

計畫編號：CCMP89-RD-039

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

礦物類中藥材安全性制定之前導研究
---市售朱砂之藥理機制研究(3-2)

委託研究報告

計畫委託機關：行政院衛生署中醫藥委員會

計畫主持人：蕭水銀

研究人員：吳春龍

執行期間：88年07月01日至89年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

計畫編號：CCMP89-RD-039

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

礦物類中藥材安全性制定之前導研究
---市售朱砂之藥理機制研究(3-2)

委託研究報告

計畫委託機關：行政院衛生署中醫藥委員會

計畫主持人：蕭水銀

研究人員：吳春龍

執行期間：88年07月01日至89年12月31日

編號：CCMP89-RD-039

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度委託研究計畫成果報告

礦物類中藥材安全性制定之前導研究
——市售朱砂之藥理機制研究(3-2)

執行機構 臺大醫學院毒理學研究所

計畫主持人 蕭水銀

研究人員 吳春龍

執行期限：民國88年07月01日至89年12月31日

**本研究報告僅供參考，不代表本會意見

目錄

中文摘要：	1-3
英文摘要：	4-6
前言：	7-16
材料方法：	17-20
結果：	21-26
討論：	27-35
結論與建議	35-36
圖表：	37-55
參考文獻：	56-61
附錄：調查表共四頁	

編號：CCMP89-RD-039

礦物類中藥材安全性制定之前導研究 ---市售朱砂之藥理機制研究(3-2)

計畫主持人：蕭水銀

執行單位：臺大醫學院毒理學研究所

中文摘要

我們所研究的硃砂在中國醫藥史上被用來與其他的中藥材配合，當作一種鎮定劑服用，而其中的主要成分為硫化汞(HgS)，雖然有許多的學者及研究機構針對硃砂作過相關的探討，但是硃砂經服用後硫化汞這種不溶性化合物的吸收途徑，進入體內後的組織分布，及其毒理及藥理作用仍有待科學家進一步去了解。透過聽覺-腦幹反應(ABR; auditory brainstem responses)的耳毒性檢查，我們發現連續口服硫化汞(0.1 和 1.0g/ kg) 或 甲基汞 (0.2, 2.0 和 10mg/kg) 七天後，無論是硫化汞(1.0g/ kg)或 甲基汞 (0.2 和 2.0mg/kg) 皆會產生第五波的絕對潛伏期 (absolute latencies) 和第三至五波間潛伏期 (the interwave

latencies)之延長。藉由原子吸收光譜的定量分析, 汞在血液, 肝, 腎及腦內(包括小腦與腦幹)的累積與聽能力的受損具有劑量上的相關性。另外我們也發現, 高劑量的汞化合物投予也顯著地造成腦幹上的 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase 活性降低, 尤其是甲基汞(2.0mg/kg)更是造成腦幹上一氧化氮(NO)大量產生, 甚致持續至停藥十一週後。

透過神經生理與神經行為學的檢查, 我們得知連續口服甲基汞(2.0mg/kg)五和十四天後, 將造成大白鼠神經傳導速度(motor nerve conduction velocity)的減少, 延長熱覺誘發閃尾反應(thermal induce tail flick responses)之時間, 迴轉輪(rota-rod)上運動表現 motor performance 的失調, 抑制性混合型肌肉動作電位(suppressive compound muscle action potentials)的不完全恢復, 及抑制坐骨神經上的 $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ 活性, 且後三者所產生的神經毒性是不可逆的。不同的是, 只有口服硫化汞(1.0g/kg)十四天後會造成運動表現的失調及坐骨神經上的 $\text{Na}^+\text{/K}^+\text{-ATPase}$ 活性些許降低, 且這些作用是可逆性的。此外, 我們也發現血中的汞濃度與此兩個汞化合物所產生的神經毒性有相當程度上的劑量關係。因此, 我們相信硫化汞經口服途徑仍可與甲基汞同為胃腸道所吸收並分布利用, 而前者的毒性效力則約為後者的千分之一或更少。

關鍵詞：神經-肌傳遞， Na^+/K^+ -ATPase，Nitric Oxide，神經傳導速度，

硫化汞，神經毒性，聽覺-腦幹反應

CCMP89-RD-039

Studies on the guidelines for safty regulations on the Chinese mineral drugs—The pharmacological effects and mechanism of cinnabar(HgS compound)

Author: S.Y, Lin-Shiau

Organization: Institute of Toxicology College Medicine

National Taiwan University

ABSTRACT

In this paper, we attempted to establish a mouse model for monitoring oto-neurotoxicity of mercurial compounds. Mice were dosing with the sublethal doses of HgS (0.1 and 1.0g/ kg) or MeHg (0.2, 2.0 and 10mg/kg) by gastric gavage for consecutive 7 days. Analysis of the hearing threshold indicated that MeHg (2.0 or 10 mg/kg) can significantly elevated the threshold but MeHg (0.2mg/Kg) and HgS (0.1 or 1.0g/kg) can not. Recordings of auditory brainstem responses (ABR) showed that either MeHg- or HgS-treatment induced a significant prolongation of wave I-V and the interwave latencies. This ototoxicity of MeHg persisted even after 11 weeks discontinuous administration but that of HgS

completely restored after 5 weeks discontinuous administration, which were intimately correlated with the disposition of Hg in the brain tissues. Moreover, the inhibition of Na^+/K^+ -ATPase activity and nitric oxide overproduction in the brainstem are apparently related with the observed oto-neurotoxicity. Based on these findings, we conclude that the functional disturbance of brainstem induced by mercurial compounds may account, at least in part, for their oto-neurotoxicity. we compared the absorption, tissue Hg contents and neurotoxicity of two mercurial compounds, methyl mercury (MeHg) which is soluble and organic, and mercuric sulfide (HgS) which is insoluble and inorganic. Since HgS is naturally found in cinnabar, a substance used in Chinese mineral medicines, and relatively lacks of toxicology information, it is important for us to investigate its toxic effects. Both compounds were administered orally to male rats for 5 and 14 days with assays conducted at these times as well as 14 days after discontinuous administration. Neurotoxicity was assessed using five neurophysiological and neurobehavioral parameters. The results obtained showed that MeHg (2.0mg/kg) prominently caused reduction (35% as compared to initial) of motor nerve conduction velocity (MNCV), prolongation (240% as compared to initial) of tail flick responses, incomplete restoration from the suppressive muscle action potentials, impairment of rota-rod motor performance (decrease 77%) effects and inhibition of Na^+/K^+ -ATPase activity of sciatic nerve; The latter three toxicities were relatively irreversible. By contrast, the former three toxic effects of HgS were rather unremarkable and the latter two toxic effects were moderately and reversibly. The blood Hg levels were found to be correlated with the degree of toxicities of these two Hg

compounds. These findings indicate that the insoluble HgS can still be absorbed from gastro-intestinal (G-I) tract and distributed in various tissues including the brain which is correlated with the observed toxicities. The differential profile of neurotoxic potencies and reversibility of these two Hg compounds in this rat model provides us a better understanding on the toxicokinetics of HgS (an ingredient occasionally prescribed in Chinese mineral medicine). It is estimated that the toxic effect of HgS is ranging about one thousandth or less than that of MeHg.

Keywords : oto-neurotoxicity, ABR, MNCV, neuromuscular transmission
HgS, Na⁺/K⁺-ATPase, nitric oxide

前言

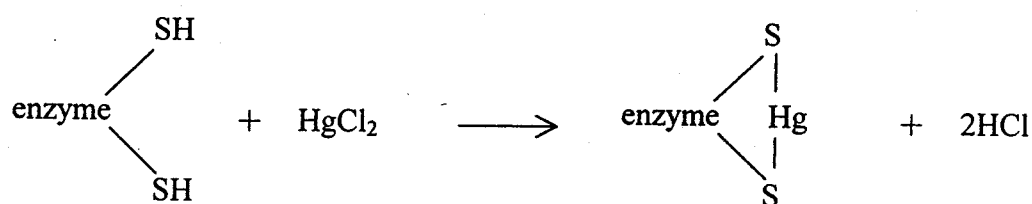
金屬汞，其學名為 mercury，化學式 Hg 源自於拉丁文 hydragyrum，熔點僅攝氏零下 38.9 度，故是室溫下唯一以液態存在之金屬；因其在常溫下呈銀白色液狀，故俗名水銀(liquid silver)(黃等，1991)

自然界汞的平均分佈情形，根據世界衛生組織 1990 年的統計，雨水中 Hg^{2+} 的平濃度為 2×10^{-9} g/L；大氣中為 2×10^{-12} g/L；海洋中為 2×10^{-9} g/L；土壤中為 20×10^{-6} g/kg；海底沉澱物中的汞化物主要為 HgS，其平均濃度為 20×10^{-6} g/kg。金屬汞(Hg^0)溶於水會轉變為 Hg^{2+} ， Hg^{2+} 又易與硫反應產生 HgS 並沉澱。在厭氧(anaerobic)狀態下，HgS 中之 S^{2-} 被還原，產生可溶性之 HgSO_4 ，並再度釋放出 Hg^{2+} 。(劉，1995)。

環境中汞之污染來源可分為三類：自然存在(自然礦物之風化或開採)、工業及農業。因為汞是一種用途極廣泛的重金屬，在醫療上，汞齊可用以為牙科填充物(汞以前被用做傷口消毒劑，甚至治療性病)；工業上電子器材、電鍍、印刷、造紙、火藥雷管、電池皆可發現汞或其化合物的使用；在農業上，殺菌劑也曾大量使用汞(黃等，1991)。在台灣，由於不生產汞，幾乎所有工業和醫農用汞，均由國外以元素汞形態進口。主要用於鹼氯(chloralkali)工業。其他尚有日光燈、水銀燈、溫度計、血壓計、繼電器製造等(黃等，1991；林和陳，1991)。本文即探討汞對生物體的毒性，期能對此特殊的重金屬元素有更深一層的認知。

二、汞之型態

汞主要之型式有金屬態汞(Hg^0)、無機態離子汞(Hg^+ 、 Hg^{+2})以及有機型態(CH_3Hg^+ 、 $C_6H_5Hg^+$ 等)(賴,1999)。不論何種型態均對生物體(人體)有極大的傷害，但以有機型態的烷基汞最具毒性。毒性依序為烷基鹽類汞、汞蒸氣、無機汞、其他有機汞。短鏈烷基汞，如甲基汞，易溶於脂肪中而滲入細胞，而且烷基汞和蛋白質SH基之親和力較無機汞高10~100倍，因此其毒性最強。汞和SH基作用方式如下：



但是金屬汞和無機汞離子在人體內都有機會轉變成甲基汞，而甲基汞也有可能經由酵素作用轉變回金屬汞和汞離子型式(劉,1995；Clarkson,1994)。

三、金屬汞(Hg^0)之毒性

汞蒸氣可經由呼吸道吸入肺部，如果曝露在高濃度汞蒸氣下而致急性吸入，將造成肺部發炎並導致呼吸困難而死亡。金屬汞(Hg^0)經由血液輸送，會大量蓄積於腎臟，造成腎誘發自體免疫性的血管球性腎炎(glomerulonephritis)(Hua et al,1995)；並可穿透「血腦屏障」，進入大腦組織，隨後氧化成二價汞不溶性化合物，抑制乳酸鹽、焦葡萄糖酸、 Na^+/K^+ -ATPase、丁二酸去氫、一胺氧化等多種物質和酵素的活性，引發中樞神經系統病變(劉,1995)

當慢性暴露在金屬汞蒸氣下，會有三種典型臨床徵候出現在口腔潰瘍發炎並有汞線(mercury line)、震顫和精神功能異常方面(Campbell et al.,1992；黃等,1991)。尤其在中樞神經系統，會有erethism(興奮增盛)現象，包括失眠、情緒不安、記憶喪失、胃口喪

失等 (Campbell et al., 1992)。

張(1993)曾對 26 位氯鹼電解析工廠工作人員，根據每人之工作內容及工作場所，將人員遭受汞蒸氣之污染暴露分為高、中、低三種程度，採取工作人員之血液、尿液及毛髮以分析其汞含量，並進行臨床神經電氣生理學檢查。雖然他們在生理上並沒有不舒服的現象，也沒有汞中毒的臨床徵候出現，但結果顯示汞蒸氣暴露高者之工人，其體液組織含汞量也比較高，尤其是尿液，在聽覺及體覺誘發電位測試下顯示中樞傳導有減緩之現象。

Hua 等人 (1995) 則以 Brown Norway rat 暴露於汞蒸氣 (~1mg Hg/m³ air) 低劑量下 (~6 小時/天，3 天/週，共 5 週) 和高劑量 (~24 小時/天，6 天/週，共 5 週) 的動物試驗證明，不論劑量多寡，最大蓄積是在腎臟；而腦的汞含量分佈，顯示低劑量暴露下是 0.71±0.10 ppm，高劑量暴露增高為 5.03±0.73 ppm，增加了近 608% 的趨勢 (表二)。而且經電子顯微鏡可以發現小腦中之 Purkinje cell 數目明顯減少，進而造成小腦的病變。

四、無機汞(Hg²⁺、Hg⁺)之毒性：

HgCl₂ 的中等致死量(LD₅₀)為 0.5g/kg 體重。汞是一種腎毒素 (nephrotoxin)，因為它可以提高氧的致變 (dismutation) 速率，使腎臟細胞粒線體產生過多過氧化氫 (H₂O₂)，而傷害到腎臟細胞。所以攝入二價汞鹽類，游離的二價汞會與蛋白質作用而沉澱 (劉，1995)。急性中毒會引起嘔吐、嚴重腹痛、出血性腹瀉和腎臟損害，並可能伴有尿生成障礙。慢性中毒則引起口腔潰瘍、牙齒鬆動、食慾喪失、腸道及腎功能紊亂，並伴有貧血和神經過敏。同時 HgCl₂ 會降低 Ca²⁺-ATPase 的活性，進而影響 Ca²⁺ 的代謝，因 Ca²⁺ 是中樞神經系

統重要的訊號傳遞者。

Sin 等人 (1990) 以較易溶於水的 HgCl_2 和較難溶解的 HgS 等汞化合物來餵食老鼠，檢測分析汞化合物在老鼠體內的吸收和分佈情形。由灌食 HgCl_2 的老鼠在前兩週便積聚大量的汞在腎臟，其次是脾臟，到第八週結果仍是如此。但灌食 HgS 的老鼠，不管是短期或長期，其汞蓄積量並不特別明顯。當灌食予老鼠一定量 HgCl_2 和 HgS 後，觀察 1 週、2 週、3 週後，各組織和器官的汞衰減量的變化。結果隨著時間增加，所有器官之汞平均含量均有明顯下降趨勢。Wisniewska 等人曾指出腎臟可能是將汞去毒性的器官，因為它會把汞和低分子量的蛋白質 Metallothionein 結合排泄，在組織化學研究顯示，在腎皮質部靜脈和腎曲小管 (convoluted tubules) 的細胞中發現很多汞的微粒存在。而表四則顯示腎臟的確能有效排除汞，以免生物體內的臟器負擔過多的重金屬。灌食 HgS 並不造成生物體臟器的大量蓄積，顯示因為 HgS 不易解離，所以腸內的吸收率不佳。

五、有機汞 (CH_3Hg^+ 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ 等)

