

比较佐太、朱砂与汞化合物对胎、幼、孕和老年鼠的肾脏毒性

李文楷¹ 侯玮钰¹ 吴青² 罗娅³ 岑语燕³ 陆远富¹ 刘杰¹ 魏立新⁴

(1. 遵义医学院 基础药理省部共建教育部重点实验室 贵州 遵义 563099; 2. 遵义医学院 药学院, 贵州 遵义 563099; 3. 遵义医学院 公共卫生学院 贵州 遵义 563099; 4. 中国科学院西北高原生物研究所 藏药研究重点实验室, 青海 西宁 810001)

[摘要] 目的 比较佐太、朱砂和汞化合物对胎、幼、孕和老年鼠的肾毒性。方法 采用孕19 d的胎鼠、母孕鼠、刚断奶的幼鼠和15月的老年鼠(均为SD大鼠),口服给予藏药佐太(30 mg/kg)、朱砂(HgS, 30 mg/kg),以及等汞量的氯化汞(HgCl₂, 33.6 mg/kg)和1/10等汞量的甲基汞(MeHg, 3.1 mg/kg),连续7 d,观察动物的体重和一般情况,末次给药24 h后取肾脏,观察肾病理改变、肾汞蓄积和肾脏中肾损伤因子Kim-1 mRNA的表达。结果 连续给予佐太和朱砂7 d后,大鼠未见明显异常,而氯化汞组体重明显下降($P < 0.05$)。氯化汞引起明显肾汞蓄积,甲基汞组大鼠也有所升高。而佐太组和朱砂组仅轻微增加。母孕鼠和老年鼠氯化汞组的肾损伤尤为明显,甲基汞组也出现肾损伤,而佐太和朱砂未见明显肾病理改变。肾脏毒性敏感基因Kim-1的表达表明,氯化汞组Kim-1的表达显著升高($P < 0.05$),只有HgS 1/10等汞量的甲基汞也有所升高,而佐太和朱砂与对照组无明显差异。胎鼠对汞毒性不敏感,幼鼠轻度敏感,母孕鼠中度敏感,而老年鼠显著敏感。结论 在等汞量的基础上,藏药佐太和朱砂的肾毒性远小于氯化汞和1/10等汞量的甲基汞;汞化合物的毒性随鼠年龄而异,胎鼠和幼鼠不敏感,成年孕鼠尤其老年鼠易受汞所致的肾毒性。

[关键词] 藏药佐太; HgS; HgCl₂; MeHg; 肾毒性; 肾汞; 肾损伤因子1(Kim-1)

[中图分类号] R595.2; R961.1 [文献标志码] A [文章编号] 1000-2715(2016)02-0129-05

Comparative study of Zuotai and Zhusha with HgCl₂ and MeHg on kidney injury in fetal, dam, weanling and aged rats

Li Wenkai¹ Hou Weiyu¹ Wu Qing² Luo Ya³ Cen Yuyan³ Lu Yuanfu¹ Liu Jie¹ Wei Lixin⁴

(1. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563099, China; 2. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563099, China; 3. School of Public Health, Zunyi Medical University, Zunyi Guizhou 563099, China; 4. Key Lab of Tibetan Medicine Research, Institute of Plateau Biology of Chinese Academy of Sciences, Xining Qinghai 810001, China)

[Abstract] **Objective** To compare the renal toxicity of the Tibetan medicine Zuotai and Chinese medicine Zhusha (HgS) with mercury chloride (HgCl₂) and methylmercury (MeHg) in various ages from fetal (-2 d before born), weanling (21 d-old), dam (3 mo-old), and aged (15 mo-old) rats. **Methods** Rats were orally administered with Zuotai (30 mg/kg), Zhusha (HgS, 30 mg/kg), HgCl₂ (33.6 mg/kg, equal Hg content of HgS), and MeHg (3.1 mg/kg, 1/10 Hg content of HgS) for 7 days. The body weight and the general health were observed. At the termination of the experiments, kidney pathology, renal Hg accumulation, and the expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) were examined. **Results** Repeated administration of Zuotai and Zhusha did not show abnormalities in all age groups, while HgCl₂ retarded body weight in weanling rats and decreased body weight in aged rats and MeHg slightly decreased rat body weight. Significant Hg accumulation was observed after HgCl₂ treatment, and to a lesser extent after MeHg treatment, but renal Hg content was only slightly increased in Zuotai and Zhusha groups. Histologically, HgCl₂ produced obviously renal injury and MeHg

