宮學習記憶的影響

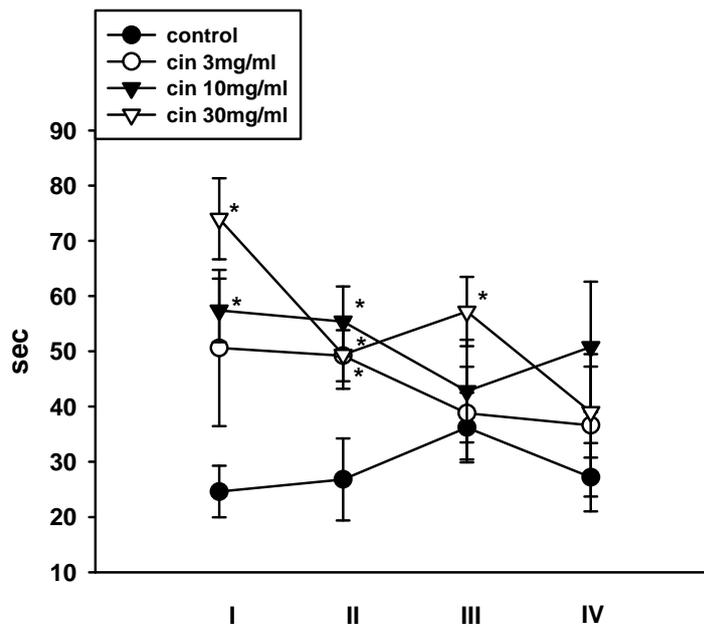
B

water maze (day10)



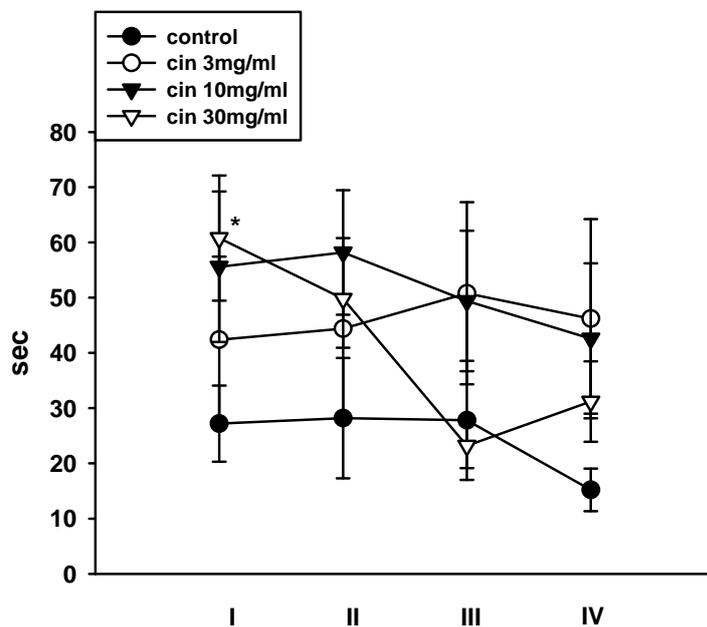
C

water maze (day15)

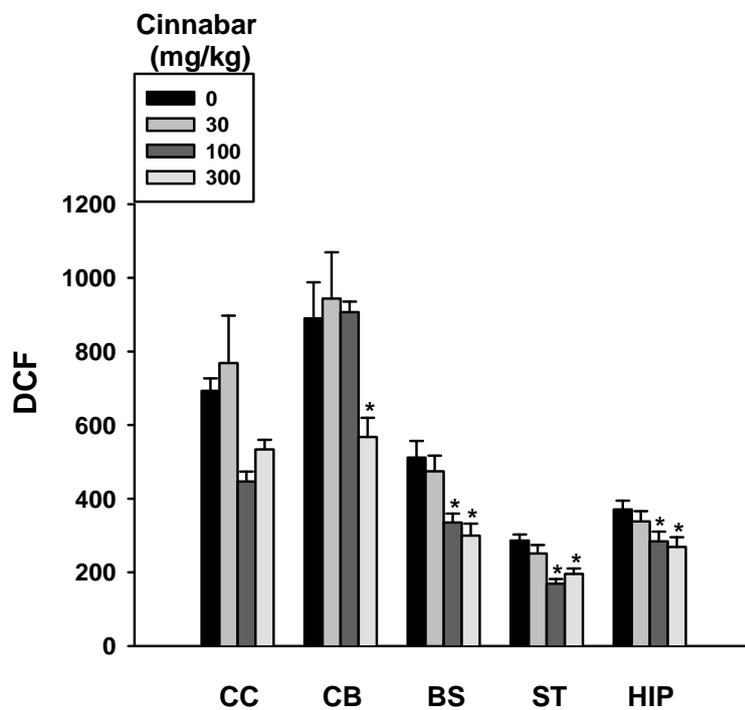


D

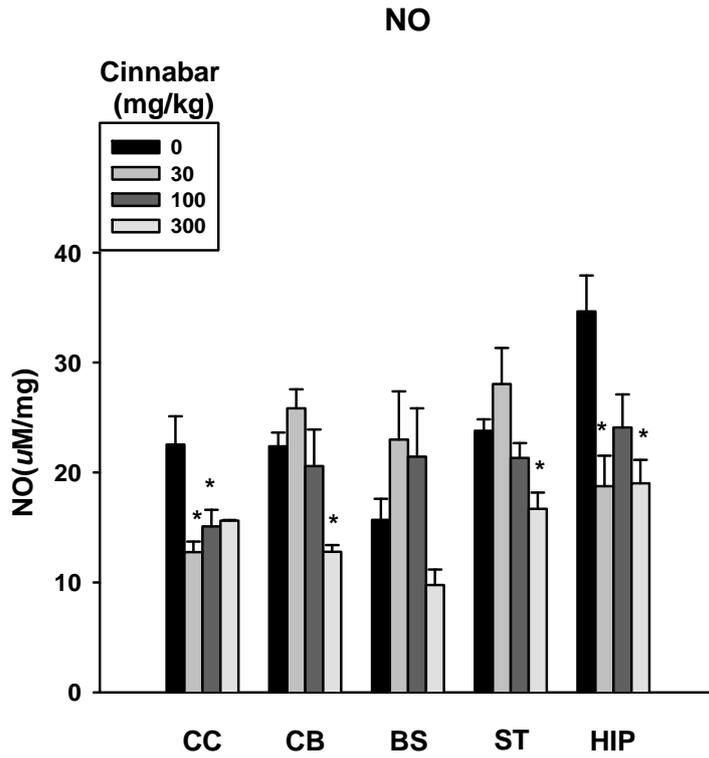
water maze (day17)



