

朱砂与万氏牛黄清心丸致大鼠亚急性肝毒性的比较研究

黄海, 高鑫, 周颖, 高显会, 王莹*

锦州医科大学, 辽宁 锦州 121001

摘要: **目的** 比较朱砂和万氏牛黄清心丸(含朱砂的成方制剂)对大鼠的亚急性肝毒性。**方法** 分别以溶剂(0.5%羧甲基纤维素钠水溶液)、1.0 g/(kg·d)朱砂、9.83 g/(kg·d)万氏牛黄清心丸[全方,含朱砂1.0 g/kg]、8.83 g/(kg·d)去朱砂的万氏牛黄清心丸(去朱砂方)对健康SD大鼠ig给药,每天1次,连续28 d。给药结束后次日取血液和肝脏,检测血汞、肝汞水平,检测血清肝功能指标,进行肝组织病理学观察。**结果** 朱砂组血汞、肝汞和血清总蛋白(TP)水平高于对照(溶剂)组、全方组和去朱砂方组($P < 0.05$);光镜下,朱砂组可见轻度的肝细胞肿胀、空泡变性、炎症细胞浸润等病理改变,全方组和去朱砂方组可见色素沉积,病变轻微,偶见肝细胞肿胀、空泡变性。**结论** 短期过量使用朱砂可引起肝汞蓄积和轻微肝损伤,万氏牛黄清心丸引起的肝汞蓄积量和亚急性肝损伤轻于单味朱砂,方中其他中药可能对朱砂起到减毒作用。

关键词: 朱砂;万氏牛黄清心丸;肝毒性;亚急性;汞蓄积

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)09-1825-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.09.019

Comparative study of subacute liver toxicity in rats induced by cinnabar and Wanshi Niu Huang Qingxin Pills

HUANG Hai, GAO Xin, ZHOU Ying, GAO Xian-hui, WANG Ying

Jinzhou Medical University, Jinzhou 121001, China

Abstract: Objective To compare the subacute liver toxicity of cinnabar and Wanshi Niu Huang Qingxin Pills, one of Chinese patent medicines containing cinnabar, in rats. **Methods** Healthy SD rats were given by gavage solvent (0.5% sodium carboxymethyl cellulose), 1.0 g/(kg·d) cinnabar, 9.83 g/(kg·d) Wanshi Niu Huang Qingxin Pills [the whole recipe containing 1.0 g/(kg·d) cinnabar], 8.83 g/(kg·d) Wanshi Niu Huang Qingxin Pills without cinnabar recipe, once daily for 28 d. The rats were sacrificed the next day after administration, and blood and liver samples were collected for the detection of mercury content, indexes of liver function and liver histopathology. **Results** The contents of liver mercury, blood mercury, and serum total protein in cinnabar group were higher than those of the control group, the whole recipe group, without cinnabar recipe group ($P < 0.05$). Under the light microscope, mild liver pathological changes were observed in the cinnabar group, including slight hepatocyte swelling and vacuolization, occasionally infiltration of inflammatory cells. Pigmentation and slight pathological changes, such as hepatocyte swelling and vacuolization, were observed in the whole recipe group and without cinnabar recipe group. **Conclusion** Short-term overdose of cinnabar could cause mercury accumulation in liver and result in slight liver damage. The accumulation of mercury and subacute injury in liver induced by Wanshi Niu Huang Qingxin Pills is slighter than by single cinnabar.

Key words: cinnabar; Wanshi Niu Huang Qingxin Pills; hepatotoxicity; subacute; mercury accumulation

朱砂(cinnabar)具有清心镇惊、安神、明目、解毒之功能,主治心悸易惊、失眠多梦、癫痫发狂、小儿惊风、视物昏花、口疮、喉痹、疮疡肿毒。朱砂已有2千年的药用历史,是应用最为广泛的中药材之一,现行的国家标准中收录的含朱砂的成方制

剂多达5.22%(362/6938)。万氏牛黄清心丸是含朱砂的经典方剂之一,由牛黄、朱砂、黄连、栀子、郁金、黄芩6味中药组成,具有清热解毒、镇惊安神之功效。该方源自明代万全所著的《痘疹世医心法》,原名牛黄清心丸,现被冠以“万氏”之名,

收稿日期: 2017-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503209); 辽宁省教育厅一般项目(L2015320)

作者简介: 黄海(1989—),男,在读硕士,研究方向为中药毒理。Tel: 18841621248 E-mail: 846759107@qq.com

*通信作者 王莹(1975—),女,硕士生导师,教授,研究方向为药物毒理。Tel: 13898358001 E-mail: wangying6108@163.com

以别于牛黄清心丸(局方),现收载于《中国药典》2015年版一部。朱砂主含硫化汞($\text{HgS} \geq 96\%$),有毒,近年来临床上曝出的因服用朱砂而引起中毒事件^[1-4],使朱砂的安全性问题受到国内外的广泛关注。肝脏是药物代谢的主要场所,也是药物毒性损害的重要靶器官之一。本研究对朱砂和万氏牛黄清心丸致大鼠的亚急性肝毒性进行比较研究,分析单味朱砂与其方剂在肝毒性上的差别,为临床用药提供参考。