[基金项目] 国家“十二五”科技支撑计划资助项目(NO: 2012BAI27B05); 国家自然科学基金资助项目(NO: 81460632); 贵州省研究生教育创新基地项目(NO: 黔教科2008-02)。

[通信作者] 刘杰,男,教授,硕士生导师,研究方向: 中药毒理 E-mail: Jielius@zmc.edu.cn。

produced mild renal injury , while no apparent pathology was evident after Zuotai and Zhusha treatment. The expression of *Kim - 1* was dramatically increased after $HgCl_2$ treatment , followed by MeHg , especially in the aged rats and dam rats. In weanling rats and fetal rats , the expression of *Kim - 1* was not significantly affected.

Conclusion Zuotai and Zhusha are much less nephrotoxic than $HgCl_2$ and MeHg. Fetal rats and weanling rats are less sensitive to Hg toxicity , and the aged rats are sensitive to mercury toxicity.

[Key words] Zuotai; HgS; $HgCl_2$; methyl mercury; nephrotoxicity; renal Hg; *Kim - 1*

DOI:10.14169/j.cnki.zunyixuebao.2016.0030

藏药佐太即“佐塔”，也叫“甘露精王”，具有一定的镇定安神、促进睡眠、抗惊厥、解热、抗炎、增强免疫、延长雌性果蝇寿命、抑菌等药理活性^[1-2]。在炮制过程中，水银必须经过与植物药和动物药煎煮，煅烧，炮制成灰入药，以保留药效，去除毒副作用^[2]。现代化学分析表明，佐太的主要成份为 $\beta - HgS$ ^[3]。而朱砂的主要成份为 $\alpha - HgS$ ^[4]。2015 年版的中国药典第一部收集了上百种含佐太和朱砂的藏药和中成药方剂^[5]。汞(Hg)是已知的重金属，而肾脏是其主要的毒性靶器官。但在讨论汞化合物毒性时，因不同汞化合物在体内的代谢和其毒性靶器官相差悬殊^[6]，所以必须考虑到其化学结构和价态。我们近年的工作表明朱砂和含朱砂的安宫牛黄丸与常见的氯化汞($HgCl_2$)和甲基汞(MeHg)对肾脏的毒性相差很大^[7]。长期用佐太也可引起可逆的肾脏应激反应^[8]。虽然实验研究以及临床应用表明，服用佐太和含佐太的藏药当佐未发现明显的毒副作用^[9]，但不同年龄人群对佐太和汞化合物的毒性是否有不同程度的敏感？佐太是否可以通过胎盘屏障影响到胎儿？这些都有待于进一步深入研究。目前研究最多、毒性最大的汞化合物是甲基汞，可引起肝脏和肾脏损伤，最严重的毒性是对中枢神经系统的破坏，而氯化汞主要损伤肾脏。比较佐太和朱砂与甲基汞和氯化汞的肾脏毒性的差异，以及汞化合物对不同年龄动物的敏感性，是对含汞中药安全性评价的一个重要方面^[6]。本试验采用佐太、朱砂、等汞含量的氯化汞和 1/10 等汞含量的甲基汞对胎鼠、孕鼠、刚断奶的幼鼠和老年鼠进行处理，研究了不同汞形态对不同生育期大鼠肾脏毒性的差异。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 F732 - VJ 冷原子吸收测汞仪购自上海华光仪器仪表厂，逆转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司，实时荧光定量 PCR 仪购自

美国 Bio - Rad 公司，TU - 1810 紫外 - 可见分光光度计购自北京普析通用仪器有限责任公司，Eppendorf5417R 台式高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司，BX43 光学显微镜购自日本 Olympus 公司。

佐太(主要含 $\beta - HgS$)由中国科学院西北高原生物研究所藏药研究重点实验室提供；朱砂($> 96\% \alpha - HgS$) $\alpha - HgS$ 、 $HgCl_2$ 和 MeHg 均购自美国 Sigma - Aldrich 公司；其他试剂均为分析纯。