由於工業和農業使用大量汞化合物，會導致環境中汞污染，導致生物體內如魚、鳥等，甚至人類的汞含量會增加。因為食物鏈關係會產生汞生物累積效應，因此越高等的生物其體內有機汞之濃度會越高。有機汞中則以烷基汞的毒性最強。國際間曾有數起因曝露在高量甲基汞而導致中毒的病例發生。日本 Minamata Bay 水域所發生的汞中毒事件顯示，甲基汞對人類胎兒和中樞神經，特別容易造成傷害 (Takeuchi, 1968)。

甲基汞約有 90% 以上可以被口服吸收，經由腸道吸收，經由血液，通過血腦屏障，到達腦、胎盤。甲基汞和乙基汞因此都會造成大

腦病變、成人的智力障礙和畸形胎。甲基汞中毒可能導致口吃、運動失調、眼盲、耳聾、智能下降。Bjaren 等人(1990)餵食 Wistar Rats CH_3HgCl 化合物 20 mg/L，發現在 24~28 天後就會有甲基汞中毒的症狀出現，如 spontaneous locomotion (自發運動量)顯著下降。第 56 天就可由電子顯微鏡可看到 fourth ventricle wall 有汞存在於 lysosomes。

六、汞限量標準

FAO (聯合國糧農組織) 和 WHO (世界衛生組織) 訂定食品中汞的容許極限含量為 0.5 ppm。但先進的歐美國家則提醒其國人在食品中最好不要超過 0.02~0.05 ppm (江, 1999)。我國食品衛生法規彙編規定食米中汞的限量標準為 0.05 ppm；包裝飲用水衛生標準中汞的限量標準為 0.002 ppm。

七、結論

無機汞通常在腎臟聚積，妨礙腎功能，而有機汞(CH_3Hg^+)則和金屬態汞的作用相似，可以通過血腦屏障，影響中樞神經系統。所以不論是從食物或空氣中攝入汞，都對人體有莫大的傷害(劉, 1995)。

傳統中藥以礦物入藥情形不少，加以藥用植物生長過程可能吸收來自土壤的重金屬，都可能使中藥含重金屬。由於國外極少使用、研究中藥，缺乏相關資訊可供參考，因此我們國內有必要自行研擬出一套標準。目前廠商多仿照日本規定，科學中藥總重金屬含量不得超過 100 ppm，但這項規定並未明文公告。廠商不過在申請藥品時，主

動申報；且重金屬種類繁多，僅以籠統總量規範是否恰當，值得商榷。更何況坊間的許多中藥行自行添加重金屬化合物如硃砂、雄黃等，而購買的民眾往往不自知。本研究計劃，將先從硃砂開始，繼而小兒八寶散，再擴展至礦物性中藥，針對毒性較大的重金屬如汞、鉛、砷等，研究其在動物體內的代謝情形、慢性毒性及安全劑量，以制訂科學中藥內重金屬含量的本土標準。並找出中藥材或其製造過程中，可能造成重金屬污染的部分，提醒廠商注意，輔導廠商提升水準。

首先針對一系列的汞化合物，在無鉛暴露下，分別對中樞神經系統及末梢神經系統，作電生理的研究，以期進一步了解可能的神經毒性。此外藉由原子吸收光譜之分析，可偵測藥材在血中或組織中之汞、鉛、砷的含量，以作為重金屬之致毒指標。在神經傳導方面，長期服用無鉛硃砂、低鉛硃砂、高鉛硃砂，三者在高頻電刺激下，末梢神經的動作電位有否差別，皆是本研究有興趣的主題。目前已知，甲基汞或氯化汞在中樞神經系統方面，可透過感覺細胞表皮的退化，進而破壞前庭神經系。由於溫差測驗乃為對神經毒性敏感度甚高的生理檢查，因此以天竺鼠為動物模式進行研究，分別探討對不同濃度的汞、鉛、砷化合物，進行溫差測驗，併檢視其溫差眼振反應。國人常以為中藥沒有副作用，多吃也不會有害，反正「有病治病，無病強身」。殊不知部分中藥材含重金屬，長期服食恐有罹患慢性重金屬中毒之

虞。舉例來說，台灣民間常用來治療嬰幼兒夜啼不止、鎮靜安神的「小兒八寶散」，多年來陸續有鉛、汞中毒的調查報告。更甚者在致死之檢體中，偵測出極高之含鉛量(44,000 ppm)。八寶散的方劑組成中，硃砂扮演著舉足輕重的地位。

所謂硃砂，是一種礦物性中藥，其成分乃硫化汞。根據中國古籍【神農本草經】記載，硃砂乃上品藥之首，有「養精神、安魂魄、益氣明目」之功效。【名醫別錄】則以為硃砂，有「通血脈、止煩滿、消渴，除中惡、腹痛、毒氣、疥癩諸瘡」之功，指明有解毒之效。唐代【藥性論】認為，硃砂可鎮心、主抽風，強調其安神鎮靜的作用。明代醫家李時珍在【本草綱目】中更進一步認為，硃砂可「明目、安胎、解毒、發汗，隨佐使而見功，無所往而不可」，從此擴大了硃砂的應用範圍。

硃砂之歷代本草考察如下：

1. 【本經】養精神、安魂魄、益氣明目，殺精魅邪惡鬼，久服通神明不老，能化為汞。
2. 【名醫別錄】通血脈、止煩滿、消渴，除中惡、腹痛、毒氣、疥癩諸瘡。
3. 【藥性論】鎮心、主抽風。
4. 【綱目】治驚癇，解胎毒痘毒，驅邪瘴。

5. 【新定大方藥合編】定魂魄，鎮心養神，鬼邪辟。
6. 【大明】潤心肺，痔瘡、癰、息肉并除之。
7. 【本草從新】定癲狂，止牙痛，下死胎。
8. 【本草衍義】此物鎮心養神，但宜佐使。

雖本身已有研究報告，証實其確有鎮靜、安眠的藥理作用；然單獨使用或多量使用，自古以來一直列為禁忌。以下是硃砂毒性的歷代考察：

1. 【綱目】入則熱而毒，能殺人。
2. 【本草從新】獨用多用，乏人呆悶。
3. 【本草衍義】煉服少有不作疾者。
4. 【本草逢原】丹砂入火則烈毒，能殺人，急以生羊血、童便、金針等解毒。
5. 【雷公炮製藥性解】質性沉滯，勿宜多用，煉者，大熱解毒。
6. 【本草用法藥方】硃砂若經伏火及一切烹煉，則毒等砒霜能殺人。

雖則如此，然由於硃砂需求量大且來源稀少，故常有不肖業者利用色澤相近的另一礦物藥材—鉛丹(Pb304)來替代。因此無論是硃砂、鉛丹或八寶散，皆可能引起鉛、汞中毒。衛生署中醫藥委員會，擬計劃制定中藥重金屬含量明確標準，使中藥更趨科學化，以保障民眾用藥的安全。

硃砂的主要成分是硫化汞，由於本品不溶於水，故一般認為體內不會吸收，沒有毒性。然 Tech 等則證明，硫化汞經由口服後，可被胃酸解離成可溶性的汞鹽，再經由腸道吸收，最後沉積在肝、腎等處。傳統中藥以礦物入藥情形不少，加以藥用植物生長過程可能吸收來自土壤的重金屬，都可能使中藥含重金屬。由於國外極少使用硃砂，目前有關硃砂或硫化汞的文獻報告很少，僅知硫化汞(0.5 gm/kg)餵食三天及二週後，分別會造成肝、腎中去氧核糖核酸的破壞。然而是否會造成神經毒性及致毒機轉，則目前尚不清楚。因此我們計劃去探討硃砂對神經系統及動物行為之影響。從硃砂開始，繼而小兒八寶散，再擴展至礦物性中藥，以建立科學中藥內重金屬含量的本土標準。

目前廠商的規定，科學中藥總重金屬含量不得超過 100 ppm，但這項規定並未明文公告。廠商不過在申請藥品時，主動申報；且重金屬種類繁多，僅以籠統總量規範是否恰當，值得商榷。更何況坊間的許多中藥行自行添加重金屬，而購買的民眾往往不自知。研究計劃，將先針對中藥中常見、毒性較大的重金屬如汞、鉛、砷等，研究其在動物體內的代謝情形、慢性毒性及安全劑量，制訂各種重金屬含量標準。並找出中藥材或其製造過程中，可能造成重金屬污染的部分，提醒廠商依循標準天竺鼠。

連續第一年所研究的成果，我們發現大劑量 HgS(1.0 g/Kg)餵

天竺鼠七天或十四天，已有明顯的不可逆性的傷害內耳平衡功能系統，於是我們降低 HgS 的劑量，繼續研究低劑量 HgS 的毒性及藥理作用。

HgS 0.1g/kg 餵食七天後，我們首先在天竺鼠發現此劑量會產生 caloric response hyperfunction。在 HgS 產生 VOR 高亢功能後，停餵 HgS，分別為一週及兩週後，再分析 VOR caloric response 恢復情況，結果發現此作用是可逆性的，隨著停藥時間的延長，恢復的百分率也增加，停藥兩週，已恢復至 91%。HgS 0.1g/kg 餵食七天，卻對天竺鼠聽力 ABR 後有生物統計意義的影響。我們分析 ABR 5 waves 的 duration 以及 interwave intervals，均不受 HgS (0.1g/Kg) 之影響。我們的研究發現 HgS(0.1g/Kg) 可在胃腸吸收，並分布於腦神經，已知小腦為調控內耳平衡功能的中樞，HgS 抑制小腦 ATPase 活性，並增加 NO 產生，可部分說明 HgS 的作用機制。

材料與方法

1. 鈉-鉀幫浦活性之效應測試 (Na^+/K^+ -ATPase Activity Assay)

細胞膜 ATPase activities 利用 Liu *et al.*, 1997; Rohn *et al.*, 1993 發表的方法偵測. 此方法可利用來定量同一樣品中

Na^+/K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase 的活性 作用酶的四重複利用 covered 96 well microtiter plates 在 $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ 均勻反應後測試. 90 microliters of 試劑 (10% sucrose pH=7.2) 加入 $2\mu\text{g}$ 細胞膜蛋白 每個反應槽中. Na^+/K^+ -ATPase 活性 被 ouabain (3.74 mM) 終止進而將 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity 測出. 反應的測試盤先放入 $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ 培養箱作用 20 min, 並在加入 $10\ \mu\text{l}$ of ATP (final concentration 5 mM) 後開始反應, 整個反應的終止 利用加入 $200\ \mu\text{l}$ of malachite green (MG) + ammonium molybdate (AM) (3:1)來進行. 最後測試盤利用 microplate ELISA reader (MR7000, Dynatech, USA) at 630 nm 來讀取.

2. 汞的定量

從不同器官 liver, kidney or cerebral cortex tissues 取出樣本利用本實驗室所改良自 Iverson *et al.*, 1974 法表的方法將樣品備製程穩定狀態之後將樣品上機 the cold-vapor atomic absorption spectrophotometry 作測試 將不同器官 liver, kidney or cerebral cortex tissues 取出樣本的汞含量做一定量偵測

3. 腦幹反應聽覺實驗 (Recording of auditory brainstem response) (ABR)

利用 auditory evoked potential system (Nicolet, Spirit, Madison, WI, USA) 紀錄並計算. 實驗之前利用固定頻率音波激起 ABR and 分析聽覺的閾值. 音量強度區間從 5-dB 至 -10 dB. 天竺鼠(guinea pigs) 的反應利用 皮下電極來偵測並加以紀錄與分析

4. Ca^{2+} -ATPase 活性測試

細胞膜 ATPase 活性利用 Liu *et al.*, 1997; Rohn *et al.*, 1993 發表的方法偵測及實驗室經過改良的方法測的此一方法可定量兩種不同的 ATPase 活性, 方法原理同第一項中所述。

5.一氧化氮(Nitric Oxide) 偵測

樣本利用 NO/ozone chemiluminescence (NO Analyzer 280A SIEVERS) 做 NO 量值的定量。

原理如下： $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* + \text{O}_2$; $\text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$

6.微血管血液流量測試

參考前人發展出的方法利用straight Laser doppler flowmeter (LDF) 進行尾部微血管血液流量測試

7.動物體平衡實驗

本實驗的進行是利用動物停留於 旋轉輪(rota-rod test) 上的時間所測的運動距離 來定義動物體的平衡能力改變與否。

8.電生理學實驗

利用 Raya et al., 1994 發展出的方法來測試大鼠尾部的神經-肌肉電流的傳導。此一方法被用來作為研究周邊神經毒性的實驗

9.數據統計與分析

結果數據以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 表示. 利用 Analyse of variance (ANOVA) 分析 數聚的變異性 , 以Dunnett's t-tests分析兩組數據間的差異性(Ndamba *et al.*, 1997).若所得的P值小於0.05則評定為有顯著差異性

結果

硫化汞對聽力腦幹反應之影響

1. 汞化合物誘導不正常之 ABR

本研究的目的是集中於探求硫化汞相較於甲基汞給小鼠口服投予後所導致的聽力-腦幹功能異常。經由硫化汞甲基汞連續投予 7 天後，對於 ABR 閾值的作用詳述於圖 1。我們的結果顯示甲基汞(2 或 10 毫克/公斤) 可以明顯提高聽力的閾值。該劑量在實驗經了 11 週時，可引起中度或重度的永久性雙側聽力損傷，而較低劑量的甲基汞(0.2 毫克/公斤)及硫化汞(0.1 或 1.0 克/公斤)，則僅引發可回復性的聽力損傷，在停藥 11 週後，除了甲基汞(2 毫克/公斤)外，所有組別之處理都不再產生持續性的喪失雙側聽力。ABR 路徑的初步分析包括波 I 到波 V 的絕對波，如同波與波之間的時間(波 I-II, I-III, I-V, I-V 和 III-V)，甲基汞(0.2 及 2.0 毫克/公斤)或硫化汞(0.1 或 1.0 克/公斤) 每天記錄連續 7 天，並且在 5 及 11 週也有此現象。圖 2 顯示代表老鼠的 BAEP 波形及 85 分貝刺激毫秒後的絕對 interlatency 值，ABR 的波形平均絕對強度及 85 分貝刺激後的交互波強度個別呈現於表 1 及表 2

與控制組比較，我們發現在處理甲基汞後每一個偵測點的 wave V 明顯的延長，延長的 I-V or III-V 間峰強度也在傳導性缺陷的耳中

發現。在我們的研究中發現硫化汞及甲基汞處理的組別也爭強 wave V 及 I-V or III-V 間峰的強度。

2.不同的組織中汞的含量

硫化汞不溶於水，一般認為將較不具毒性，我們利用口服處理硫化汞及甲基汞後去偵測不同組織 (blood, kidney, liver, cerebral cortex and brainstem)之間汞的含量，圖 3A 結果發現在連續七日給予硫化汞 (0.1 and 1.0g/kg)及甲基汞(0.2 and 2.0mg/kg)後，汞的含量隨著劑量的增加而蓄積更多的汞於組織中，而高劑量硫化汞處理的組別汞的含量，在 blood 可達 0.8ppm，在 liver 可達 1.2ppm，在 kidney 可達 3.0ppm，在 brainstem 可達 0.2ppm，高劑量甲基汞處理的組別汞的含量，在 blood 可達 5.0ppm，在 liver 可達 7.0ppm，在 kidney 可達 14ppm，在 brainstem 可達 0.2ppm。圖 3B 表示汞的蓄積量會隨著時間距離間斷性投藥時間愈長，而蓄積的愈少。綜合比較硫化汞及甲基汞處理的組別，我們也發現 brainstem 中若汞含量高於 0.5ppm 與不正常 ABR 測試反應有關聯。另外，連續七日給予硫化汞及甲基汞後，間隔 11 週後偵測汞的蓄積量發現除了高劑量甲基汞處理的組別外，其餘皆測得蓄積量隨著時間下降 如圖 3 所示。此一結果也反映在 ABR 測試上。