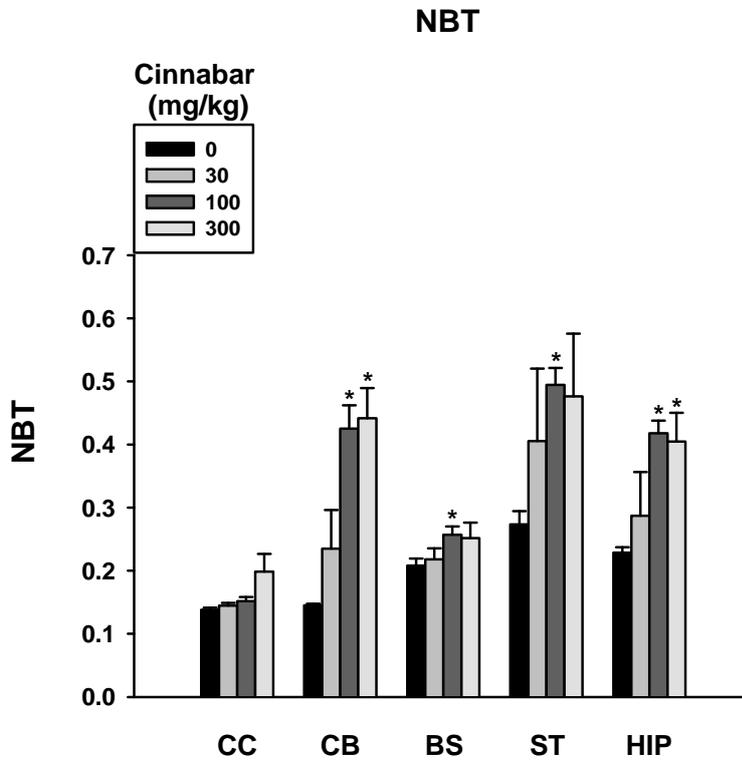
DCF



圖十一 硃砂對小鼠腦組織氧自由基的影響

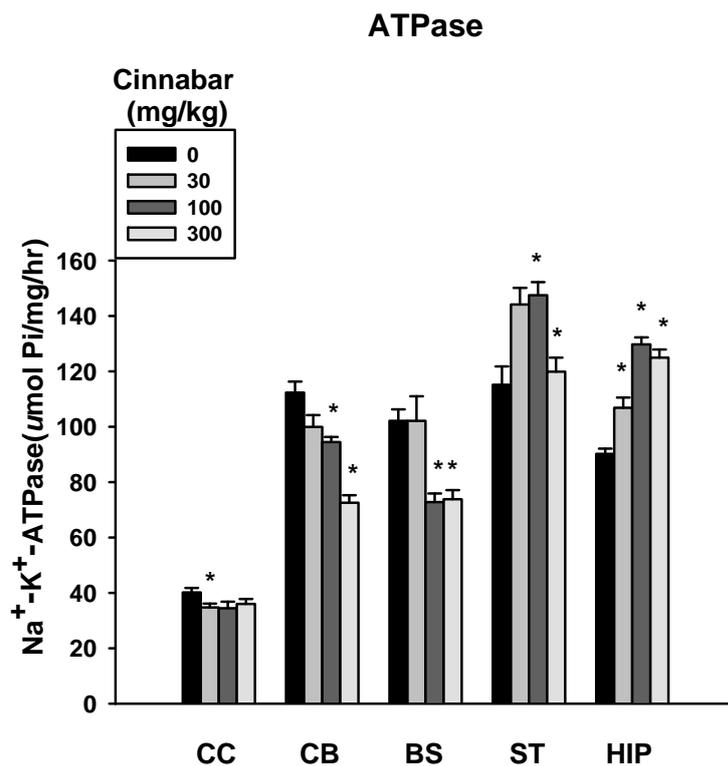


圖十二 硃砂對小鼠一氧化氮產生的影響



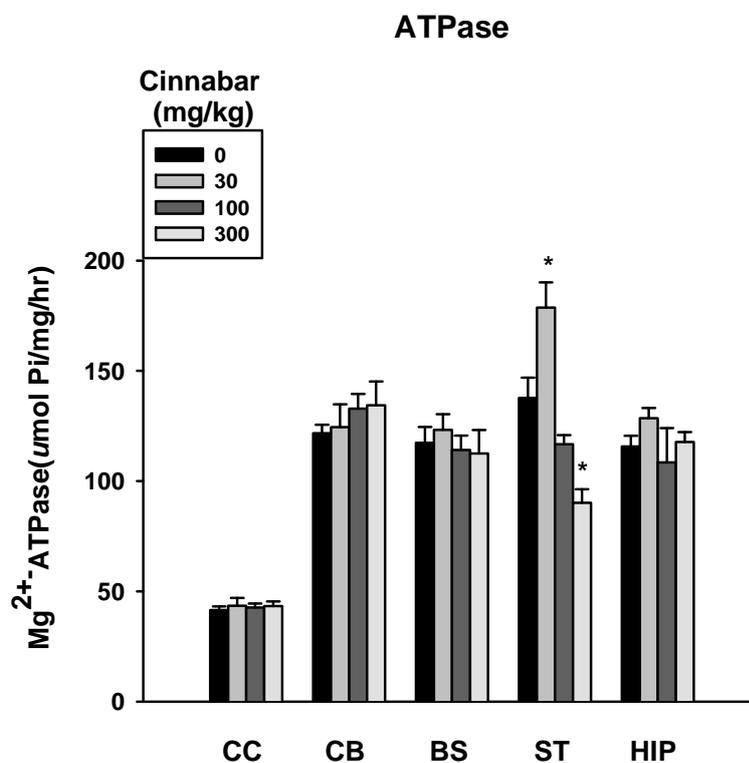
圖十三 硃砂對小鼠 NO 合成酶產生的影響