1.2 实验动物 健康成年 SPF 级 Sprague - Dawley(SD)大鼠购自第三军医大学大坪实验动物中心[合格证号: SCXK(渝)2012 - 0005]，饲养于遵义医学院基础药理省部共建重点实验室 SPF 动物房(合格证号#SYXK2014 - 003)。让实验大鼠自由摄食饮水，摄食，以使其适应环境。雄雌交配后以见阴栓定为孕 1 d，将受孕雌鼠随机分组，每组 3 只。于孕 11 d 给药 7 d 后的第 2 天(孕 18 d)取胎鼠和母孕鼠肾脏。断奶(21 d)幼鼠每组 6 只，给药 7 d，于第 28 天取肾脏。雄性老龄大鼠(15 月)每组 5 只给药 7 d 后取肾脏，去除周边结缔组织，称重，切取适当大小肾组织用于病理观察，另夹取约 50 mg 肾组织用于肾汞蓄积测定和肾损伤相关基因表达的研究。给药期间观察各大鼠的一般外观形态、行为活动、进食饮水情况，并进行每日称重。

1.3 试验设计 动物按体重每日口服给药。藏药佐太按临床 4 倍用量(30 mg/kg)，朱砂(HgS)也按 30 mg/kg 给药，含等汞量的氯化汞为 33.6 mg/kg 和 1/10 等汞量的甲基汞(3.1 mg/kg)作为比较对照。各组动物均给药 7 d，末次给药 24 h 后取肾脏进行分析。

1.4 肾脏病理观察 取肾组织以常规 10% 甲醛固定，经脱水、石蜡包埋、切片、苏木素 - 伊红(HE)染色，光学显微镜下观察其组织形态变化。

1.5 肾汞蓄积量测定 取 50 ~ 100 mg 肾组织，用 1 mL 浓硝酸 60 °C 消化 48 h，稀释 25 倍，使用 F732 - VJ 冷原子吸收测汞仪检测肾汞蓄积量。

1.6 肾损伤基因 *Kim-1* 表达的测定 按常规法用 Trizol 提取总 RNA, NanoDrop 检测 RNA 浓度和纯度。用 High Capacity RT 合成 cDNA, 用 IQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad) 进行 PCR 扩增。用 Primer3 来设计探针, 以 β -actin 做内参基因。用 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 值法计算其扩增效率, 比较不同组之间的基因表达差异。基因引物由大连宝生物工程有限公司设计并合成, β -actin 同义链 5'-TGACCGACGTGGCTACAG-3', 反义链 5'-GGCAA-CATAGCACAGCTTCT-3'; *Kim-1* 同义链 5'-TGGCACTGTGACATCCTCAGA-3', 反义链 5'-GCAACGGACATGCCAACATA-3'。

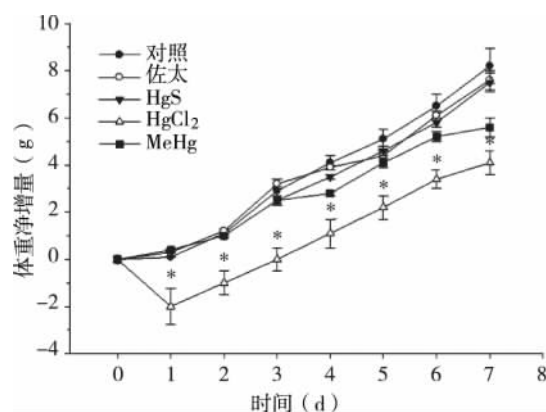
1.7 统计学分析 实验结果数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重和肾重 以幼鼠为例, 藏药佐太和朱砂连续给药 7 d 后, 对幼年鼠增重无明显影响。而氯化汞组对幼年鼠增重迟缓, 甲基汞组的体重增加也有所下降(见图 1)。氯化汞影响下老年鼠体重下降可达 40 g, 而佐太和朱砂组仅稍微降低, 与对照组比则无明显差异。各给药组胎鼠和孕母鼠体重无明显差异。

2.2 肾脏汞蓄积量 在分别灌藏药佐太和汞化合物后, 将幼鼠和老年鼠的肾脏移除, 用冷原子吸收法进行测定。氯化汞组汞含量达 250 $\mu\text{g/g}$ (肾), 甲基汞达 30 $\mu\text{g/g}$ (肾), 而佐太和朱砂仅有 2 $\mu\text{g/g}$ (肾) 左右, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$,

见表 1)。



佐太、HgS、HgCl₂ 和 MeHg 的浓度分别为 30.0、30.0、33.6 和 3.1 mg/kg。* : 与对照组相比, $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s$ $n = 6$ 。