除此之外，圖 8 顯示連續七日給予硫化汞(1.0g/kg)及甲基汞(2.0mg/kg)後，以原子吸收光譜偵測儀測試發現汞原子在血液及腦幹中都有大量的蓄積，

3. 腦幹 Na^+/K^+ -ATPase 活性測試

一些相關文獻指出 Na^+/K^+ -ATPase 活性的改變會抑制神經興奮及傳導，因此我們認為不正常功能可能是由於腦幹 Na^+/K^+ -ATPase 活性改變所造成，進一步實驗我們也發現：連續七日給予硫化汞(0.1 and 1.0g/kg)及甲基汞(0.2 and 2.0mg/kg)後， Na^+/K^+ -ATPase 活性明顯的被抑制，圖 4。圖 9 也顯示連續七日給予硫化汞(1.0g/kg)及甲基汞(2.0mg/kg)後，Brain stem, Stria vascularis and Organ of corti 中 Na^+/K^+ -ATPase 活性明顯的被抑制

4. 汞的化合物對腦幹中一氧化氮產生的影響

連續七日給予甲基汞(2.0mg/kg)後我們發現在腦幹中一氧化氮不正常的明顯增加(圖 5、10B)，而此一反應為不可逆性。硫化汞(1.0g/kg)及甲基汞(0.2 mg/kg)處理則發現有明顯增加，但此一反應具可逆性。5-11 週不連續處理硫化汞(0.1 and 1.0g/kg)及甲基汞(0.2 mg/kg)後，則無明顯的變化，圖 5。此外，我們也測量血液中的 NO_x 數值，

但是未現明顯改變，圖 10A。

此外我們還進行了處理不同濃度 HgS 及 MeHg 去觀察其對天竺鼠左右耳 DPOAEs 的影響，圖 6 及圖 7。但是由結果顯示，汞化物對 DPOAEs 並不會造成明顯的改變

硫化汞對中樞及末梢神經之毒性

5. 甲基汞與硫化汞對體重的影響：

口服給予老鼠甲基汞(2.0mg/kg)或硫化汞(1.0g/kg) 一天依次連續給 5 或 14 天，以 1 周或 2 周的不同時間來測試不同的實驗。圖 11 中指出給予甲基汞(2.0mg/kg) 1 周或 2 周顯著的降低老鼠體重，然而硫化汞(1.0g/kg)則無此現象。(圖 11)

6. 甲基汞與硫化汞對鼠尾神經系統傳導速率的影響

藉由細胞外的紀錄我們可以測得運動神經的動作電位。甲基汞顯著的降低運動神經傳導速率但是硫化汞則無此現象，我們另外發現停止給藥兩週後甲基汞的抑制作用也可回覆到起始值。(圖 12)

7. 強直性刺激後甲基汞及硫化汞對複合性肌肉動作電位 (CAMP) 的影響

1 分鐘強直性刺激(10 or 20 HZ) 可引發漸進性抑制複合性肌肉動作電位的強度，如圖 13 所示緊跟著單一刺激(0.2HZ) 17 分鐘可恢復至起始強度。如 1999 Kan 等人所述，此自發性恢復速率，可被用來當作偵測神經肌肉傳遞周邊功能的生物指標。複合性肌肉動作電位時間上的改變呈現在於 圖 13A，清楚的指出對 20HZ 刺激的強度比 10Hz 刺激的降低速率還快($p < 0.05$)。然而我們在這些實驗皆使用 20Hz 的強直刺激。在給甲基汞每天一次，持續 5 天後，主要產生較快的複合肌肉動作電位抑制且較慢的恢復(約起始之 87%， $p < 0.05$)，而硫化汞只引發較慢恢復速率(圖 13B)。長期連續 14 天的給藥，這些抑制作用(恢復至起使之 60%~70%， $p < 0.01$)更惡化。咖啡因(20mg/kg，腹腔注射)引發不完全恢復(約起始之 82%， $p < 0.05$)當成正向控制組。抑制作用的可逆性在停藥 14 天後監測，我們發現在 0.2Hz 頻率刺激 17 分後，甲基汞(約起始之 80%， $p < 0.05$)與咖啡因(約 90%起始值， $p < 0.05$)仍引起不完全恢復至起始值，而硫化汞組可完全回到起始值(圖 13D)。

8. 甲基汞與硫化汞對滾輪運動之效應

在運動協調功能方面，我們採用滾輪運動測試老鼠在滾輪上平均停留時間當成運動表現狀況。一個測試期一天內有 10 個測試，每個測試包含每個動物在滾輪上維持平衡的停留時間來記錄。我們的結果

顯示每組訓練每分鐘 8 轉的速度，只有給甲基汞組比起控制組或硫化汞組產生不可逆的不正常滾輪運動表現(停在滾輪約 20 秒)(圖 14)。

9. 甲基汞與硫化汞對閃尾反射效應

為測試動感受傷害的能力，以閃尾反射試驗記錄汞化物對熱疼痛反應之時間。持續給藥 5 天後，甲基汞及硫化汞組的老鼠皆不會引發對每 30 分間隔熱引起痛覺過敏有抑制作用(圖 15A)。然而持續給藥 14 天後，甲基汞組會有抗感受性傷害的效應，而硫化汞則無(圖 15B)。停藥 14 天後，完全恢復對熱引發之痛覺過敏正常反應(圖 15C)。

10. 甲基汞與硫化汞對鈉-鉀幫浦活性之效應

周邊坐骨神經的鈉-鉀幫浦活性測試中，發現甲基汞顯著且不可逆抑制鈉-鉀幫浦(圖 16)。然而，在硫化汞組則只可逆性降低此幫浦活性。

11. 甲基汞及硫化汞給藥後組織中汞含量

藉冷蒸氣原子吸收光譜學(AAS)，我們測定每天口服給藥甲基汞及硫化汞 14 天後不同組織(肝、腎、全血)中汞含量。圖 17A 顯示連續給甲基汞(2mg/kg)14 天後，汞大量累積於肝、腎及大腦皮質分別達到百萬分之 1.65，6.0，及 0.4。而給硫化汞則分別上升至汞含量百萬

分之 1.0，2.0，及 0.25。控制組分別只有十億分之 30，70 及 17。連續給甲基汞 14 天後，血中汞含量達十億分之 800。停藥 14 天後仍有十億分之 250，且其他組織停藥後仍有顯著性汞蓄積(圖 17B)。當血中汞含量高於十億分之 500，則有神經毒性，與坐骨神經失常有關。因此，我們推論出血中汞濃度超過十億分之 250 時，汞蓄積作用可能是引起神經功能失常之主要原因。

討論

硫化汞 (inorganic form) 不溶於水且一般認為在體內的毒性很小 (Sin et al 1992; Sin et al., 1990)。最近，有報導指出硫化汞在口服硃砂 (中藥中含有硫化汞的鎮靜藥) 或硫化汞 (Yeoh et al 1986) 後在肝臟和腎臟會被吸收和蓄積。為了了解汞化物所引起的耳神經毒性，我們試著評估硫化汞和甲基汞所引起的聽力閾值和 ABR 的改變。

有報導指出生長發育中和成人暴露於甲基汞會導致聽力的損傷和耳聾 (Wassick et al., 1985)。然而，有關聽覺功能客觀上的評估卻缺乏。本篇研究是延續我們實驗室之前小鼠暴露於汞化物的研究。七天中取不同時間點連續給與甲基汞和硫化汞及 5 和 11 個星期不連續的給藥，提供聽覺功能傷害發展和加速的證據。再連續七天每天給與甲基汞 (0.2 and 2.0mg/kg) 或硫化汞 (0.1 and 1.0g/kg) 後記錄各種不同的高點 (I, II, III, IV and V) 發現甲基汞 (0.2 and 2.0mg/kg) 或硫化汞 (1.0g/kg) 會延長 V 波的潛伏但硫化汞 (0.1g/kg) 不會。I-V and III-V 波之間的潛伏也明顯的延遲。

這些結果顯示聽覺得神經-腦幹的傳導速度顯著的下降。有一個相似的研究是探討工業上暴露於鉛和汞後利用紀錄 brainstem auditory evoked potentials (BAEPS) 研究其對腦幹聽覺路徑的影響。鉛和汞的工人皆發現 I-V 波時間有延長的現象 (Counter., et al 1997)。另外，血中

含有鉛最大平均值的族群，其波峰之間的時間更久。因此，由 brainstem auditory evoked potentials 所得到的 V 波潛伏的延遲可以當做是中樞神經系統中甲基汞毒性的生物標記。這些結果與其它研究相符，而且顯示 BAEP 可能可供做鉛和汞所引起的輕度中樞神經毒性的敏銳監測工具(Counter et al., 1997)。基於這些神經學的發現，我們開始注意包含在中藥鎮靜藥硃砂(硫化汞)中的汞經由中樞或周邊路徑所引起的耳神經毒性必須適當的保護。

經由 atomic absorption spectrometry (AAS) 這個方法，我們發現七天連續給予甲基汞 (0.2 and 2.0mg/kg) 或 硫化汞 (1.0g/kg) 會蓄積在一些器官中，包含血液、肝臟、腎臟、大腦皮質和腦幹；不連續的給予甲基汞甚至會蓄積 11 個星期。相似的研究是做汞的程度和範圍或組織的形式改變，顯示無機汞在體內不會代謝成有機汞(Pedersen et al., 1997)。在我們的研究中，亦發現適度硫化汞 (0.1g/kg) 吸入不會明顯的蓄積在血液或大腦中，而且生物效應是甲基汞的 1/500。因此，最近有動物生長發展的研究利用大腦中汞的含量大於 1000ppb，顯示大腦汞的含量和分析 EcoG 因子改變之間有濃度依賴的關係(Desi et al., 1996; Lapham et al., 1995)。

此外，我們的研究提供在汞毒性範圍內超過 100ppb 會引起腦幹的聽覺神經傳導路徑的功能不正常。有一些報告是指出 evoked

potential (EP)與個別相對的正常物體之間的發現的比較。在腦幹聽覺的 evoked action potential，在暴露汞蒸氣的工人中發現中樞神經系統的神經傳導時間延長(Chang et al., 1995)。其它的發現顯示汞蒸氣慢性暴露會影響中樞神經系統的功能。所以，我們相信可逆或不可逆的中樞腦幹聽覺系統的傷害最主要是因為汞的蓄積。

聽力和 ABR 波形成的潛伏改變的閾值與腦幹中 ATPase 反應比較評估鼠聽力不良。隨後甲基汞 (0.2 and 2.0mg/kg) 和硫化汞 (0.1 and 1.0g/kg)連續處理 7 天皆造成腦幹 ATPase 活性顯著的下降。在高劑量甲基汞 (2.0mg/kg)會造成 ATPase 持續受抑制超過 11 星期不連續給藥。這個結果證明了甲基汞具有長時間及不可逆的耳神經毒性的假說而非硫化汞。這個實現需要更進一步研究是否 ATPase 受抑制和神經受一定化學物質(例如:一氧化碳)刺激興奮會促始中樞神經系統受傷尤其是聽力疾病。

有大量的結果顯示無基汞會下降大腦中 SOD 的活性當大腦和腦幹中 GSH 碳) 會促始汞所造成的神經退化疾病的發展。一氧化碳不只扮演正常生理角色例如在生物體中的擴張和神經傳遞作用，在一些病理情況下可 peroxidase 的活性受影響(Hussain et al., 1997)。根據這個發現可以得到一個結論自由基(例如:一氧化能具神經毒害的作用(Ruan et al., 1997)。最近的研究發現經由電生理和形態學方法，sodium

nitroprusside (SNP, a NO donor)具劑量和時間依賴的急性耳毒性(Kong et al., 1996)。此外，Nomega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) 一氧化氮合成酵素得抑制劑會干擾大鼠海馬迴聽反應的抑制閥(Adams et al., 1998)。基於這些結果和我們的結果，我們相信 iNOS 大量生成 NO 可能會影響腦幹而失去調節和耳神經毒性，而且在 ABR 中 I-V 和 III-V 兩峰間有明顯的延遲。

到目前仍未有報導指出在腦幹中發現 NO。我們的結果比較處理甲基汞 (0.2 and 2.0mg/kg) 和硫化汞 (0.1 and 1.0g/kg) 後 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase 活性的下降，發現在連續給予 7 天候在腦幹中發現 NO 明顯的上升。不過，處理甲基汞 (0.2 mg/kg) 和硫化汞 (1.0g/kg) 會引起可逆的 NO 過度生成。處理甲基汞 (2.0mg/kg) 會得到明顯的 NO 量的改變再最後一次給藥後 5 到 11 的星期。現在的研究指出腦幹中過多的 NO 生成可能會抑制 $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase 活性而導致耳神經毒性和聽力喪失。這些結果與其它研究認為 BAEPs 可以提供汞所引起的輕度中樞神經毒性的敏銳監測工具(Discalzi et al., 1993)。由我們的結果和之前的報告，我們暫時推論 NO/ $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase 的路徑可能影響腦幹中聽力系統的功能。

連續處理五天,高劑量的硫化汞(1.0 克/公斤)(中藥硃砂的主成分),對於體重及很多週邊神經毒性的測試如,運動神經傳導速度,抑制

CAMP 的速率,以及滾輪測試,閃尾反應等測試沒有顯著影響。然而,當連續口服 14 天硫化汞(1.0 克/公斤)則可以發現可回復的抑制性強直性刺激與抑制坐骨神經的鈉鉀 ATPase 活性.而其他如週邊神經毒性測試實驗仍然沒有明顯作用。汞在血中的濃度估計為 500ppb,在連續口服 14 天硫化汞之後,開始產生可逆性的週邊神經毒性,當中斷口服 14 天之後,週邊神經毒性產生完全的恢復,以及伴隨著血中汞的濃度降低至 100ppb,而此時控制組汞在血中的濃度大約為 20-30ppb。

甲基汞的週邊神經毒性(2 毫克/公斤,約為 LD50)以同樣的標準同時評估其週邊神經毒性。結果顯示大鼠逐漸適應連續口服 14 天甲基汞(2.0 mg/kg),所有的老鼠在口服後皆全部存活。顯示甲基汞的週邊神經毒性比硫化汞獨特,不但是在所有神經功能的試驗上而且在口服後中斷 14 天神經失去功能的回復。這些神經毒性的作用的現象,與血中汞的濃度有很大的關係。服用甲基汞連續 14 天血中汞的濃度達到 800ppb,在中斷服用 14 天之後血中的濃度仍然持續 250ppb。在肝及腎中汞含量甚至是血中的 2.3 與 7.5 倍。所有以上的證據顯示,汞在血中的濃度可以作為汞引起週邊神經毒性的指標。

