

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， $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, nitric oxide

## 前言

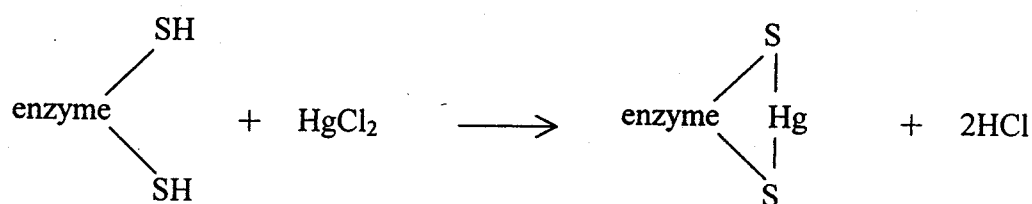
金屬汞，其學名為 mercury，化學式 Hg 源自於拉丁文 hydragyrum，熔點僅攝氏零下 38.9 度，故是室溫下唯一以液態存在之金屬；因其在常溫下呈銀白色液狀，故俗名水銀(liquid silver)(黃等，1991)

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  $\text{Hg}^{2+}$  的平濃度為  $2 \times 10^{-9}$  g/L；大氣中為  $2 \times 10^{-12}$  g/L；海洋中為  $2 \times 10^{-9}$  g/L；土壤中為  $20 \times 10^{-6}$  g/kg；海底沉澱物中的汞化物主要為 HgS，其平均濃度為  $20 \times 10^{-6}$  g/kg。金屬汞( $\text{Hg}^0$ )溶於水會轉變為  $\text{Hg}^{2+}$ ， $\text{Hg}^{2+}$  又易與硫反應產生 HgS 並沉澱。在厭氧(anaerobic)狀態下，HgS 中之  $\text{S}^{2-}$  被還原，產生可溶性之  $\text{HgSO}_4$ ，並再度釋放出  $\text{Hg}^{2+}$ 。(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/m<sup>3</sup> 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(Hg<sup>2+</sup>、Hg<sup>+</sup>)之毒性：

HgCl<sub>2</sub> 的中等致死量(LD<sub>50</sub>)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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，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 HgCl<sub>2</sub> 會降低 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 的活性，進而影響 Ca<sup>2+</sup> 的代謝，因 Ca<sup>2+</sup> 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  $\text{HgCl}_2$  和較難溶解的  $\text{HgS}$  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  $\text{HgCl}_2$  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  $\text{HgS}$  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  $\text{HgCl}_2$  和  $\text{HgS}$  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  $\text{HgS}$  並不造成生物體臟器的大量蓄積，顯示因為  $\text{HgS}$  不易解離，所以腸內的吸收率不佳。

#### 五、有機汞 ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ 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  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  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( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ )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，驅邪瘧。

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、癩、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 ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Mg}^{2+}$ -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.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性 被 ouabain ( $3.74\text{ mM}$ ) 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  $5\text{ mM}$ ) 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  $630\text{ nm}$  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. $\text{Ca}^{2+}$ -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 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性測試

一些相關文獻指出  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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， $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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  $\text{NO}_x$  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