1 材料

1.1 主要药品

朱砂(水飞),产地湖南, HgS 质量分数大于 98%,湖南凤凰县红飞药用朱砂有限公司产品;体外培育牛黄 *Bos taurus domesticus* Gmelin, 含水量 7.48%、游离胆红素 0.024%、胆红素 42.06%、胆酸 9.23%,武汉健民大鹏药业有限公司产品;黄连 *Coptis chinensis* Franch 饮片,产地四川,河北百合中药饮片有限公司产品,批号 160501;黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 饮片,产地甘肃,安徽金芙蓉中药饮片有限公司产品,批号 160712;栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 饮片,产地江西,安徽金芙蓉中药饮片有限公司产品,批号 160810;郁金 *Curcuma longa* L. 饮片,产地四川,安徽金芙蓉中药饮片有限公司产品,批号 150309;以上药材均由盘锦阳光大药房孙久法中药师鉴定,符合《中国药典》2015年版规定。盐酸小檗碱(质量分数 $\geq 98\%$, MUST-15010411)、黄芩苷(质量分数 $\geq 98\%$, MUST-15012813)、黄芩素(质量分数 $\geq 98\%$, MUST-15031608)、栀子苷(质量分数 $\geq 98\%$, MUST-15022411)、姜黄素(质量分数 $\geq 98\%$, MUST-15032010)对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司。

1.2 仪器

COOLPEX 灵动型微波化学反应仪,上海屹尧仪器科技发展有限公司;RA-915M 赛曼原子吸收汞分析仪,配 RP-91 配件,俄罗斯 Lumex 分析仪器公司;L-3000 高效液相色谱仪,北京普源精仪科技有限公司;RM2135 石蜡切片机,德国莱卡公司;7180 全自动生化分析仪,日本 HITACHI 公司;EV311 旋转蒸发仪,北京莱伯泰科有限公司。

1.3 动物

健康 SD 大鼠,体质量 (180 ± 20) g,辽宁长生生物技术有限公司,合格证号 SCXK(辽)

2015-0001,置大鼠饲养笼中,室内温度控制在 20~24 °C,室内昼夜自然明暗交替照明,饲喂标准大鼠饲料。

2 方法

2.1 含朱砂和去朱砂万氏牛黄清心丸的制备

按照《中国药典》2015年版的处方比例,自制万氏牛黄清心丸(全方)、去朱砂的万氏牛黄清心丸(去朱砂方)供试品。称取 200 g 黄连、120 g 黄芩、120 g 栀子、80 g 郁金细粉,分别溶于 10 倍量的适宜浓度乙醇,加热回流提取后,滤过,药渣再按上述方法提取 2 次,每次煎煮 1 h,充分提取后,合并 3 次提取液,浓缩提取液;称取 10 g 牛黄、60 g 朱砂(去朱砂方不加朱砂,其余成分与全方一样);将各提取液、牛黄、朱砂分别加入 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)水溶液,搅拌均匀,制成混悬液,4 °C 避光保存备用。用高效液相色谱法检测提取液中各味中药方的有效成分(盐酸小檗碱、黄芩苷、黄芩素、栀子苷、姜黄素),质量分数均达到《中国药典》2015年版的标准。

2.2 实验动物分组与处理

24 只健康 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 6 只,雌雄各半。朱砂组:ig 给予 1.0 g/(kg·d) 的朱砂(以 0.5% CMC-Na 溶液配成混悬液),剂量相当于《中国药典》2015年版规定的人用剂量上限(0.5 g/d)的等效剂量的 20 倍^[5-6];万氏牛黄清心丸全方(全方)组:ig 给予 9.83 g/(kg·d)(生药剂量,相当于朱砂 1.0 g/kg)万氏牛黄清心丸;去朱砂万氏牛黄清心丸(去朱砂方)组:ig 给予 8.83 g/(kg·d)(生药剂量,不含朱砂,其余与全方组相同)去朱砂的万氏牛黄清心丸;对照组:ig 给予等体积的 0.5% CMC-Na 水溶液。大鼠适应性喂养 7 d 后开始给药,每天给药 1 次,连续 28 d。给药期间,每周称体质量 2 次,根据体质量调整给药量。给药结束后次日,ip 4% 戊巴比妥钠(1 mL/kg)进行麻醉,迅速打开腹腔,腹主动脉取血,处死后取完整肝脏。