由這些標準判斷,可以推論不溶於水的無機硫化汞,仍然可以經由胃腸道被吸收,其神經毒性大約是有機甲基汞的千分之一或更低。

其他的因素會影響組織中的汞含量:汞化合物溶解度以及脂溶性,吸收及排除速率的平衡以及汞化合物與組織的親和力。雖然硫化汞十分難溶,但是硫化汞持續存在於胃腸道中使的微細顆粒狀的硫化汞被小腸所吸收,Danscher 等人曾報告溶小體堆積中硫化汞的化學構造(HgS₂HgS₂Hg)_n。我們猜測微少量的 Hg 與硫離子可以被釋放與傷害神經系統。無論無基汞是否轉變成甲基汞,這仍然是一個十分值得探討的問題。

汞的神經毒性的可能機轉包含了 1.穩定神經細胞膜電位 2.阻止神經細胞膜納的傳遞 3.抑制興奮性突觸經由節前或節後的傳遞 4.經由 GABA 加強胞突的抑制作用 5.改變鈉鉀 ATPase 的活性,接著造成選擇性神經警示與神經傳導的抑制,特別是高頻的活性方面。利用 Transcutaneous stimulation of caudal nerve,可以在鼠尾量到運動神經傳導的速度。汞化合物對大鼠的神經毒性亦可由滾輪試驗來研究。它們的運動能力(站在滾輪)會因進行性的肌肉動作電位振幅降低而缺失,其被認為是與神經肌肉連接處有關的機制。

利用這些測試系統來評估週邊神經毒性,可以清楚的展示受強直性刺激所促進的壓抑性與抑制坐骨神經鈉鉀 ATPase 活性的回復速率是被硫化汞與甲基汞所抑制最敏感的試驗。而 positive control 利用咖啡因促進 suppressive rate 與延遲恢復速率伴隨著汞化合物的實驗。而

利用咖啡因促進 CMAP 的缺失被認為是經由尾巴的骨骼肌節前神經傳導物質釋放與內質網中鈣離子的釋放所引起的抑制作用。關於 Hg 促進不正常的 CMAP 的可能機轉，我們建議在 Hg 引起的神經毒性中，抑制坐骨神經的鈉鉀 ATPase 扮演了主要的角色。曾有文獻指出，汞離子與 SH 基類功能性蛋白質有高親和力像 Voltage-sensitive Ca^{2+} channels 造成鈣離子持續內流，造成進行性的神經傳遞物質排空，與內生性的 SH 基氧化劑，造成 SR 中鈣離子的持續釋出或是利用抑制鈣離子幫浦影響細胞膜表面。甲基汞引起 MNCV 減少也許是根源於抑制鈉鉀 ATPase。雖然硫化汞會可逆性地與中度抑制坐骨神經的鈉鉀 ATPase，可忍受的抑制或是不明顯的抑制 MNCV 仍然可被觀察到，這些結果與之前的報告有關鈉鉀 ATPase 與金屬離子汞有高的親和力的結果一致。

在滾輪測試與閃尾測試中所表現的運動特徵受到複雜的週邊神經系統所調節包含了週邊神經肌肉傳遞，興奮性收縮偶合系統與小腦及腦幹的中樞調節系統。神經系統對硫化汞所產生不利的影響所有的相對抵抗力目前已被了解，是由於可以對抗外來傷害的保護系統的調節。然而，這個保護系統仍然無法對抗當大劑量硫化汞對神經系統所造成的極度傷害。

總結以上，我們展示了當連續口服 14 天不溶性硫化汞 (1.0 g/kg)

可以增加汞在組織中的量，而汞在組織中的量與其神經毒性具正向關係。若是共同探討甲基汞的影響，給予一個已知的低劑量，發現甲基汞被完全吸收，並在組織中汞達到一個非常高的濃度，這個濃度足夠造成嚴重且不可逆的神經毒性。粗略的估計劑量與引起神經毒性的關係，我們發現硫化汞的效價高於甲基汞約有一千倍。這些證據給了我們一個基礎去了解當過量使用中藥處方中的硃砂時，所引起汞中毒的現象。

結論與建議

總而言之，本研究結果可得下列幾要點；

1. 我們的研究首先證明硫化汞（硃砂的主要成分），可經由胃腸道吸收輸送至腦部，其神經毒性為甲基汞之五千分之一或更少。
2. 另外，由天竺鼠耳毒性之研究，硫化汞（HgS）耳毒性只有甲基汞（MeHg）之千分之一，且具可逆性。
3. 週邊運動神經毒性研究方面發現，硫化汞（HgS）毒性遠遜於甲基汞（MeHg）。

建議：

雖然本研究已盡人力及物力之投入，已有四篇學術論文發表，但研究工作浩煩，非短期內能完全闡明中醫使用硃砂安神無毒的

神效，傳統所認定的硃砂為上品藥材，仍需要再接再厲的繼續研究，希望終有一天能將其葯理機制完全釐清，以充分的科學證據闡明硃砂的特性，作為硃砂是否應禁用的憑據。

Table 1. The absolute latencies of ABR waveforms in mice treated with mercurial compounds and control mice.

ABR waveform	Absolute latencies (Mean±SE msec)				
	Control	MeHg(mg/Kg)		HgS (g/Kg)	
	0	2.0	0.2	1.0	0.1
A					
I	1.90±0.09	1.94±0.17	1.99±0.12	1.95±0.15	1.94±0.06
II	2.96±0.11	2.99± 0.24	2.96±0.14	2.97±0.19	3.02±0.06
III	3.81±0.15	3.97±0.23	3.92±0.16	3.87±0.17	4.00±0.08
IV	4.86±0.29	4.91±0.31	5.11± 0.19	4.98±0.27	5.04±0.11
V	5.79±0.39	7.10±0.22*	6.39± 0.21*	6.71±0.31*	6.17±0.21
B					
I	1.76±0.09	1.87±0.19	2.02±0.15	1.88±0.17	1.85±0.10
II	2.81±0.11	2.94±0.22	2.89±0.15	2.80±0.16	2.61±0.15
III	3.58±0.16	3.87±0.24	3.80±0.13	3.67±0.20	3.43±0.21
IV	4.54±0.17	5.19±0.29*	4.92±0.19	4.59±0.16	4.50±0.18
V	5.71±0.22	6.58±0.31*	6.21±0.33*	5.64±0.24	5.43±0.27
C					
I	1.68±0.05	1.74±0.09	1.71±0.05	1.71±0.10	1.74±0.06
II	2.42±0.10	2.61±0.24	2.31±0.05	2.44±0.07	2.40±0.05
III	3.70±0.14	3.91±0.18	3.57±0.06	3.67±0.18	3.76±0.06
IV	4.52±0.23	5.02±0.23*	4.56±0.05	4.38±0.19	4.44±0.04
V	5.52±0.06	6.41±0.24*	5.16±0.17	5.30±0.27	5.40±0.03

The ABRs were recorded at 0 (A), 5 (B) and 11 (C) weeks after the discontinuous administration. Data are mean±SE. (n=16 for each group)

*:p < 0.05 as compared with the vehicle control.

表 1.處理不同劑量 HgS、MeHg 對 ABR wave forms 的 absolute latencies 所造成的影響

Table 2. The interpeak latencies of ABR waveforms in mice treated with mercurial compounds and control mice.

ABR waveform	Interpeak latencies (Mean±SE msec)				
	Control	MeHg(mg/Kg)		HgS (g/Kg)	
	0	2.0	0.2	1.0	0.1
A					
I-II	1.09±0.05	1.04±0.18	0.97±0.06	1.03±0.17	1.08±0.06
I-III	2.00±0.08	2.09±0.22	1.87±0.08	1.97±0.19	2.02±0.09
I-IV	3.01±0.14	3.07±0.20	3.01±0.13	3.07±0.19	3.13±0.12
I-V	3.62±0.02	5.11±0.30*	3.85±0.12	4.78±0.27*	3.80±0.25
III-V	2.34±0.04	3.11±0.32*	2.40±0.12	2.80±0.21*	2.17±0.13
B					
I-II	1.05±0.05	1.07±0.09	0.91±0.07	0.98±0.17	0.83±0.07
I-III	2.02±0.11	2.04±0.21	1.86±0.09	1.89±0.19	1.77±0.11
I-IV	2.98±0.15	3.17±0.21	2.98±0.13	2.87±0.24	2.54±0.13
I-V	3.96±0.16	4.69±0.29*	4.32±0.25	3.89±0.26	3.61±0.21
III-V	2.04±0.11	2.68±0.31*	2.43±0.10	2.06±0.23	1.95±0.17
C					
I-II	0.94±0.10	0.97±0.08	0.08±0.05	0.81±0.17	0.88±0.06
I-III	1.88±0.21	2.21±0.22	1.62±0.03	1.94±0.17	1.57±0.02
I-IV	2.94±0.19	3.21±0.16	2.79±0.05	2.77±0.21	2.98±0.03
I-V	3.82±0.32	4.62±0.29*	3.66±0.23	3.68±0.29	3.66±0.02
III-V	1.89±0.13	2.51±0.24*	2.09±0.26	1.79±0.21	1.73±0.02

The ABRs were recorded at 0 (A), 5 (B) and 11 (C) weeks after the discontinuous administration. Data are mean±SE. (n=16 for each group)

*:p < 0.05 as compared with the vehicle control.

表 2.處理不同劑量 HgS·MeHg 對 ABR wave forms 的 interpeak latencies 所造成的影響

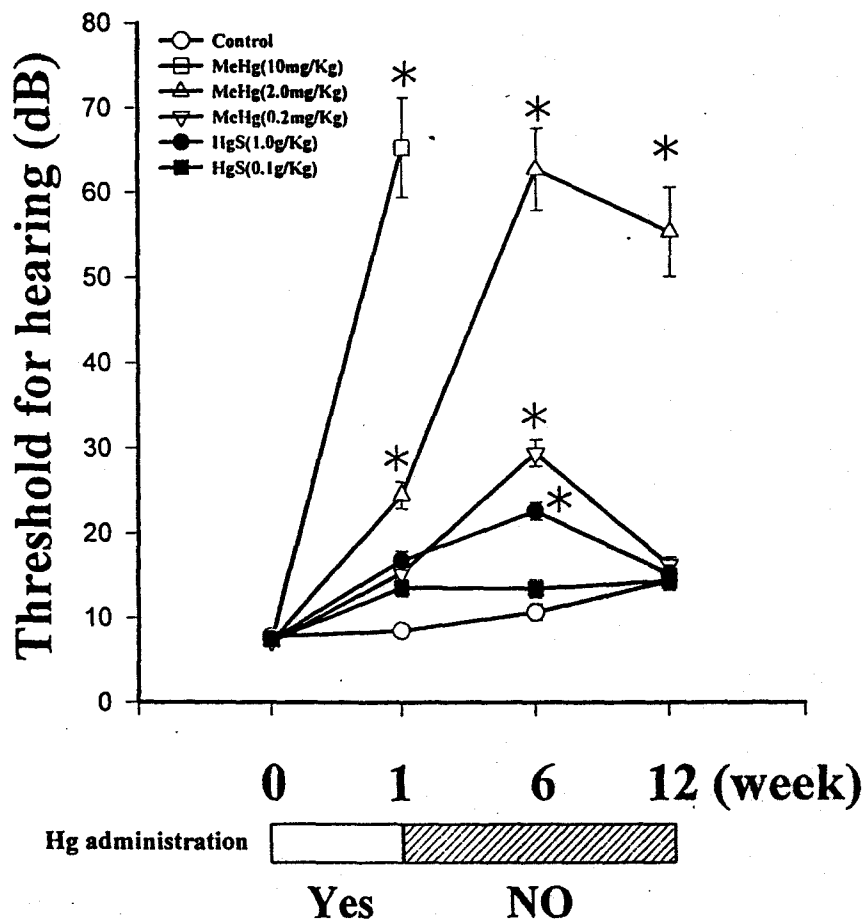


Fig 1. Increase in ABR threshold for hearing after treating the mice with mercurial compounds. Data are mean \pm SE. (n=16 for each group) *:p < 0.05 as compared with control (n=16).

圖 1. 硫化汞、甲基汞連續投予 7 天後，對於 ABR 閾值的作用。

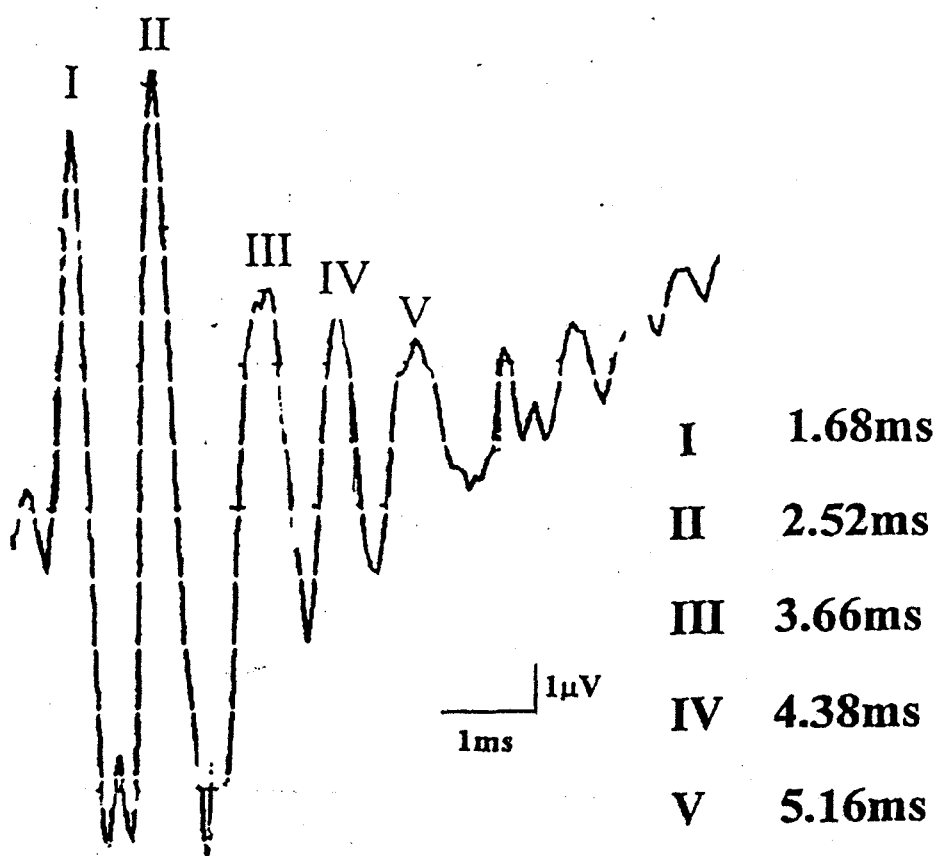


Fig 2. The ABR waveform of a representative mice and absolute latencies of peak waves evoked by an 85 dB (click, 11.1/s) stimulus intensity. The ABR components are identified with Roman numerals and absolute latencies of peak waves (msec) were indicated.