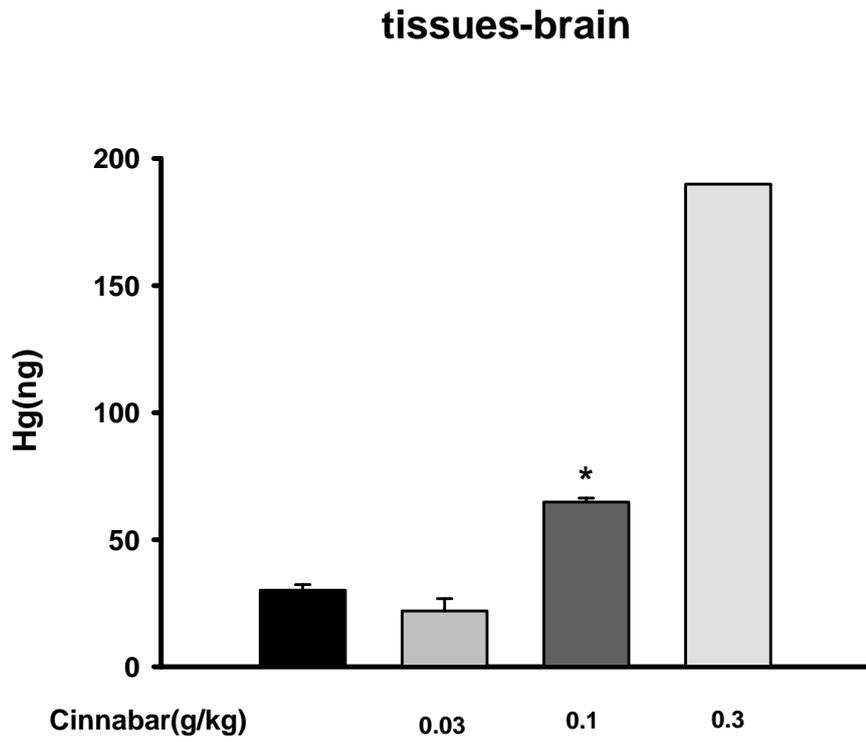
A



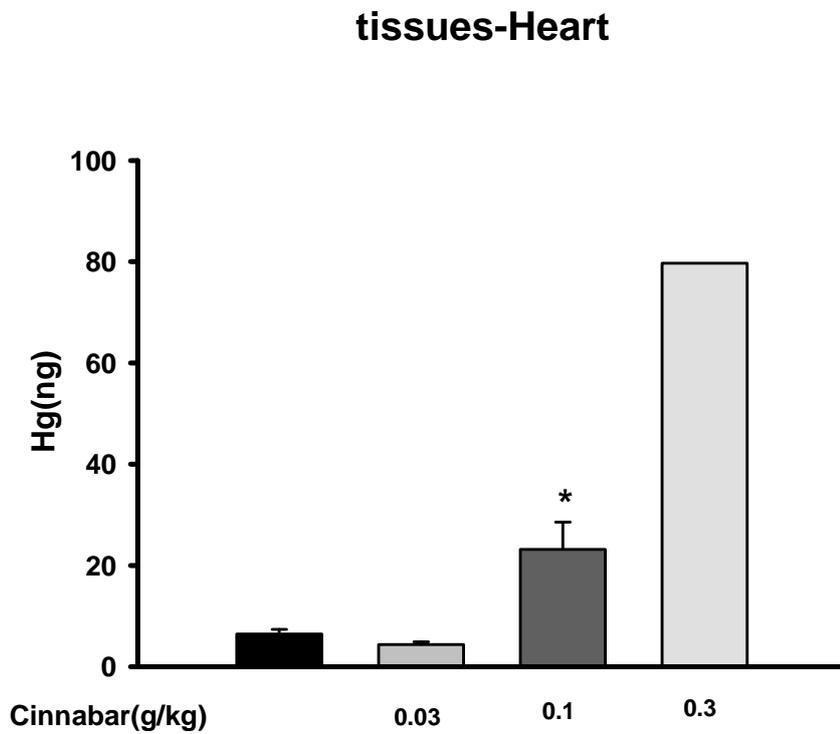
圖十四 硃砂對鼯鼠  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  及  $\text{Mg}^{2+}\text{-ATPase}$  活性產生的影響