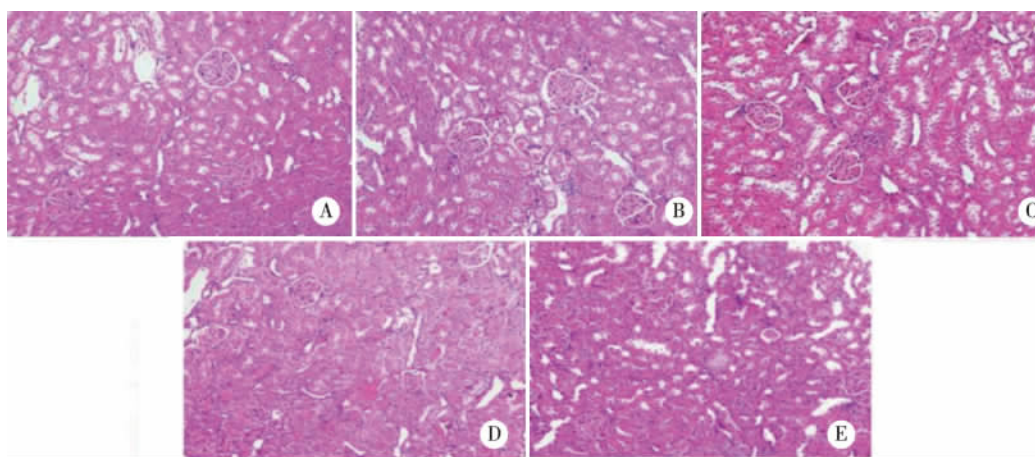
图 1 连续 7 d 口服佐太、HgS、HgCl₂ 和 MeHg 对幼鼠体重增长的影响

表 1 幼鼠和老年鼠的肾汞含量 ($\mu\text{g/g}$)

组别	幼鼠	老年鼠
对照	0.67 \pm 0.05	0.89 \pm 0.05
佐太	1.26 \pm 0.19*	1.53 \pm 0.09*
HgS	1.38 \pm 0.43*	2.11 \pm 0.31*
HgCl ₂	248.00 \pm 21.00*	283.00 \pm 33.90*
MeHg	26.60 \pm 2.50*	34.40 \pm 1.80*

$\bar{x} \pm s$ $n = 5 \sim 6$; * : 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

2.3 肾脏病理结果 佐太组和朱砂组老年鼠的肾脏中与对照组相比没有明显差异, 但相比之下, 在给予氯化汞和甲基汞的老年鼠肾脏中有明显的肾小管上皮细胞的变性和坏死(见图 2)。

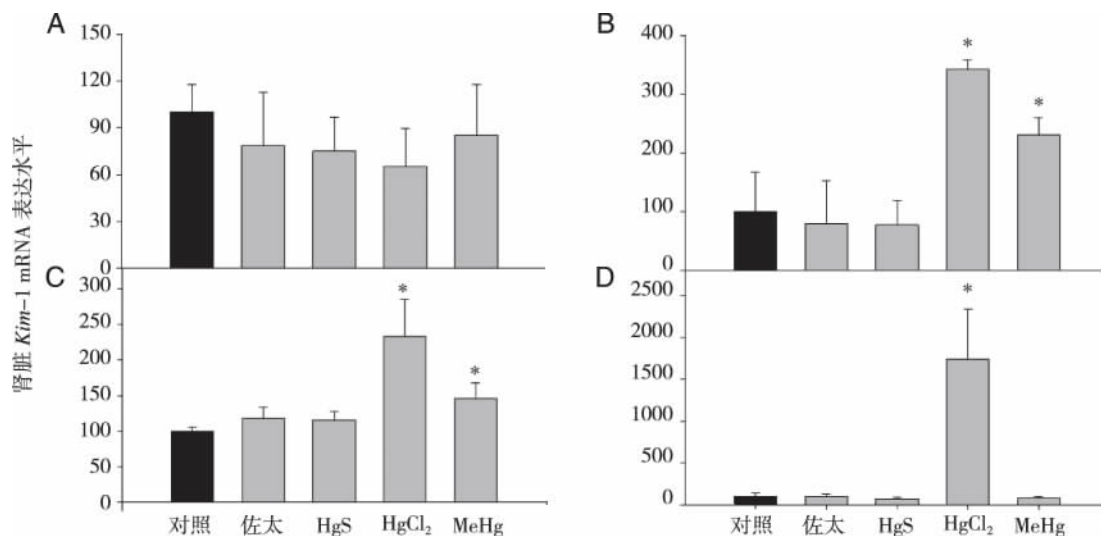


A: 对照; B: 佐太(30.0 mg/kg); C: 朱砂(30.0 mg/kg); D: HgCl₂(33.6 mg/kg); E: MeHg(3.1 mg/kg)。