圖 2. 顯示老鼠的 BAEP 波形及 85 分貝刺激毫秒後的絕對 interlatency 值。

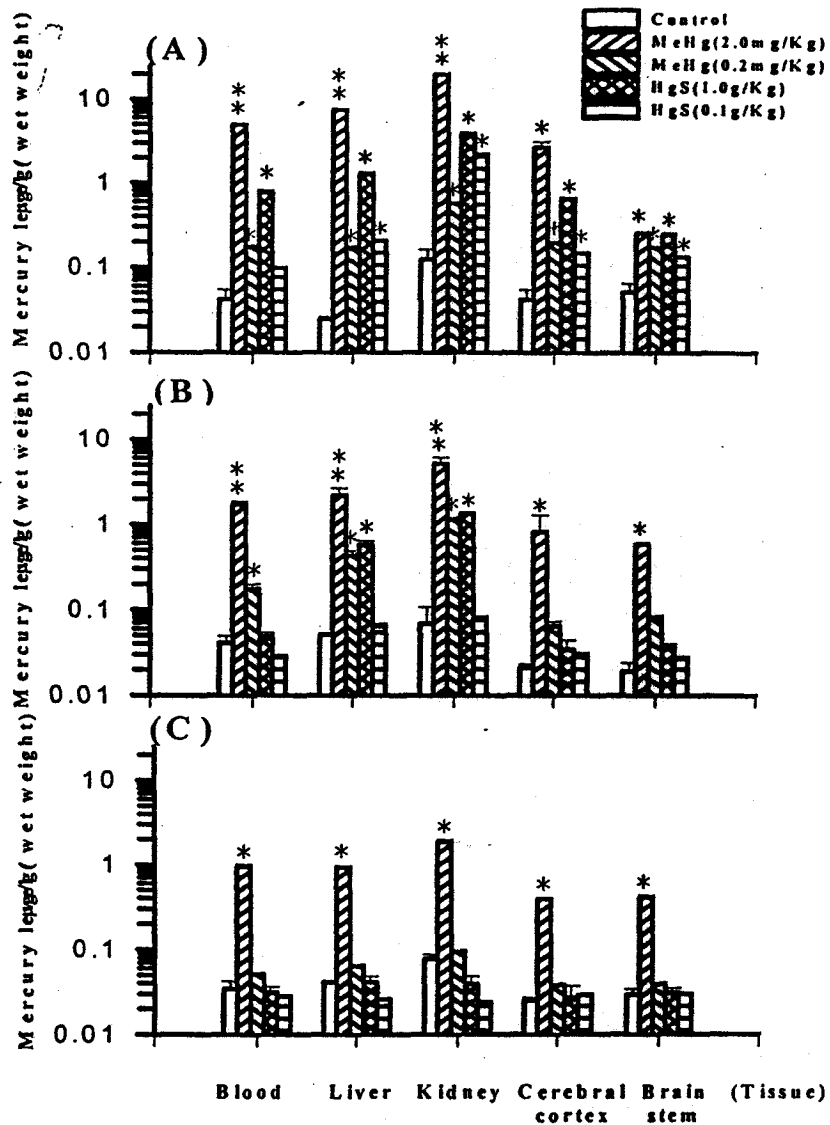


Fig 3. Mercury contents in various tissues of mice. Mercury contents in the blood, liver, kidney, cerebral cortex and brainstem of mice after daily dosing for consecutive 7 days with MeHg (0.2 and 2.0mg/Kg) and HgS (0.1 and 1.0g/Kg) respectively were measured at 0, 5 and 11 weeks after the last administration by means of cold vapor atomic absorption spectrophotometry (AAS). Data are mean±SE. (n=8 for each group) *:p < 0.05, **:p<0.01 as compared with vehicle control (n=8).

圖3 (A)發現在連續七日給予硫化汞(0.1 and 1.0g/kg)及甲基汞(0.2 and 2.0mg/kg)後，汞的含量隨著劑量的增加而蓄積更多的汞於組織中。圖3B. 表示汞的蓄積量會隨著時間距離間斷性投藥時間愈長，而蓄積的愈少。

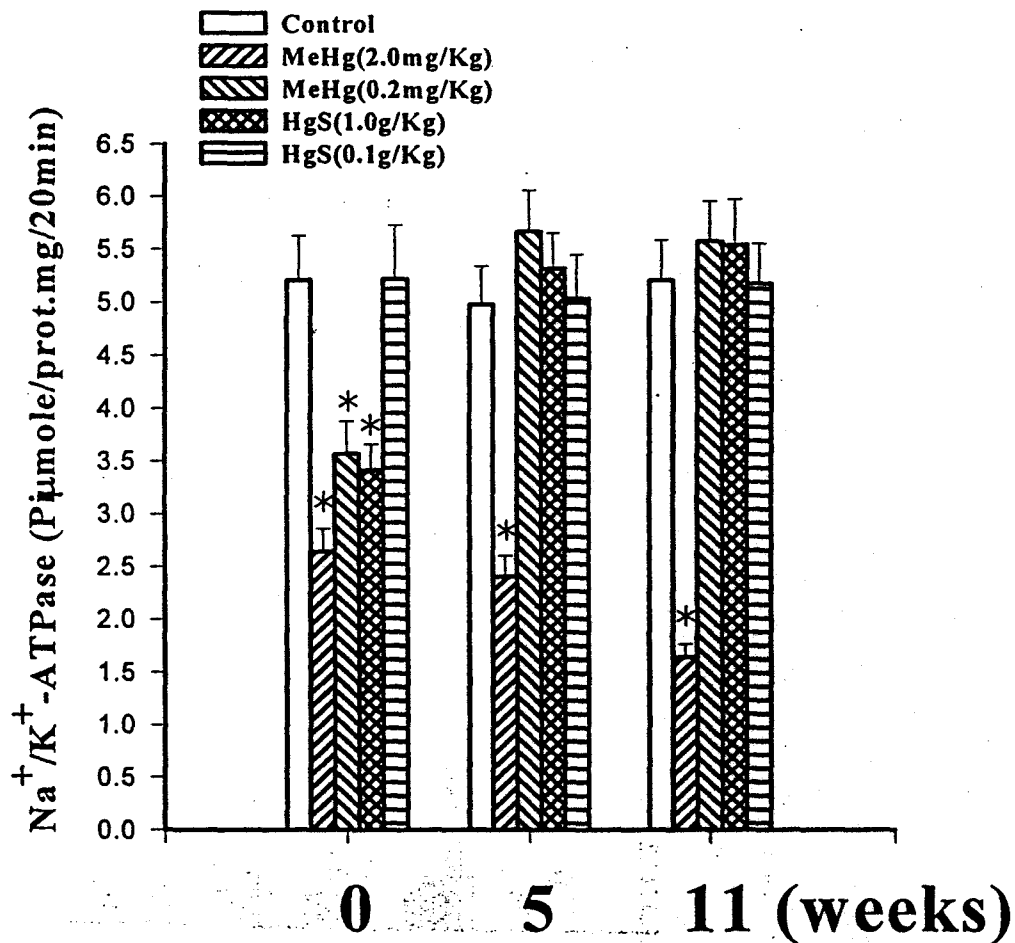


Fig 4. Detection of Na^+/K^+ -ATPase activity on the brainstem of mice. The brain stems of the mice at 0, 5 and 11 weeks after the last treatment with either MeHg (0.2 and 2.0mg/kg) or HgS (0.1 and 1.0g/kg) for consecutive 7 days were used for Na^+/K^+ -ATPase assay. Data are mean \pm SE (n=8 for each group). *:p < 0.05 as compared with control (n=8).

圖 4. 連續七日給予硫化汞(0.1 and 1.0g/kg)及甲基汞(0.2 and 2.0 mg/kg)後，

Na^+/K^+ -ATPase 活性明顯的被抑制。

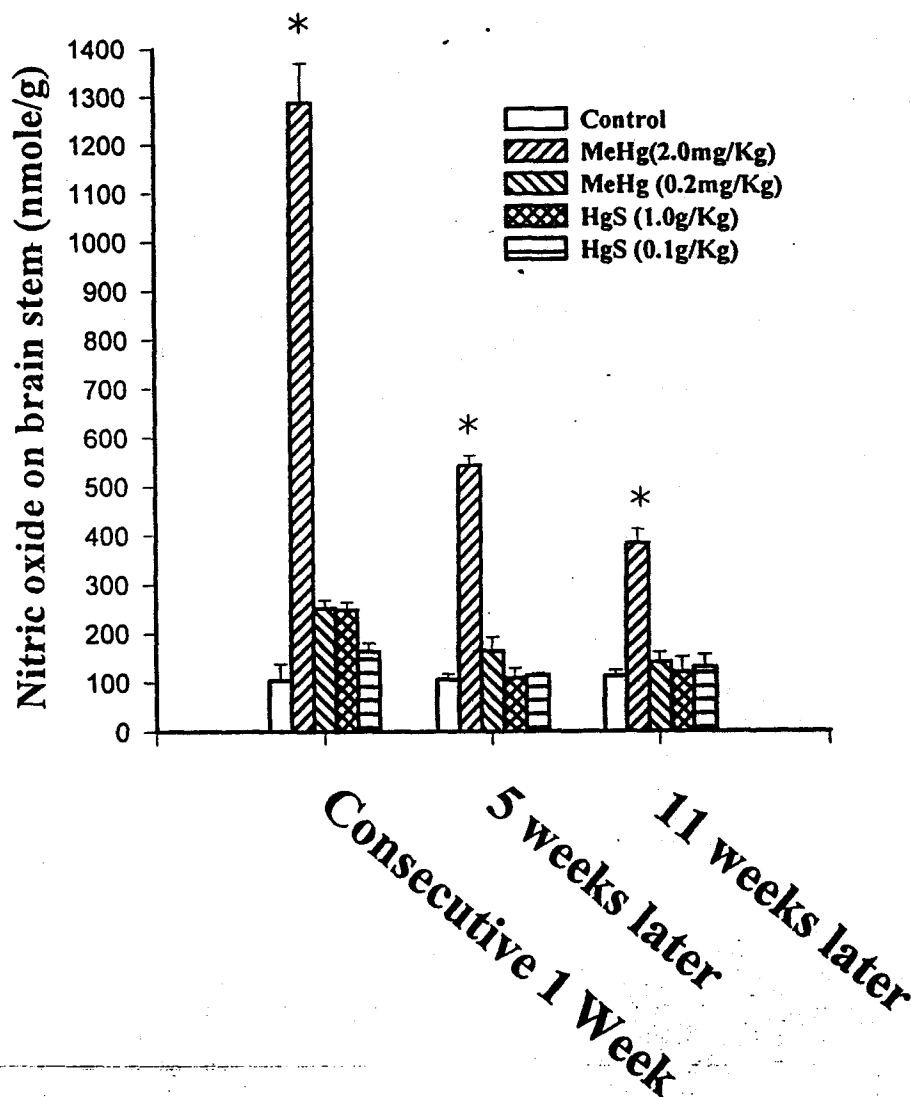


Fig.5. NO_x levels in the brainstem of the mice. The brainstem of the mice at 0, 5 and 11-weeks after the last administration with either MeHg (0.2 and 2.0mg/kg) or HgS (0.1 and 1.0g/kg) for consecutive 7 days were homogenated for determination of NO_x (NO₂⁻ plus NO₃⁻) levels by nitric oxide analyzer (NOA) system. Data are presented as mean±SE (n=8 for each group). **:P < 0.01, *:P < 0.05 as compared with the respective control (n=8).

圖 5. 汞的化合物對腦幹中一氧化氮產生的影響。

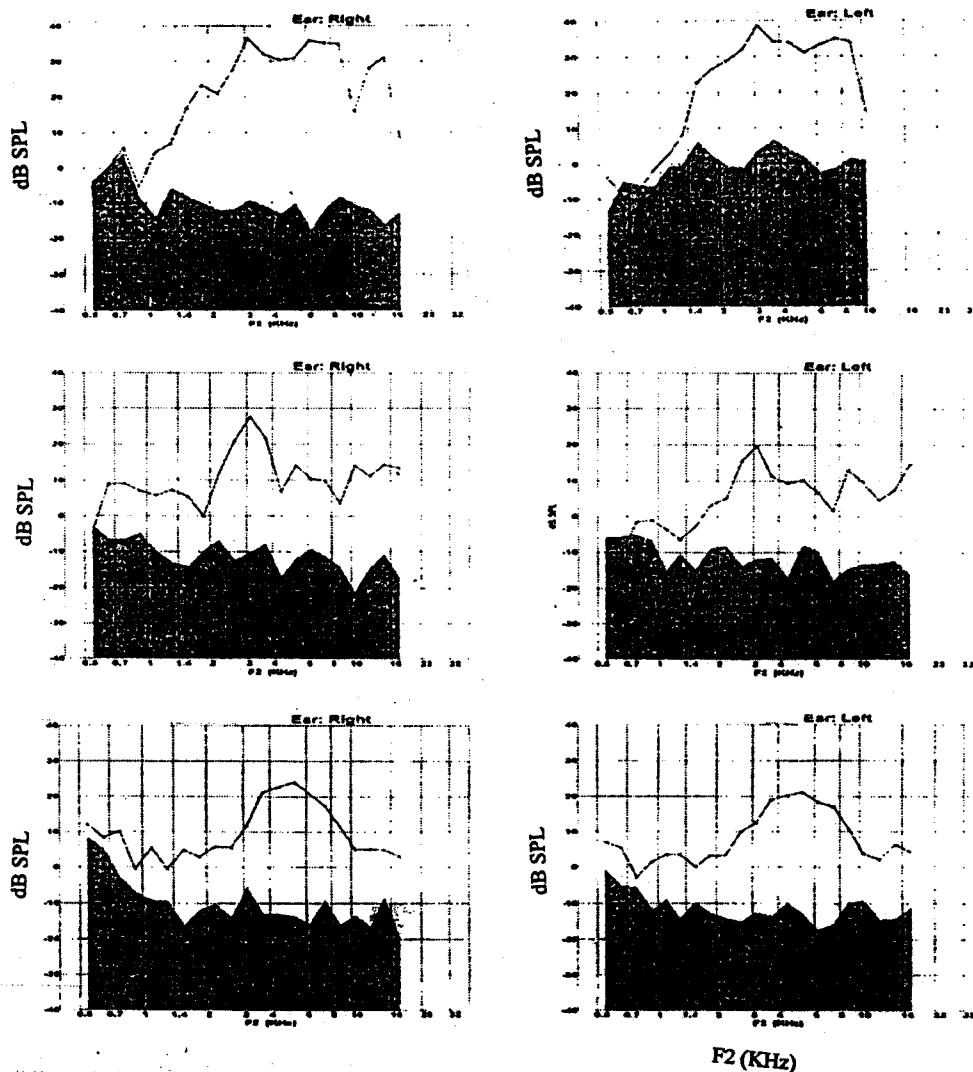


Figure 6. The distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs), obtained using the standard default mode of the ILO 88 equipment for the right (R) and left (L) ears evoked by acoustic intensity (60/70 dB). The black areas in the TEOAE spectra represent the noise floor (NF) range, and the open area above is the emission itself that indicate noise distribution levels at corresponding frequencies. (A)Control, (B)MeHg-treated and (C)HgS-treated group respectively.