B



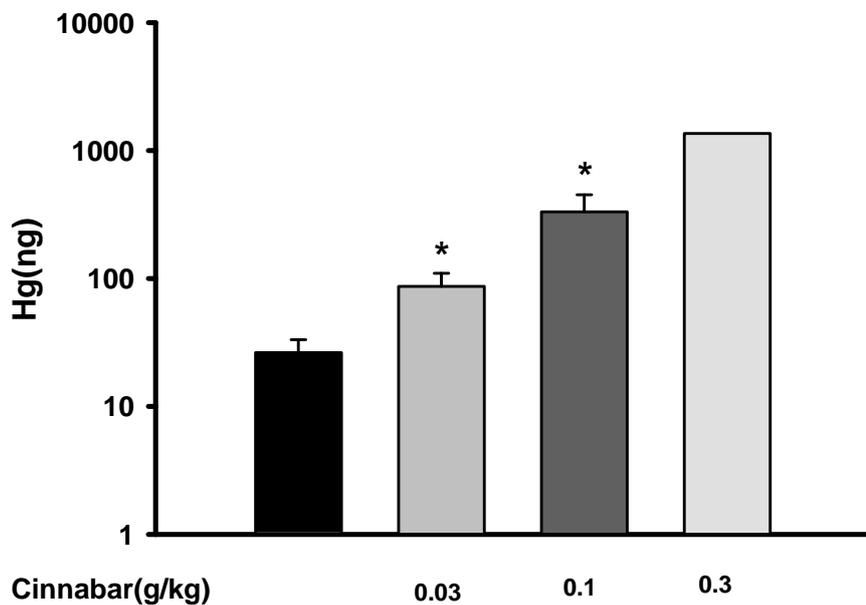


圖十五 鼯鼠腦組織 Hg 總含量



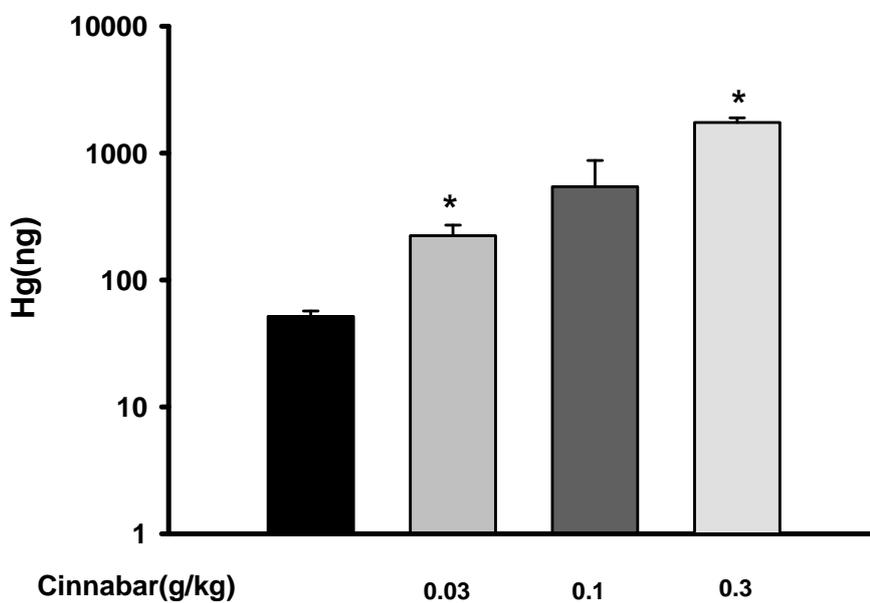
圖十六 鼯鼠心臟組織 Hg 總含量

### tissues-Liver



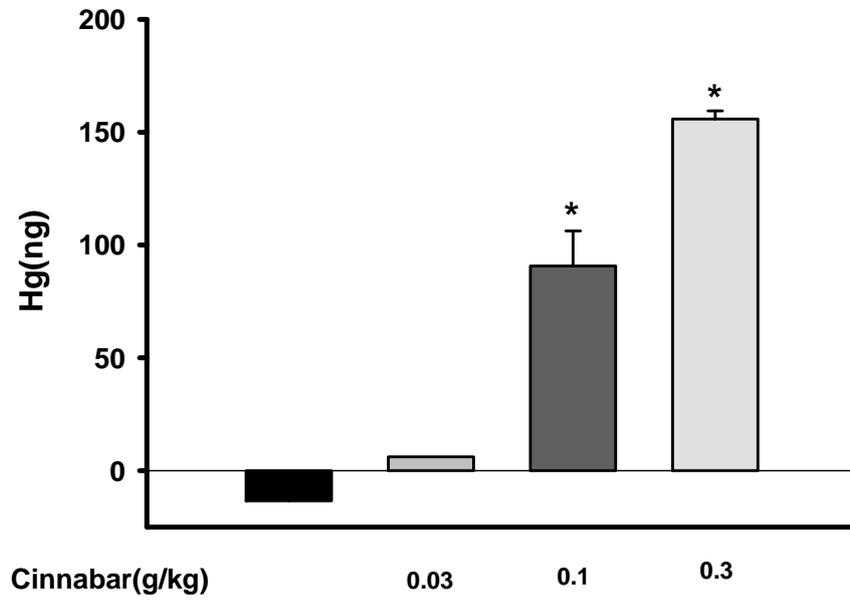
圖十七、鼯鼠肝臟組織 Hg 總含量