图 2 佐太、HgS、HgCl₂ 和 MeHg 对老年鼠肾脏病理的影响(HE, $\times 200$)

2.4 肾脏中 *Kim-1* mRNA 的表达水平 *Kim-1* 是肾脏损伤的敏感生物标志分子,与空白对照组相比,佐太和 HgS 对其表达无明显影响,氯化汞显著增加其表达,以对老年鼠更为明显(17 倍),

其次为幼鼠(3.5 倍),孕母鼠(2.5 倍),而胎鼠对汞肾毒性不敏感。甲基汞可增加 *Kim-1* 在幼鼠的表达 2.2 倍,孕母鼠 1.5 倍,但对老年鼠仅为 1.3 倍(见图 3)。



A: 胎鼠; B: 孕母鼠; C: 幼年大鼠; D: 老年大鼠。 $\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 6$; *: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。佐太、HgS、HgCl₂ 和 MeHg 的浓度分别为 30.0、30.0、33.6 和 3.1 mg/kg。

图 3 佐太、HgS、HgCl₂ 和 MeHg 对胎鼠、孕母鼠、幼鼠和老年鼠肾脏损伤分子 *Kim-1* 表达的影响

3 讨论

本实验表明在等汞量的基础上,藏药佐太和硫化汞的肾毒性远小于氯化汞和 1/10 等汞量的甲基汞;汞化合物的毒性随鼠年龄而异,胎鼠和幼鼠不敏感,而成年孕鼠和老年鼠易受汞所致的肾毒所害。

近年来,随着国内外对重金属安全性问题的日益重视,含汞成分制剂的临床应用受到极大限制。藏药佐太在藏药中最为贵重,是藏药之母本,被雪域人民视为藏药中的至宝,被称为“众药之王”^[1-2]。而朱砂则为“安神镇静”中药^[4]。然而,佐太和朱砂均为硫化汞,汞为重金属,故其安全性问题尤为突出。肾脏是无机汞和有机汞的主要毒性靶器官^[6]。我们近年的工作表明朱砂和含朱砂的安宫牛黄丸,万胜化风丹与氯化汞的肾毒性不能相提并论^[7,10]。所以本实验采用给予等汞量的藏药佐太、朱砂、氯化汞和 1/10 等汞量的甲基汞连续给药 7 d 进行肾毒性比较。结果显示氯化汞的肾汞蓄积高达 250 $\mu\text{g/g}$,相伴最强的肾毒性。而甲基汞的肾汞蓄积也达 30 $\mu\text{g/g}$,其肾毒性也明显。与之相比,佐太和朱砂的肾汞蓄积只有

2 $\mu\text{g/g}$,故肾毒性低。因此不同汞化合物的胃肠道吸收不同,分布并蓄积到肾脏的汞差异极大,毒性相差悬殊,故不能把硫化汞与氯化汞、甲基汞相提并论。

肾损伤因子 1 (*Kim-1*) 是一类 I 型跨膜蛋白,属于免疫球蛋白基因超家族。在受损后再生的近曲小管上皮细胞中表达显著增强,能迅速、灵敏、特异地反映各种肾脏疾病的损伤,是检测早期肾损伤的可靠生物学标记物^[8,10-11]。本实验结果显示,除胎鼠外各个年龄段氯化汞和甲基汞组肾脏 *Kim-1* 的表达均有不同程度增加,尤其以氯化汞的作用最为明显,与文献报道相符合^[10-11]。这在分子生物学的基础上,进一步验证了不同汞化合物对肾毒性的差异。

年龄是影响机体对汞毒性的一个重要因素。近期文献报道表明,老年鼠比年青鼠对氯化汞毒性更为敏感^[11]。我们最近的实验表明肾脏摄入转运体的表达随年龄而增加。肾脏摄入转运体的表达增加与肾汞摄入和蓄积增加密切相关,这可能是老年大鼠对氯化汞敏感的原因之一。有趣的是老年大鼠主要对氯化汞敏感,而对 1/10 等汞量的甲基汞敏感度次之。特别要引起注意的是,胎鼠