圖 6 處理不同劑量 HgS、MeHg 對 DPOAEs 所造成的影響

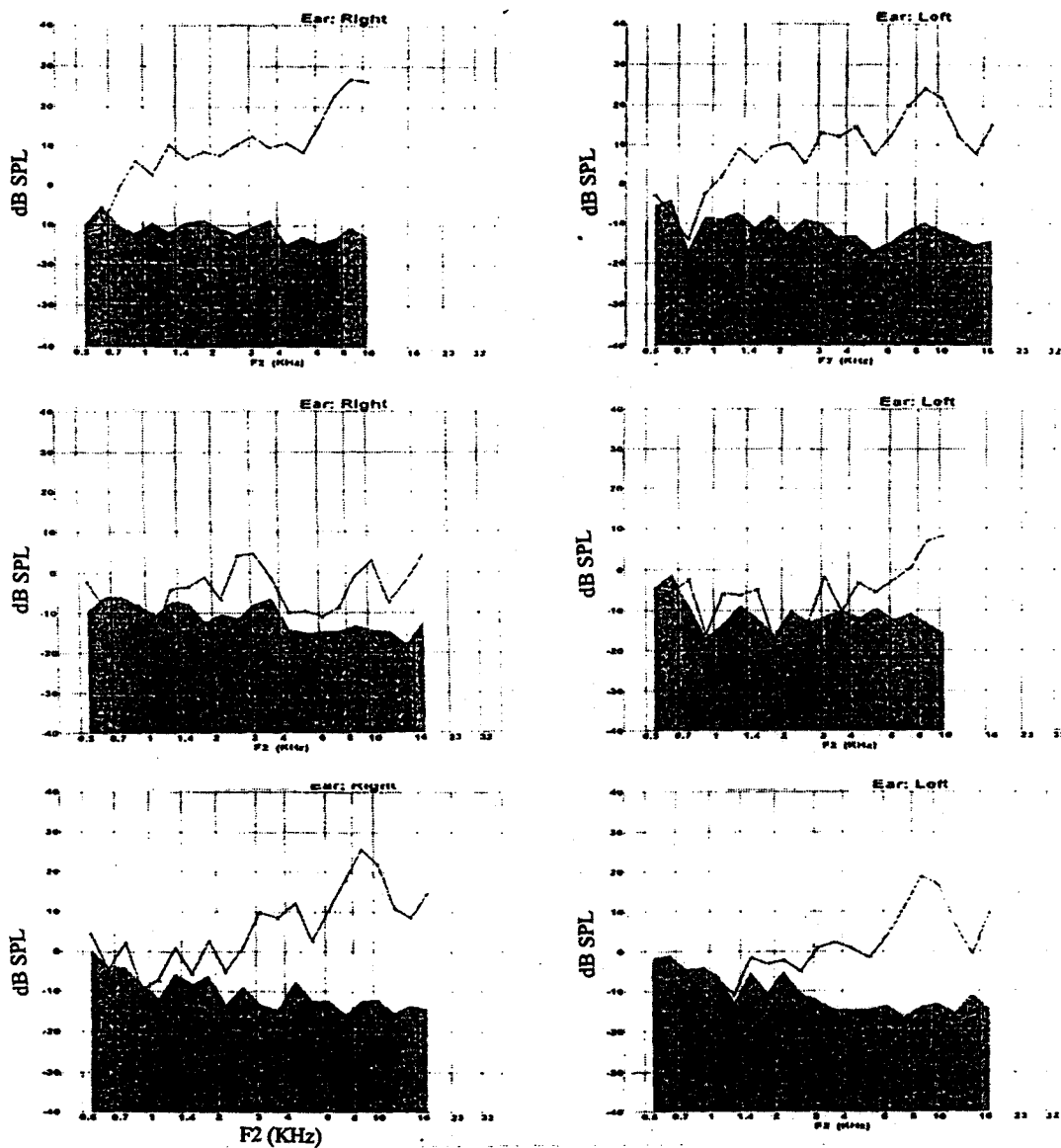


Figure 7. The distortion-product otoacoustic emissions (DPOAEs), obtained using the standard default mode of the ILO 88 equipment by low to high frequencies for the right (R) and left (L) ears after 50/60 dB (intensity). The black areas in the TEOAE spectra (B) represent the noise floor (NF) range, and the open area above is the emission itself. Shaded areas indicate noise distribution levels at corresponding frequencies.

圖 7 處理不同劑量 HgS、MeHg 對 DPOAEs 所造成的影響

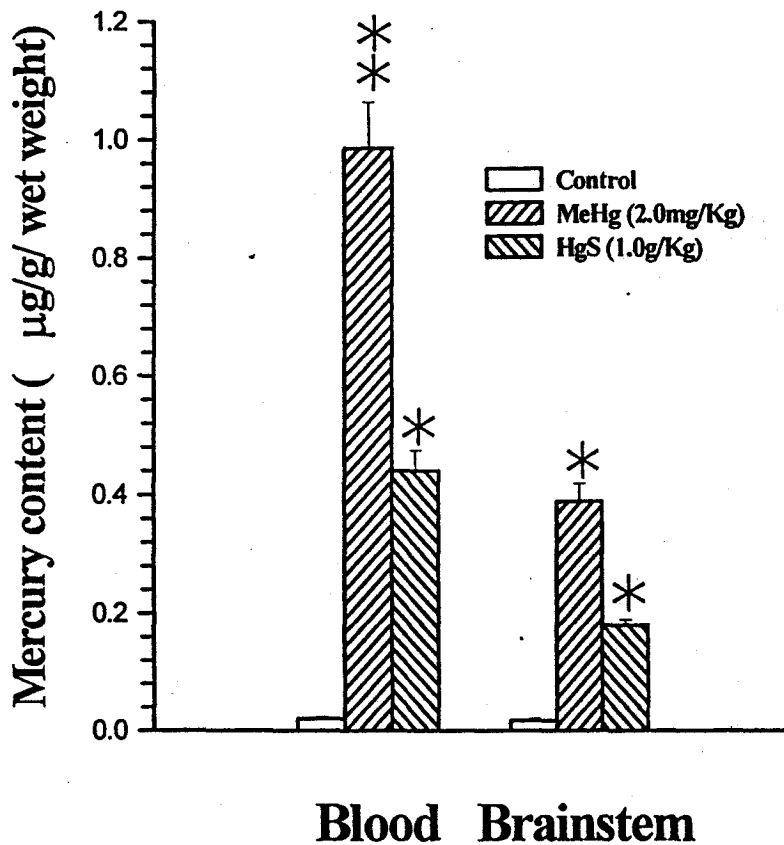


Fig 8. Mercury contents in various tissues of guinea-pigs. Mercury contents in the blood and brainstem of guinea-pigs after daily dosing for consecutive 7 days with MeHg (2.0mg/Kg) and HgS (1.0g/Kg) respectively were measured at 24h after the last administration by means of cold vapor atomic absorption spectrophotometry (AAS). Data are mean±SE. (n=6 for each group) *:p< 0.05, **:p<0.01 as compared with vehicle control (n=10).

圖 8.處理不同劑量 HgS、MeHg 偵測天竺鼠血液及腦幹中汞元素之分部。

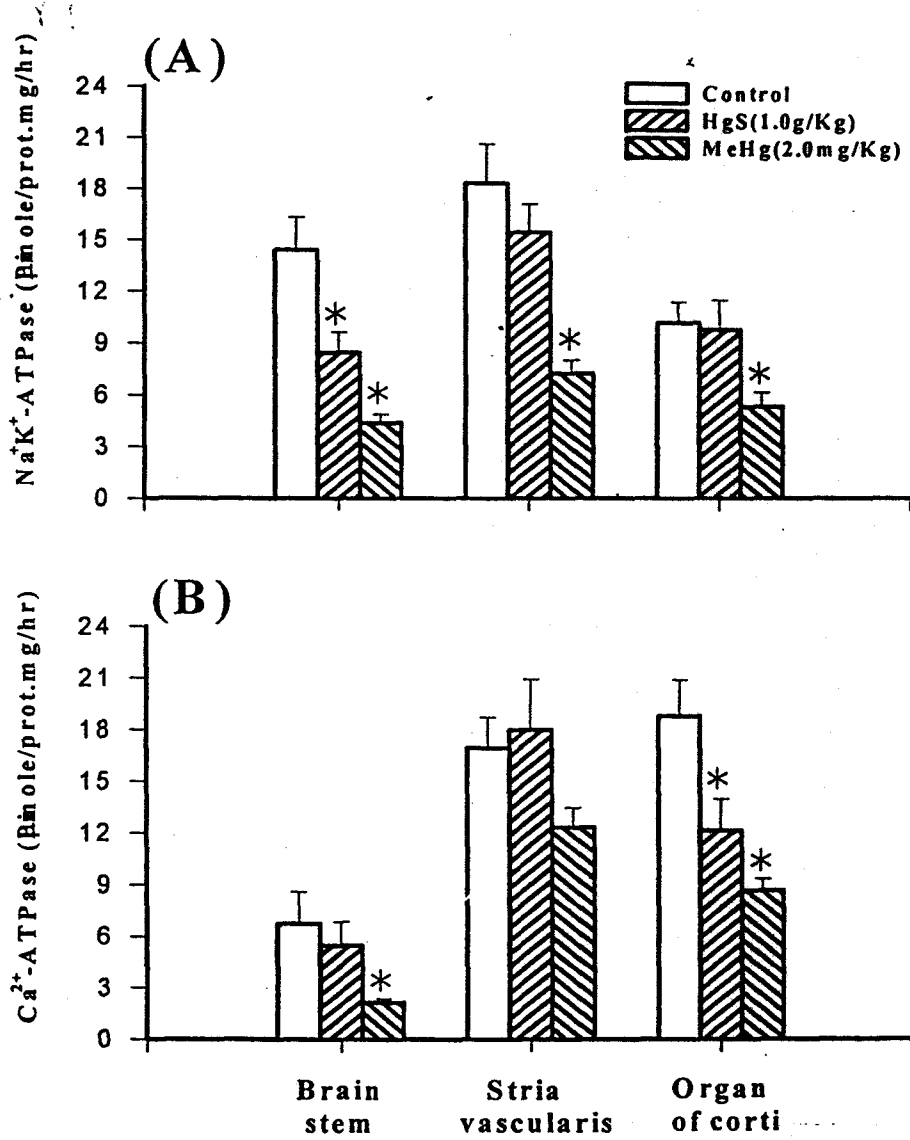


Fig 9. Detection of the activities of Na^+K^+ -ATPase, and Ca^{2+} -ATPase in the brain stem and cochlear of guinea pigs after treatment with MeHg (2.0mg/kg) or HgS (1.0g/kg) for consecutive 7 days. Data are mean \pm SE. (n=6 for each group)*:p < 0.05, **:p<0.01 as compared with control.

圖 9.處理不同劑量 HgS、MeHg 對 calcium-ATPase 活性及 Na^+/K^+ -ATPase 活性所造成的影響

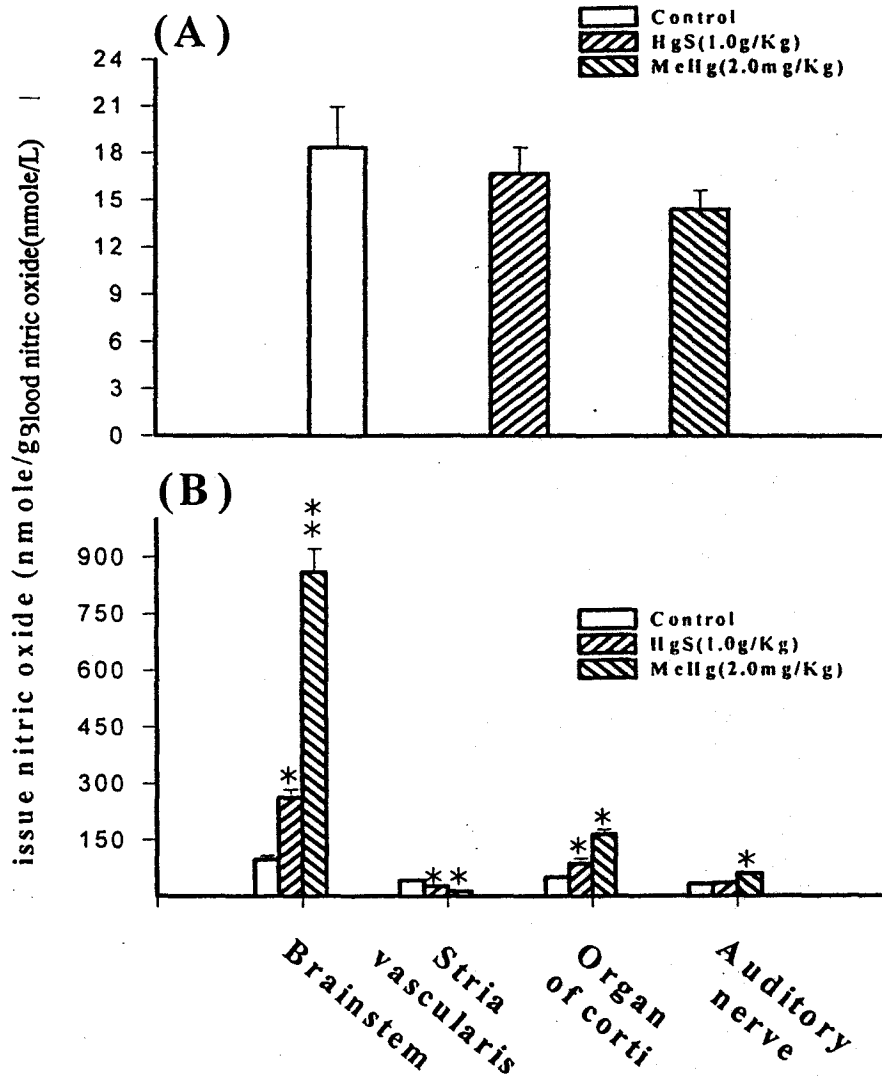


Fig.10. NOx levels in the blood, brainstem and cochlear of guinea-pigs. 24h after the last administration with either MeHg 2.0mg/kg) or HgS (1.0g/kg) for consecutive 7 days, these tissues were homogenated for determination of Nox (NO₂- plus NO₃-) levels by nitric oxide analyzer (NOA) system. Data are presented as mean±SE (n=6 for each group). **:P < 0.01, *:P < 0.05 as compared with the respective control (n=8).