### tissues-Kidney



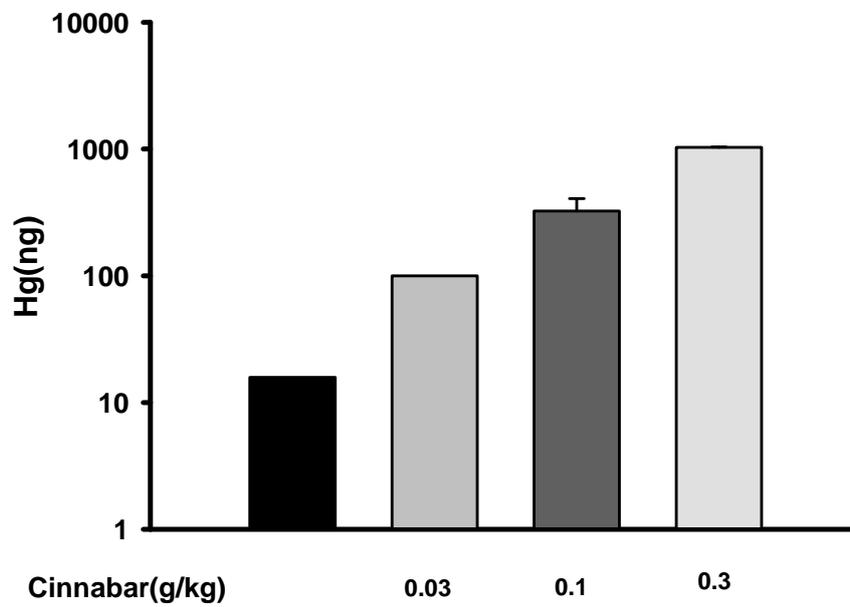
圖十八、鼯鼠腎臟組織 Hg 總含量

### tissues-stomach



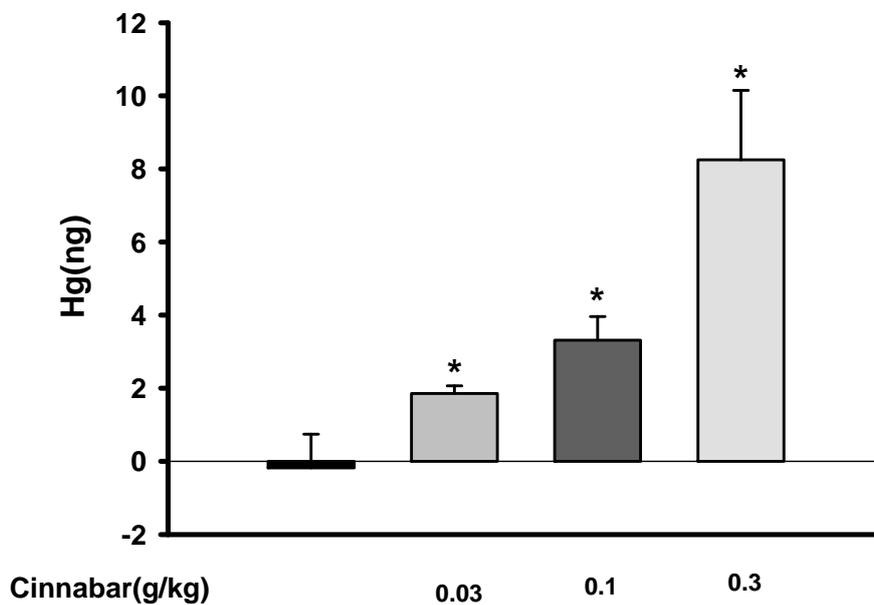
圖十九、鼯鼠胃組織 Hg 總含量

### tissues-intestine



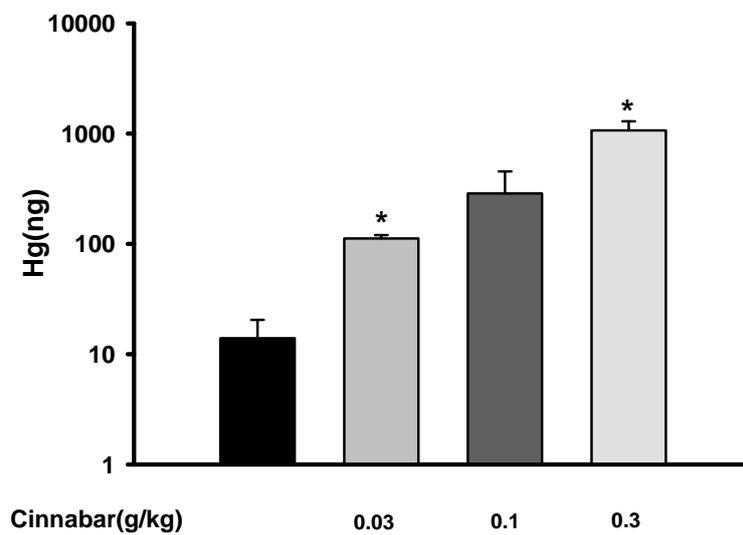