的 *Kim-1* 表达在各组中无差异,其可能与胎盘屏障对胚胎发育的保护作用有关。给孕母鼠注射甲基汞^[12]或氯化汞^[13],其胎盘和胎鼠均有不同程度的汞蓄积,但其肾汞蓄积量仅为孕母鼠肾汞的1%,这也是胎鼠对汞化合物毒性敏感性较低的一个主要原因。

藏药佐太在本实验中是按临床4倍量(30 mg/kg)给药^[8],在此实验条件下连续给药7 d,未见明显肾毒性。但是如连续给药(17、33、67 mg/kg)180 d,高剂量下能引起肾脏 *Kim-1* 有一定升高,但停药30 d后能恢复到正常表达水平^[8]。朱砂在本实验条件下(30 mg/kg,给药7 d)也未见明显肾损伤。但是如给于朱砂50 mg/kg以上连续90 d,或给以朱砂100 mg/kg,连续30 d,会出现轻度肾脏损伤^[14]。但朱砂以1 g/kg的剂量连续给予大鼠8周,肾毒性和 *Kim-1* 表达升高均会出现^[15]。因此,佐太和朱砂要小心使用,千万不要过量和长期服用。

综上所述,藏药佐太和朱砂在临床剂量范围产生的肾毒性远小于等汞量的氯化汞和1/10等汞量的甲基汞;汞化合物的毒性随鼠年龄而异,胎鼠不敏感,幼鼠轻度敏感,孕母鼠敏感,而老年鼠极易受汞所致的肾毒性。

[参考文献]

- [1] 黄海波,王奇志,王新为,等. 藏药“左太”的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2886-2888.
- [2] 看召本. 透视藏医珍宝类药品中的佐太[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 1621-1623.
- [3] 李岑,占堆,楞本才让,等. 藏药佐太的化学成分、汞配位结构及微观形貌分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(4): 1072-1078.
- [4] 周昕睿,王旗,杨晓达. 朱砂的药理及毒理机制研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(22): 2843-2847.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京: 中国医学科学出版社, 2015.
- [6] Liu J, Shi J Z, Yu L M, et al. Mercury in traditional medicines: Is cinnabar toxicologically similar to common mercurials? [J]. *Exp Biol Med*, 2008, 233(7): 810-817.
- [7] Lu Y F, Wu Q, Yan J W, et al. Realgar, cinnabar and An-Gong-Niu-Huang Wan are much less chronically nephrotoxic than common arsenicals and mercurial [J]. *Exp Biol Med*, 2011, 236(2): 233-239.
- [8] 向丽,林波,张艳,等. 藏药佐太长期用药对大鼠肾脏 *Kim-1*、MT 及相应 mRNA 表达水平的影响[J]. 中国药理与临床, 2014, 30(6): 154-158.
- [9] 李岑,王东平,多杰,等. 藏药佐太安全性研究及其复方当佐的临床安全观察初探[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(13): 2573-2582.
- [10] 朱琼妮,陆远富,时京珍,等. 含朱砂的万胜化风丹和氯化汞对大鼠肾转运体、肾汞蓄积和 *Kim-1* 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1892-1896.
- [11] Bridges C C, Joshee L, Zalups R K. Aging and the disposition and toxicity of mercury in rats [J]. *Exp Gerontol*, 2014, 53(5): 31-39.
- [12] Bridges C C, Joshee L, Zalups R K. Placental and fetal disposition of mercuric ions in rats exposed to methylmercury: role of Mrp2 [J]. *Reprod Toxicol*, 2012, 34(4): 628-634.
- [13] Oliveira C S, Joshee L, Zalups R K, et al. Disposition of inorganic mercury in pregnant rats and their offspring [J]. *Toxicology*, 2015, 335: 62-71.
- [14] 梁爱华,王金华,薛宝云,等. 朱砂对大鼠的肝肾毒性研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(3): 312-318.
- [15] Wang Y, Wang D, Wu J, et al. Cinnabar-induced subchronic renal injury is associated with increased apoptosis in rats [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 278931.

[收稿 2016-03-16; 修回 2016-04-05]

(编辑:王 静)