圖 10.處理不同劑量 HgS·MeHg 對 blood·brainstem 及 cochlear 組織中 NOx level 所造成的影響

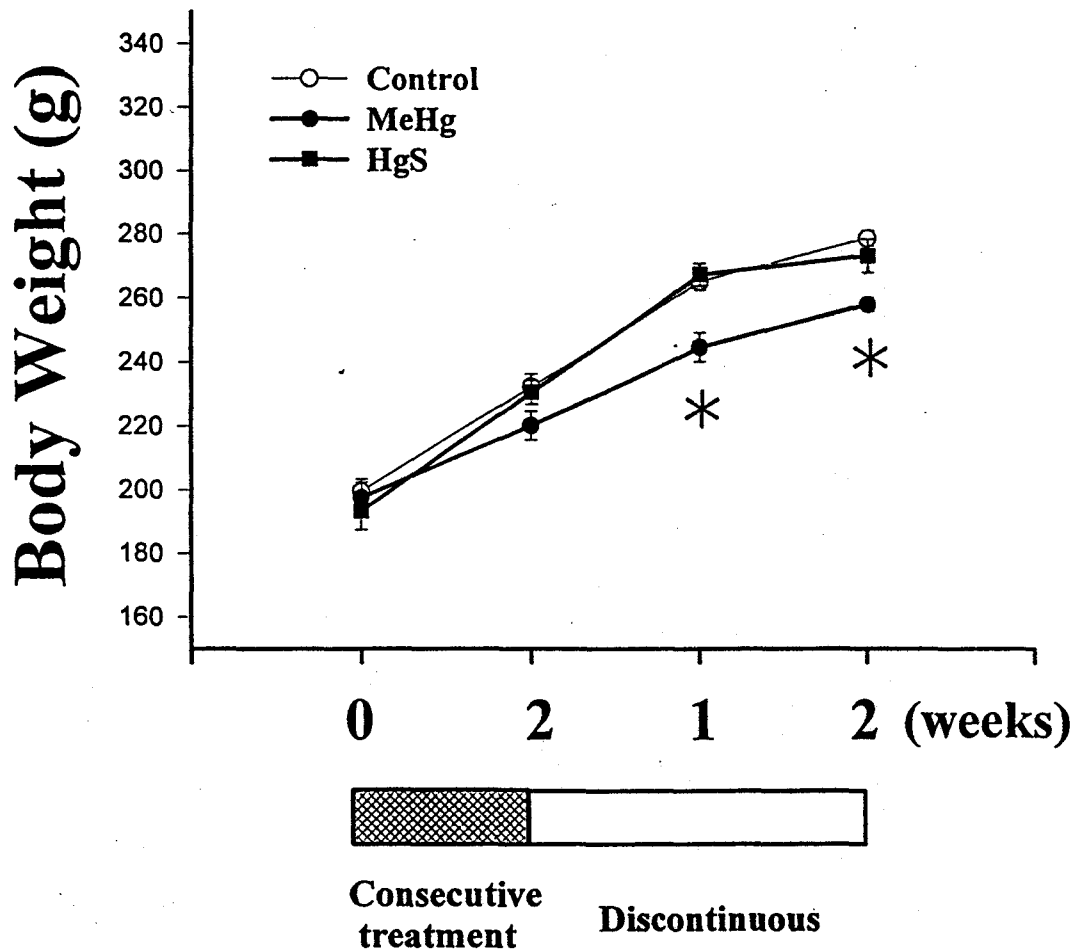


Fig1. Effects of mercurial compounds on body weight of rats. Six rats in each group were orally administered with either MeHg (2.0mg/Kg) or HgS (1.0g/Kg) respectively once every day for 14 consecutive days. The body weights were continuously recorded during and after treatment of mercurial compounds. Data are presented as mean \pm SE. *:P < 0.05 as compared with control.

圖 11. 中指出給予甲基汞(2.0mg/kg) 1 周或 2 周顯著的降低老鼠體重，然而硫化汞(1.0g/kg)則無此現象。

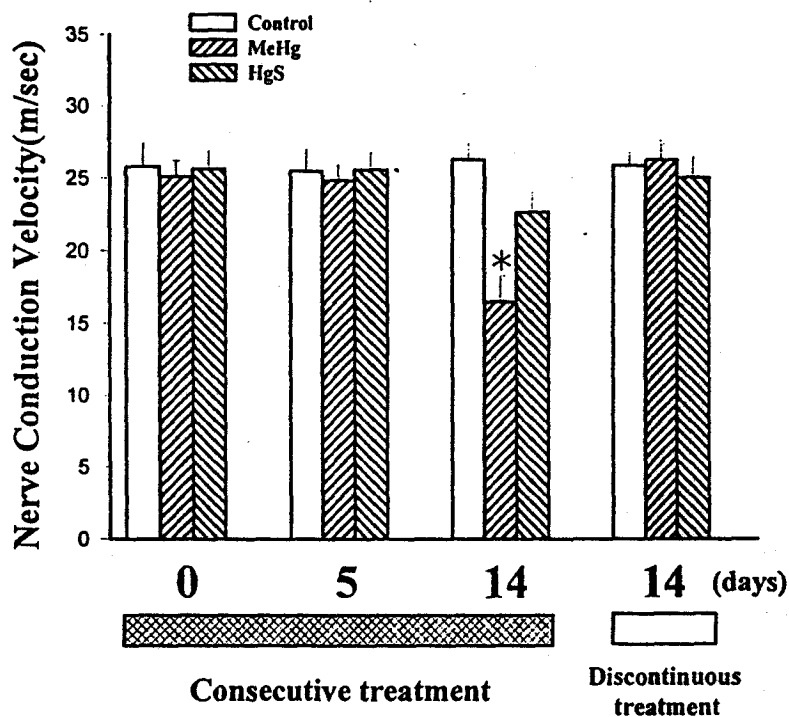


Fig2. Effects of mercurial compounds on the motor nerve conduction velocity of rats. The motor nerve action potentials (MNCV, m/sec) were extracellularly recorded and calculated. Six rats per each group were orally administered with either MeHg (2.0mg/Kg) or HgS (1.0g/Kg) respectively for 14 consecutive days. Data are presented as mean±SE. *:P < 0.05 as compared with control.

圖 12 甲基汞顯著的降低運動神經傳導速率但是硫化汞則無此現象，強直性刺激後甲基汞及硫化汞對複合性肌肉動作電位(CAMP)的影響。

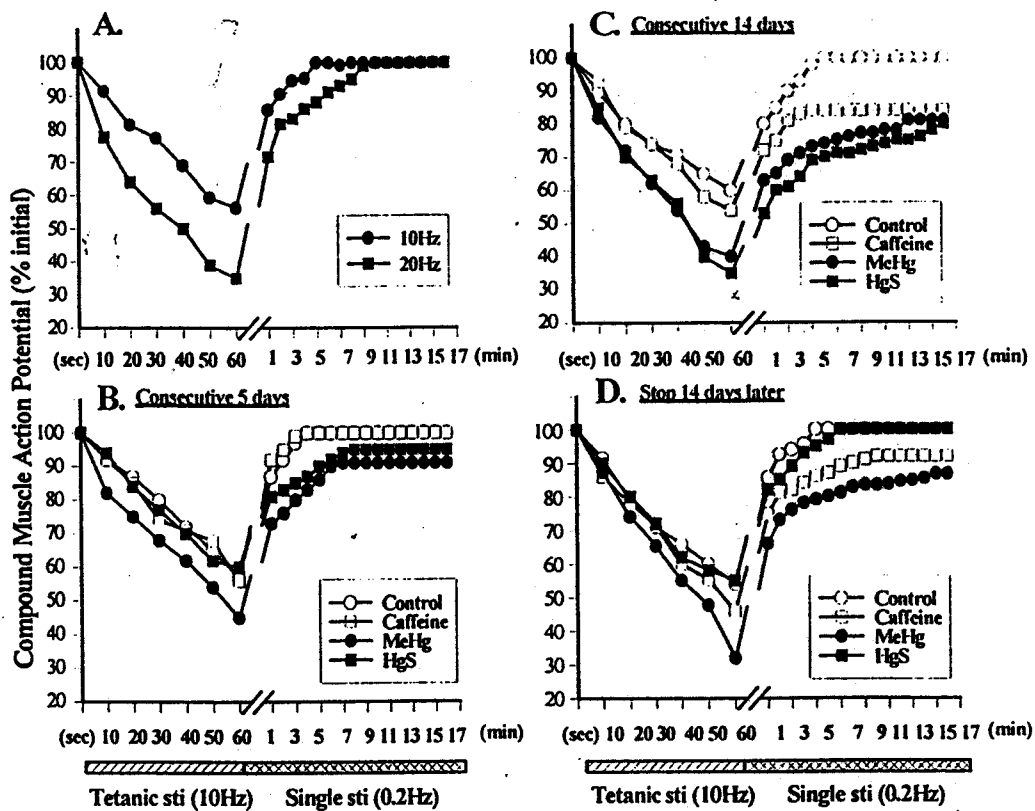


Fig3. Effect of mercurial compounds on the recovery from tetanic stimulation-induced fatigue of synaptic transmission in rats. Progressive suppression of muscle action potentials by tetanic stimulations (10Hz) for 60s and subsequent recovery during single stimulation (0.2Hz) for 17 mins of the rat caudal nerve. The amplitudes of compound muscle action potentials (CMAP) were extracellularly recorded and expressed as percentage of initial values. Six rats per each group were orally administered with either MeHg (2.0mg/Kg), HgS (1.0g/Kg) and caffeine (20mg/Kg) respectively for 14 consecutive days. The data shown are the control before (A) and after administration of either caffeine as positive effect or mercurial compounds for consecutive 5 days (B) or consecutive 14 days (C) and then after discontinuous treatment for 14 days later (D).

圖 13.A. 複合性肌肉動作電位時間上的改變呈現在於。圖 B. 甲基汞產生較快的複合肌肉動作電位抑制且較慢的恢復(約起始之 87%, $p < 0.05$), 而硫化汞只引發較慢恢復速率。圖 D. 抑制作用的可逆性, 我們發現在 0.2Hz 頻率刺激 17 分後, 甲基汞與咖啡因不完全恢復起始值, 而硫化汞組可完全回到起始值。

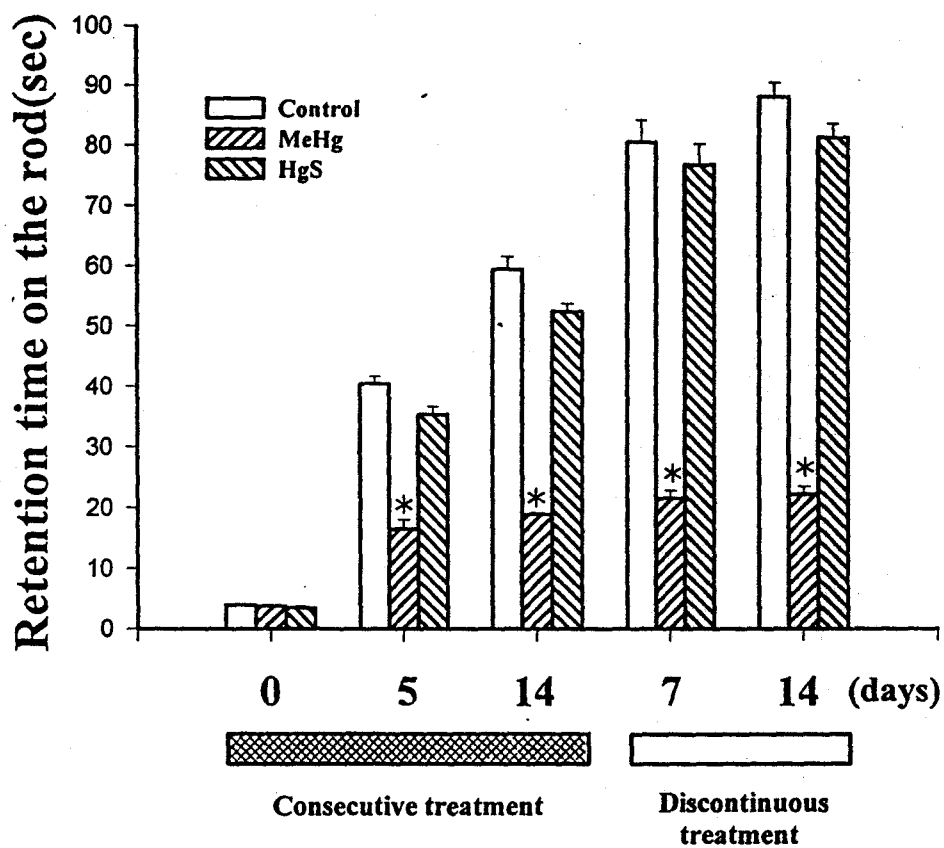


Fig4. Effects of mercurial compounds on the progressive training and acquisition process of rota-rod performance in rats. Rota-rod performance is expressed as retention time on the rod rotated at 8.0 r.p.m for one session, which consisted of 10 trials in a day. The retention time of six rats per each group stayed on the rota-rod (max.180sec) was calculated by summation of total retention time of 10 trials divided by 10 and recorded. Following MeHg (2.0mg/Kg) and HgS (1.0g/Kg) administration orally for consecutive 14 days, the changes of the retention time were presented. *:P < 0.05 as compared with the vehicle control.

圖 14 甲基汞組與控制組或硫化汞組比較，產生不可逆的不正常滾輪運動表現。

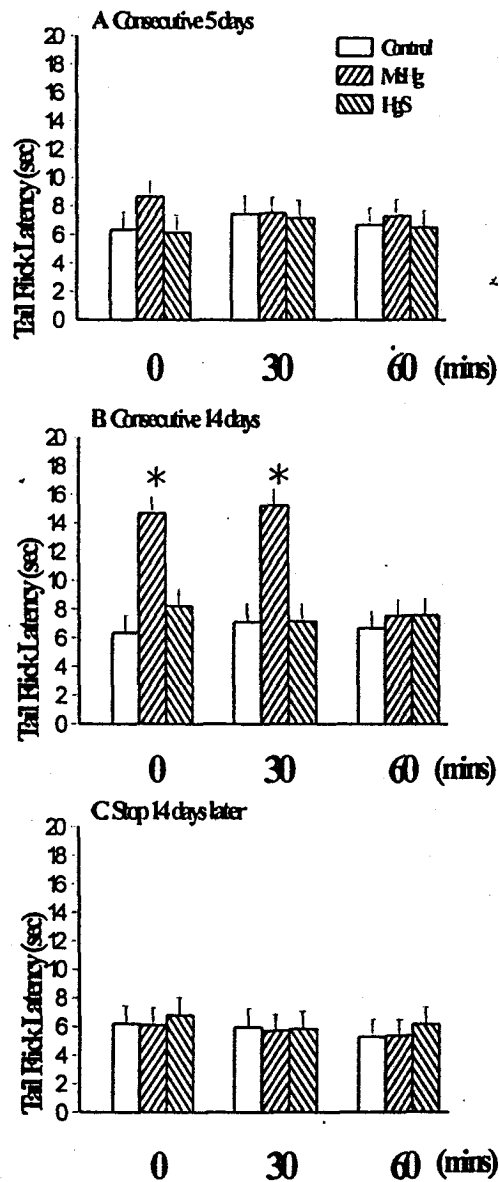
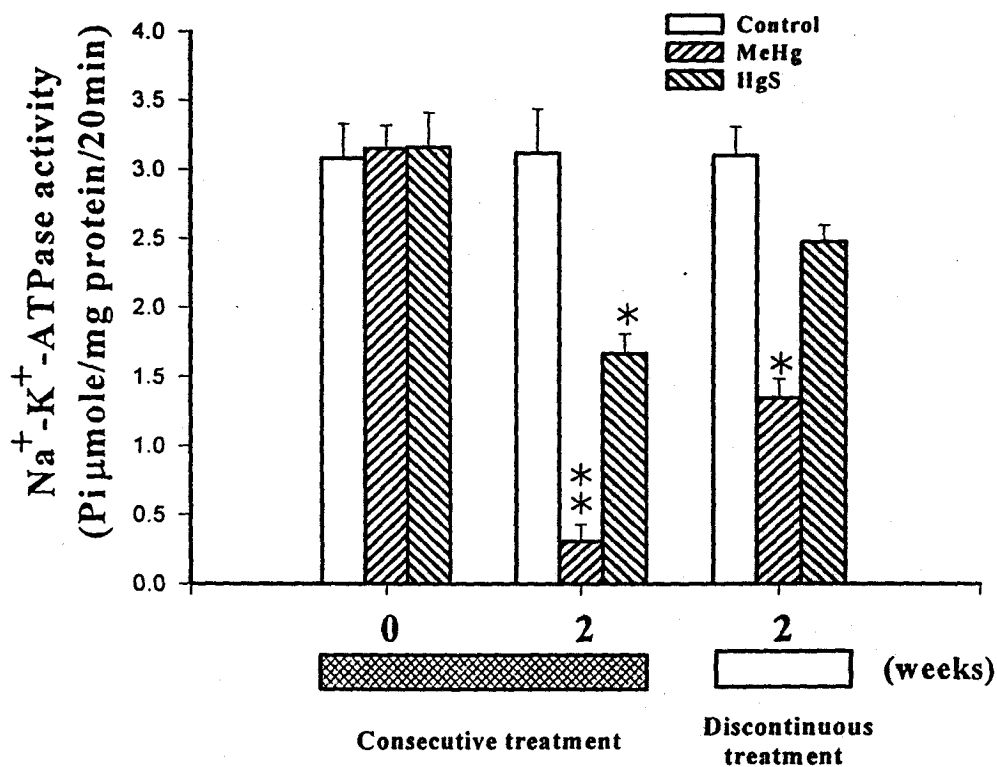


Fig.5. Effects of methyl-mercury (MeHg) and mercuric sulfide (HgS) on the thermal induced hyperalgesia in rats. Tail flick testing expressed as the thermal withdrawal latencies was performed throughout two 30-min intervals (the time courses for testing are 0th, 30th and 60th min). MeHg (2.0mg/Kg) and HgS (1.0g/Kg) were administered respectively for consecutive 5 days (A), consecutive 14 days (B) and stop 14 days later (C). *:P < 0.05 as compared with the vehicle control.