圖二十、鼯鼠腸組織 Hg 總含量

### tissues-spleen

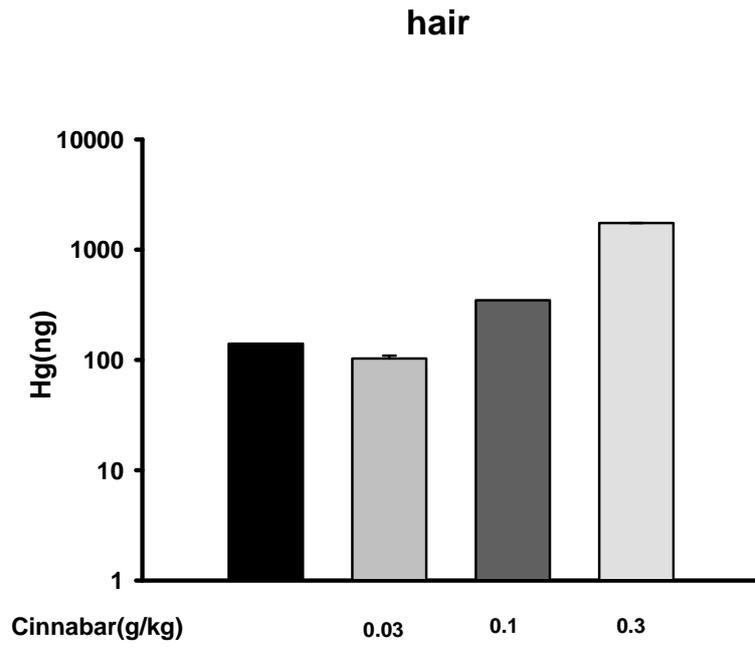


圖二十一、鼯鼠脾臟組織 Hg 總含量

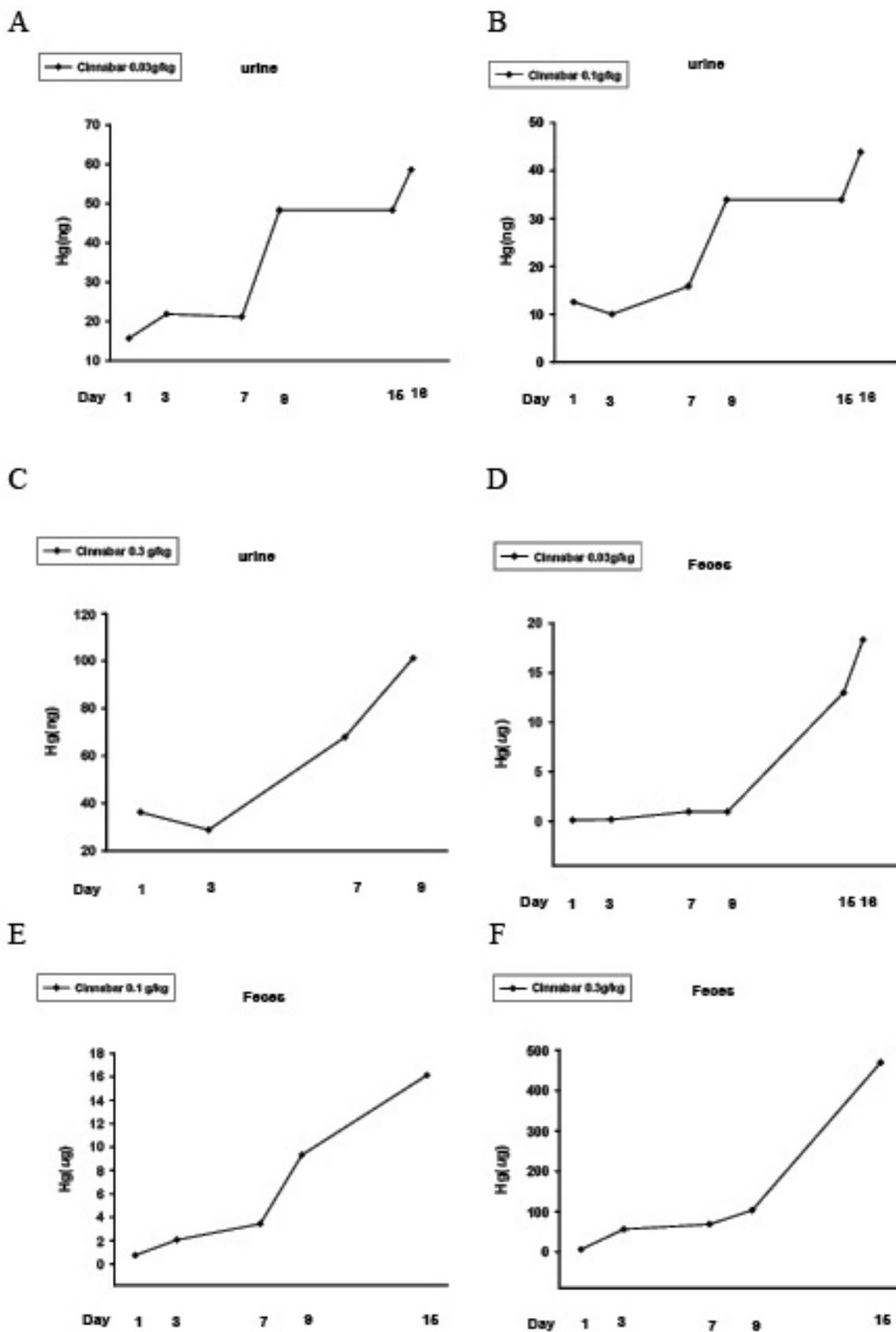
### blood



圖二十二、鼯鼠血液組織 Hg 總含量

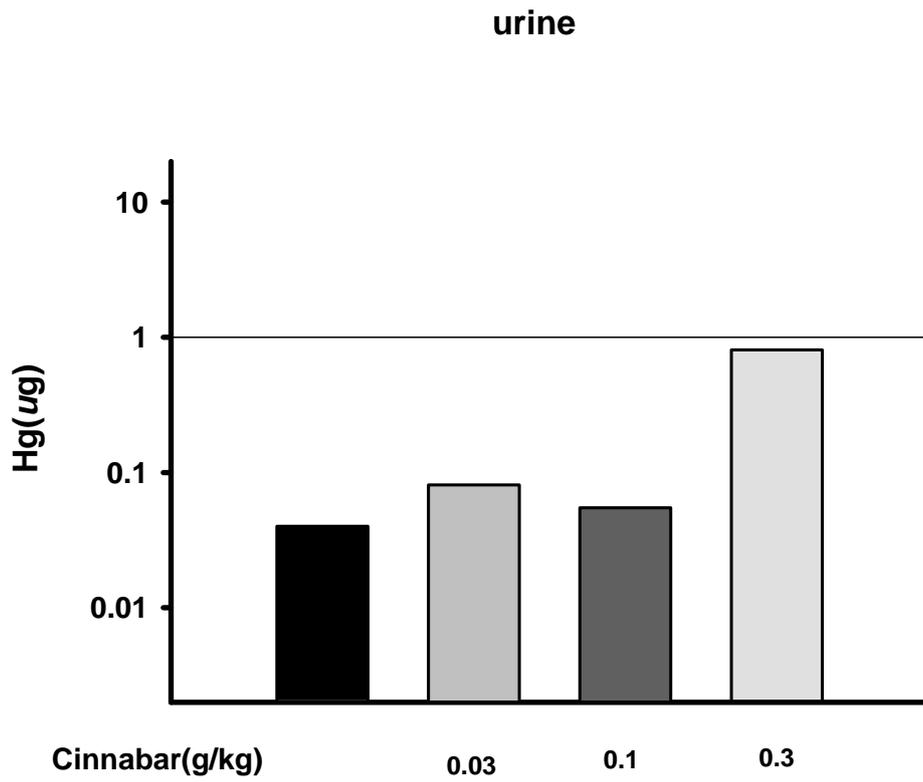


圖二十三、鼯鼠毛髮組織 Hg 總含量

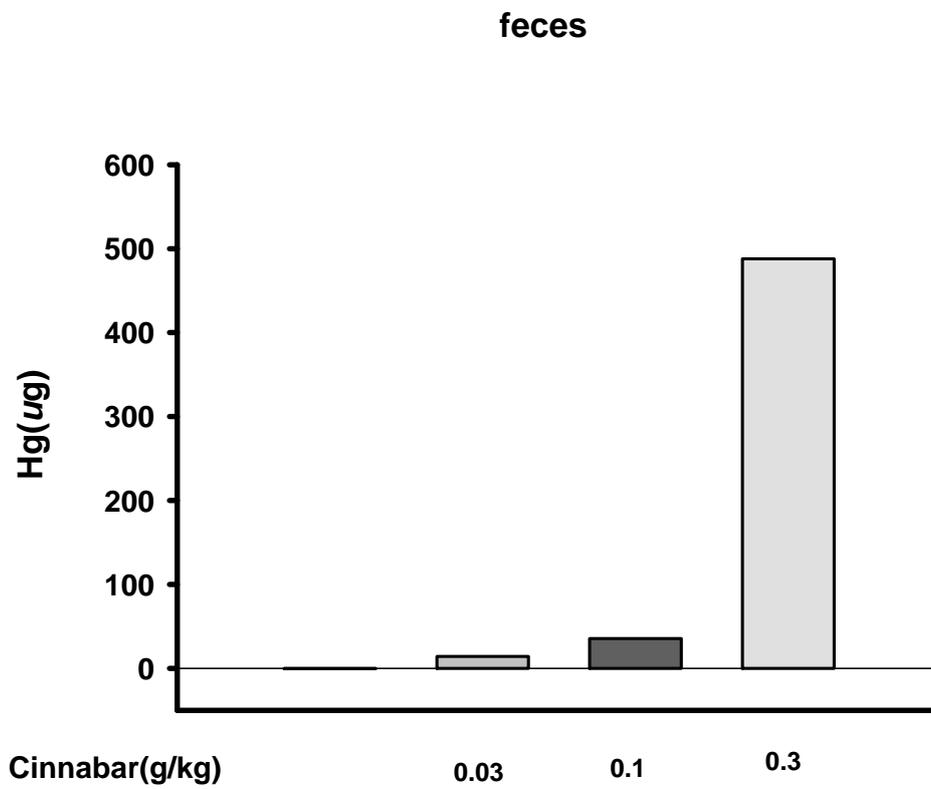


圖二十四、鼯鼠尿液、糞便 Hg 含量

G

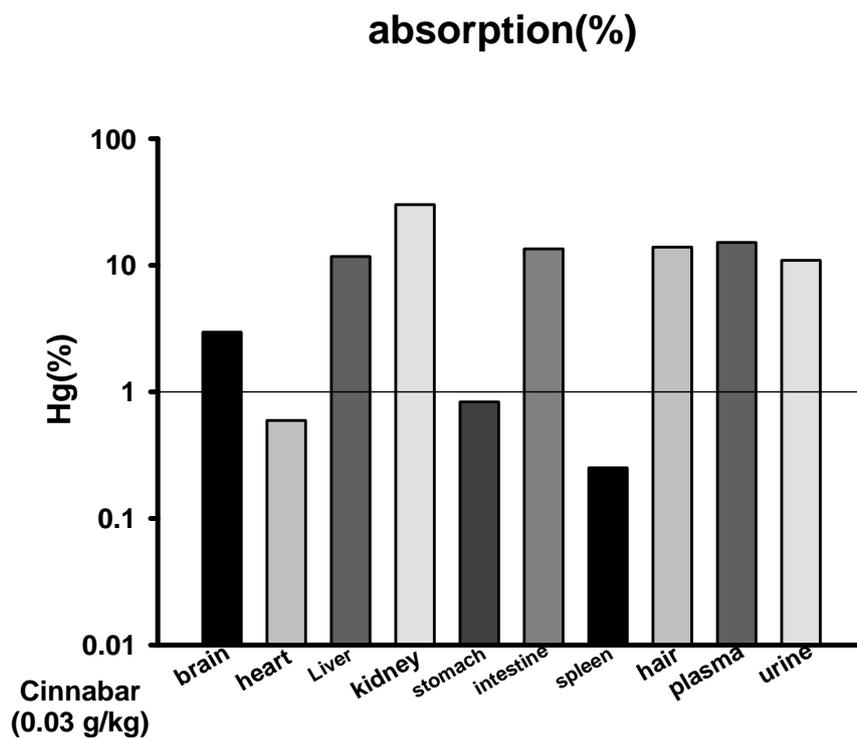


H



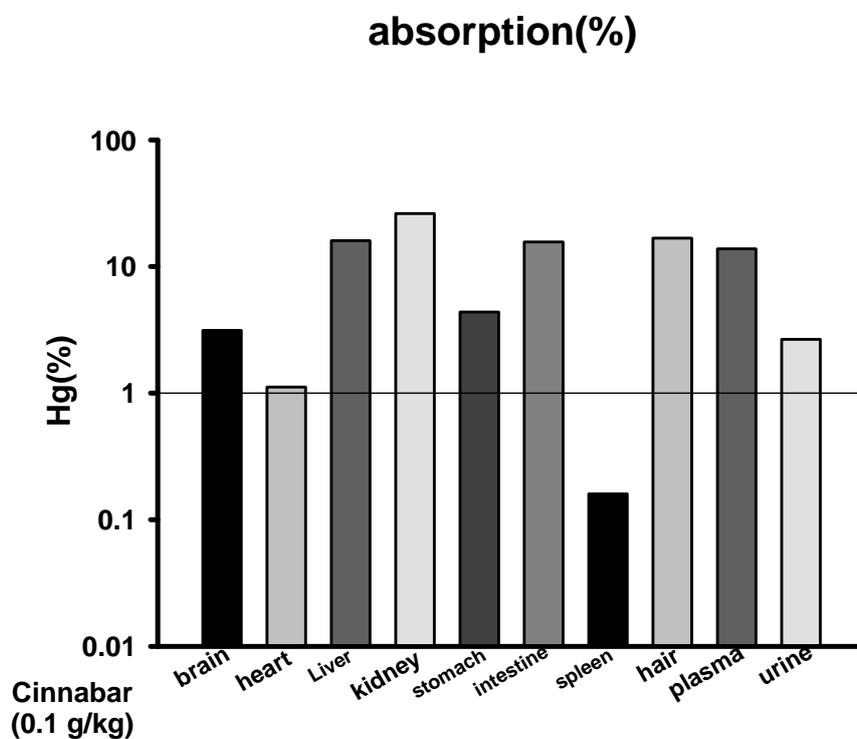
圖二十四-G、H 鼯鼠尿液、糞便 Hg 總含量