圖 15.A. 甲基汞及硫化汞組的老鼠皆不會引發對每 30 分間隔熱引起痛覺過敏有抑制作用。圖 B. 持續給藥 14 天後，甲基汞組會有抗感受性傷害的效應，而硫化汞則無。圖 C. 停藥 14 天後，完全恢復對熱引發之痛覺過敏正常反應



Fig/6. Effect of Hg compounds administration on Na⁺/K⁺-ATPase activity of the rat sciatic nerves. Following MeHg (2.0mg/Kg) and HgS (1.0g/Kg) administration orally for consecutive 14 days, the enzymatic activity was detected at various time courses
*:P < 0.05, **:P<0.01 as compared with the vehicle control.

圖 16 甲基汞顯著且不可逆抑制鈉-鉀幫浦活性。然而，在硫化汞組則則可逆性降低此幫浦活性。

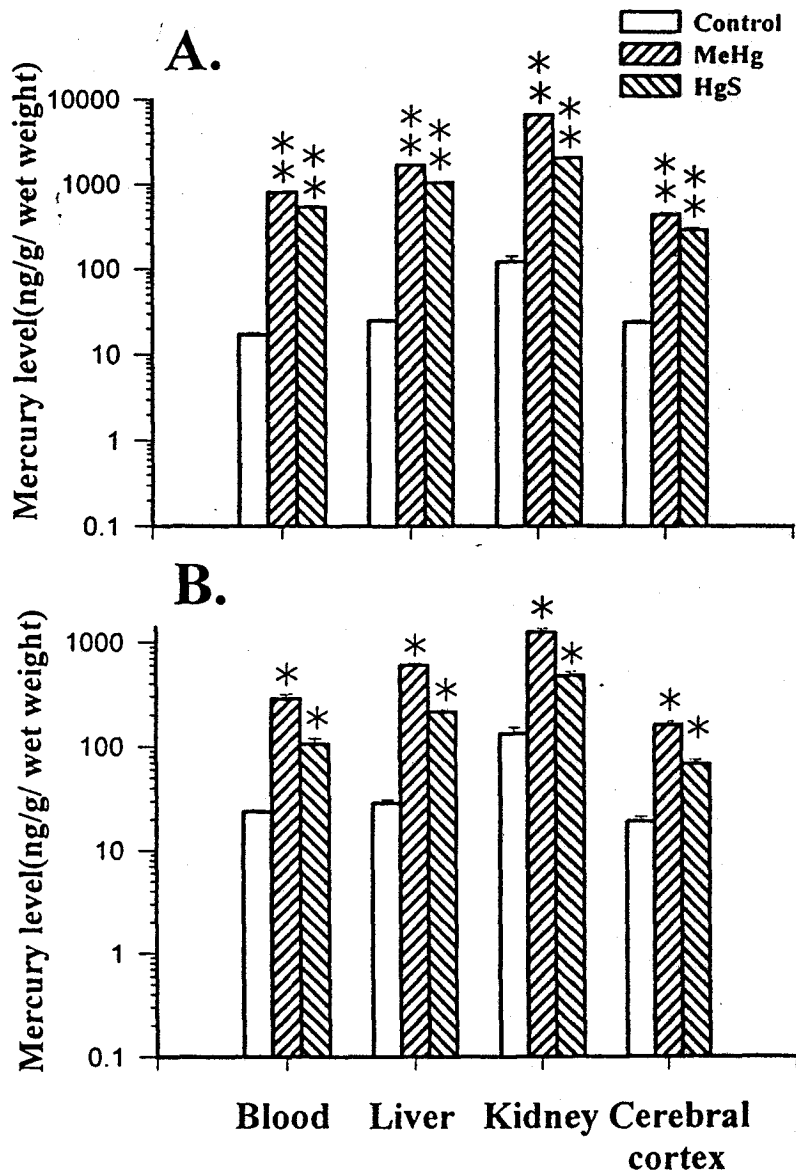


Fig7. Hg contents of various tissues of rats. Following daily orally dosing for consecutive 14 days with MeHg (2.0mg/Kg) and HgS (1.0g/Kg), mercury accumulation in the whole blood, liver, kidney and cerebral cortex of rats were measured immediately (Fig. 7A) and 14 days (Fig. 7B) after the last administration by cold vapor atomic absorption spectrophotometry (AAS). Data are presented as mean±SE. *:p < 0.05, **:p < 0.01 as compared with vehicle control.

圖 17.A. 硫化汞、甲基汞處理後，肝、腎及大腦皮質等主之皆測到有大量的汞蓄積。圖 B. 連續給甲基汞 14 天後，血中汞含量達十億分之 800。停藥 14 天後仍有十億分之 250，且其他組織停藥後仍有顯著性汞蓄積。

Reference

1. Adams, C.E. and Stevens, K.E. (1998) Inhibition of nitric oxide synthase disrupts inhibitory gating of auditory responses in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther.* 287, 760-5.
2. Andersen A, Ellingsen DG, Morland T, Kjuus H. A neurological and neuro-physiological study of chloralkali workers previously exposed to mercury vapour. *Acta Neurol Scandia.* 1993; 88: 427-33.
3. Balestrino M. Young J. Aitken P. (1999) Block of (Na⁺,K⁺)ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain. Res.* 838: 37-44
4. Bay BH.; Wang, M.C.; Yip, G.W.: Effect of intraperitoneal administration of zinc on C57/6J mouse liver-a light microscopic study. *Okajimas Folia Anatomica Japonica.* 74:279-91; 1998.
5. Beauchamp, R. O. ; Jr Bus, J. S. ; Popp, J. A. ; Boreiko, C. J. ; Andjelkovich, D. A. : A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol.* 13: 25-97; 1984.
6. Birke, G.; Johnels, A.G.; Plantin, L.O.; Sjostrand, B.; Skerfving, S.; Westermark, T.: Studies on humans exposed to methyl mercury through fish consumption. *Arch Environ Health.* 25: 77-91; 1972.
7. Bolanos, J.P.; Almeida, A.: Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. [Review] *Biochim Biophys Acta.* 1411: 415-36; 1999.
8. Caston J, Jones N, Stelz.T (1995) Role of preoperative and

- postoperative sensorimotor training on restoration of the equilibrium behaviour in adult mice following cerebellectomy. *Neurobiol. Learn. Mem* 64: 195-202
9. Chang, Y.C., Yeh, C.Y. and Wang, J.D. (1995) Subclinical neurotoxicity of mercury vapor revealed by a multimodality evoked potential study of chloralkali workers. *Am J Ind Med.* 27, 271-9.
 10. Dewhurst, M., Omawari, N. and Tomlinson, D.R. Aminoguanidine--effects on endoneurial vasoactive nitric oxide and on motor nerve conduction velocity in control and streptozotocin-diabetic rats. *Brit J Pharmacol.* 120: 593-8, 1997.
 11. Dow RS: Cerebellar cognition. *Neurology* 1995; 45: 1785-6
 12. Garza RD, Cunningham KA (2000) The effects of the 5-hydroxytryptamine (1A)
 13. Gerbi, A. and Maixent, J.M. (1999) Fatty acid-induced modulation of ouabain responsiveness of rat Na, K-ATPase isoforms. *J. Mem. Bio.*, 168:19-27.
 14. Gibbs, M.E. and Ng, K.T. (1979) Similar effects of a monoamine oxidase inhibitor and a sympathomimetic amine on memory formation. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 11:335-339.
 15. Gilbert, S.G. and Grant-Webster, K.S. (1995). Neurobehavioral effects of developmental methylmercury exposure. *Environ. Health Persp.*, 103:135-142.
 16. Grandjean, P. Budtz-Jorgensen, E. White, R.F. Jorgensen, P.J. Weihe, P. Debes, F. and Keiding, N. (1999) Methylmercury exposure biomarkers as indicators of neurotoxicity in children aged 7 years. *Am. J. Epidem.*, 150:301-305.

17. Grandjean, P. Weihe, P. White, R.F. Debes, F. Araki, S. Yokoyama, K. Murata, K. Sorensen, N. Dahl, R. and Jorgensen, P.J. (1997) Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:417-428.
18. Hardy AD, Sutherland HH, Vaishnav R, et al: A report on the composition of mercurials used in traditional medicines in Oman. *J Ethnopharmacol.* 1995; 49, 17-22.
19. Levesque, P.C. Hare, M.F. and Atchison, W.D. (1992) Inhibition of mitochondrial Ca^{2+} release diminishes the effectiveness of methyl mercury to release acetyl-choline from synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 115:11-20.
20. Liang, M. and Knox, F.G. Nitric oxide activates PKC α and inhibits Na^+ - K^+ -ATPase in opossum kidney cells. *Am J Physiol.* 277: F859-65, 1999.
21. Lin, C.H.; Kang, B.H.; Wong, C.H.; Mao, S.H.; Wan, F.J.: Systemic administration of D-amphetamine induced a delayed production of nitric oxide in the straitum of rats. *Neurosci Lett.* 276: 141-144; 1999.
22. Liu SH. Lin-Shiau SY. (1992) Studies on mercury-induced myotonia in the mouse diaphragm. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie.* 319:86-100
23. Liu, S.H., Sheu, Z.J., Lin, R.H. and Lin-Shiau, S.Y. The in vivo effect of lipopoly- saccharide on neuromuscular transmission in the mouse. *Eur J Pharm.* 333: 241-7, 1997.
24. Low, P.A. and Tuck, R.R. Effects of changes of blood pressure, respiratory acidosis and hypoxia on blood flow in the sciatic nerve of

the rat. *J Physiol.* 347: 513-24, 1984.

- i. mercuric sulphide and their possible effects on tissue glutathione in mice, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 42: 307-314
25. Moller MB. Localization of mercury in CNS of the rat. V. Inhalation exposure to metallic mercury. *Arch Toxicol.* 1992; 66: 79-89.
26. Rudolfs KZ, Lawrence HL (1994) Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J Toxicol Env Health* 42:1-44
27. Rudolfs KZ, Lawrence HL (1994) Advances in understanding the renal transport and toxicity of mercury. *J Toxicol Env Health* 42:1-44
28. Santucci B, Cannistraci C, Cristaudo A, Camera E, Picardo M. Thimerosal positivities: the role of organomercury alkyl compounds. *Cont Dermat.* 1998; 38: 325-8.
29. Scharschmidt, B.F. Keeffe, E.B. Blankenship, N.M. and Ockner, P.K. *J. Lab. Clin. Med.* 93, 790-799, 1979.
30. Schwarz JR, Grigat C. Phention and carbamazepine: potential- and frequency- dependent block of Na currents in mammalian myelinated nerve fibers. *Epilepsia.* 1989; 30: 286-294.
31. Sin YM. Teh WF. (1992) Effect of long-term uptake of mercuric sulphide on thyroid hormones and glutathione in mice. *B. Environ. Contam. Tox.* 49: 847-54
32. Sin YM. Teh WF. Wong MK. Reddy PK. (1990) Effect of mercury on glutathione and thyroid hormones. *B. Environ. Contam. Tox.* 44: 616-22
33. Stanley BH, Stanley M. Psychiatric patients in research: protecting

- their autonomy. *Comprehen Psychiat.* 1981; 22: 420-7.
34. Tie B, Qi W, Chen G: Determination of soluble mercury contents in Chinese traditional patent medicines for children. *China J Chinese Mater Med* 1990; 15: 602-4.
 35. Tonner, P.H.; Scholz, J.; Schlamp, N.; Schulteam Esch, J.: Inhibition of nitric oxide metabolism enhances the hypnotic-anesthetic action of the alpha2-adrenoceptor agonist dexmedetomidine in vivo. *J of Neurosurg Anesth.* 11: 37-41; 1999.
 36. Warenycia, M.W.; Reiffenstein, R.J.; Goodwin, L.R.; Dieken, F.P.: Brain sulfide levels in anaesthesia: a comparison with hydrogen sulfide intoxication. *Toxicol Lett.* 47: 221-4; 1989.
 37. Wassick KH, Yonovitz A. (1985) Methyl mercury ototoxicity in mice determined by auditory brainstem responses. *Acta Oto Laryngol* 99: 35-45
 38. Wild, L.G.; Ortega, H.G.; Lopez, M.; Salvaggio, J.E.: Immune system alteration in the rat after indirect exposure to methyl mercury chloride or methyl mercury sulfide. *Environ Res.* 74: 34-42; 1997.
 39. Yeoh, T.S., Lee, A.S. and Lee, H.S. (1986) Absorption of mercuric sulphide following oral administration in mice. *Toxicology.* 41, 107-11.
 40. Yoshida M. Watanabe C. Satoh H. Kishimoto T. Yamamura Y. (1994) Milk transfer and tissue uptake of mercury in suckling offspring after exposure of lactating maternal guinea pigs to inorganic or methylmercury. *Arch Toxicol.* 68: 174-8

答覆期末報告書面審查之意見：

成果報告內容修正部分：

1. 封面已補，結論及建議補於文後 (P.35)
2. 成果報告原分二部分，現已合併為一，圖表順序也已整合為一，縱軸標示不清者已修正。
3. 由於本研究內容非常多，在一年半內不可能將硃砂的實驗，如硫化汞相關實驗全部完成，但我們正努力進行，等最後半年做總結報告時，再補充硃砂對自發性運動量、主動迴避學習反應及對 pentobarbital 誘發小鼠睡眠時間的影響。
4. 有關 NO 及 Na^+/K^+ -ATPase 活性的相關性報告及文獻很少，尚未查到。
5. 餵食 HgS7 天的實驗室原先開始研究的設計，後來在成果報告中有些審查委員建議改用 14 天，因此，另一實驗就循委員的建議而執行之。

感謝審查委員對我們研究成果的肯定，我們希望能再接再厲繼續研究硃砂，以期獲得更好的研究成果。