A



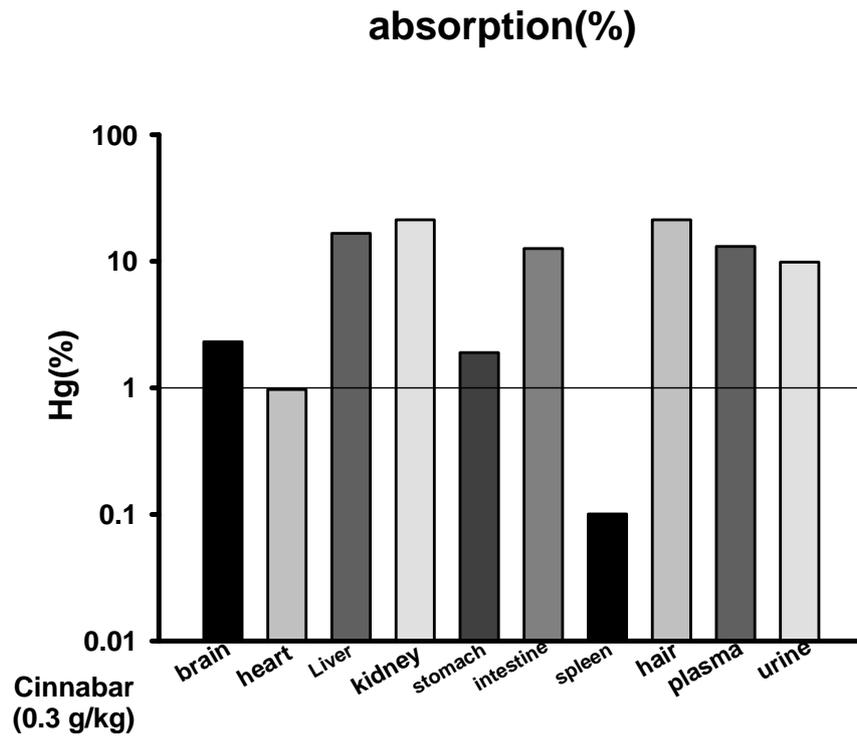
圖二十五、硃砂在鼯鼠各組織 Hg 分布的百分比  
A 硃砂 0.03g/Kg/day

B

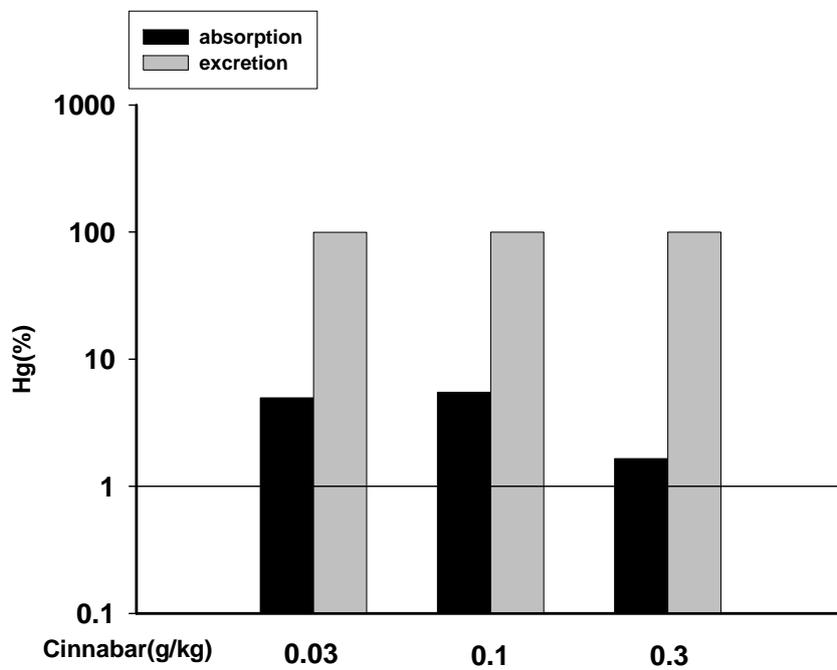


B 硃砂 0.1g/Kg/day

C



C 硃砂 0.3g/Kg/day



圖二十六、硃砂在齧鼠吸收及排泄Hg百分比