2.3 检测指标及测定方法

2.3.1 一般状况观察 染毒期间观察大鼠的行为活动、外观体征、体质量变化、饮食、分泌物、排泄物等。

2.3.2 血液及肝组织中含汞量 取肝组织 0.3~0.5 g(血液 0.5 mL),加 6 mL 浓 HNO_3 ,设置消解条件为 150 °C、15 倍大气压保持 4 min,180 °C、25 倍大气压保持 4 min,冷却至室温,90 °C 赶酸 90

min, 用超纯水定容至 10 mL。充分消解后, 用赛曼原子吸收汞分析仪测定。汞分析仪设定条件: 波长 253.7 nm, 气泵体积流量 1 L/min (载气为空气), 计算方式为峰面积, 积分时间 120 s, 其余均按默认值设定。

2.3.3 血清生化指标 高速冷冻离心机分离出血清 (3 000 r/min, 离心 10 min), 全自动生化分析仪检测血清中丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB) 水平。

2.3.4 肝脏指数 肝脏游离后, 用冷生理盐水冲洗肝脏表面的血污, 滤纸吸干表面水分, 称量肝脏湿质量, 计算肝脏指数 (肝脏质量/体质量)。

2.3.5 肝脏组织病理学观察 取部分肝组织, 迅速用 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, HE 染色, 光镜下观察。

2.4 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 17.0 统计软件分析, 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 组间两两比较, 方差齐时用 S-N-K 法分析, 方差不齐时用 Dunnett's T3 法分析。

3 结果

3.1 一般状况

实验期间所有动物一般状况良好, 体质量增长正常。每天给药后, 朱砂组、全方组大鼠粪便呈现

红色, 未见其他明显异常。

3.2 血液、肝组织中含汞量

连续给药 28 d 后, 朱砂组血汞、肝汞水平均明显高于对照组、全方组和去朱砂方组 ($P < 0.05$), 去朱砂方组和对照组无明显差别 ($P > 0.05$); 全方组肝汞水平高于对照组和去朱砂方组 ($P < 0.05$), 见表 1。

3.3 肝功能指标

连续给药 28 d 后, 朱砂组血清 TP 水平高于对照组、全方组和去朱砂方组 ($P < 0.05$), 对照组、全方组和去朱砂方组无明显差别 ($P > 0.05$); 各组之间 AST、ALT 和 ALB 水平均无明显差别 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 朱砂和万氏牛黄清心丸对大鼠血汞、肝汞水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of cinnabar and Wanshi Niu Huang Qingxin Pills on contents of liver mercury and blood mercury in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 血汞/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | 肝汞/ $(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$ |
|------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 对照 | 10.653 ± 3.261* | 0.180 ± 0.048*# |
| 朱砂 | 61.967 ± 5.720 | 2.712 ± 0.248 |
| 全方 | 16.555 ± 2.664* | 0.418 ± 0.082* |
| 去朱砂方 | 13.078 ± 2.245* | 0.230 ± 0.087*# |

与朱砂组比较: * $P < 0.05$; 与全方组比较: # $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs cinnabar group, # $P < 0.05$ vs whole recipe group, same as below

表 2 朱砂和万氏牛黄清心丸对大鼠肝功能指标的影响

Table 2 Effect of cinnabar and Wanshi Niu Huang Qingxin Pills on indexes of liver function in rats

| 组别 | AST/ $(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$ | ALT/ $(\text{U}\cdot\text{L}^{-1})$ | ALB/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ | TP/ $(\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ |
|------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| 对照 | 85.0 ± 11.7 | 35.8 ± 5.5 | 27.5 ± 2.4 | 54.9 ± 3.4* |
| 朱砂 | 101.2 ± 25.9 | 32.8 ± 11.4 | 29.5 ± 1.0 | 60.9 ± 2.7 |
| 全方 | 103.0 ± 31.2 | 35.0 ± 12.2 | 32.8 ± 2.4 | 56.7 ± 4.0* |
| 去朱砂方 | 80.0 ± 10.6 | 28.5 ± 3.7 | 30.3 ± 1.7 | 55.0 ± 3.6* |

3.4 肝脏指数

连续给药 28 d 后, 朱砂组、全方组、去朱砂方组和对照组肝脏指数分别为 (3.24 ± 0.34) %、(3.06 ± 0.20) %、(3.10 ± 0.16) %、(2.89 ± 0.25) %, 各组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3.5 肝组织病理学

对照组和朱砂组大鼠肝脏各叶大小、位置正常, 肝组织色泽红润, 质地软, 肝缘薄; 全方组和去朱砂方组肝脏外观呈暗红色。光镜下 (图 1), 对

照组肝组织结构规则、肝小叶结构清晰, 肝细胞排列整齐, 大小均匀, 胞核居中; 朱砂组可见轻度的肝细胞肿胀、空泡变性、炎症细胞浸润等病理改变; 全方组和去朱砂方组可见色素沉积, 病理改变轻于朱砂组, 偶见肝细胞肿胀、空泡变性。

4 讨论

朱砂是一种应用广泛的矿物性中药, 主要成分为硫化汞^[7], 硫化汞是典型的共价化合物, 溶解度很小 (溶度积 $K_{sp} = 1 \times 10^{-52}$), 在胃肠道内吸收率

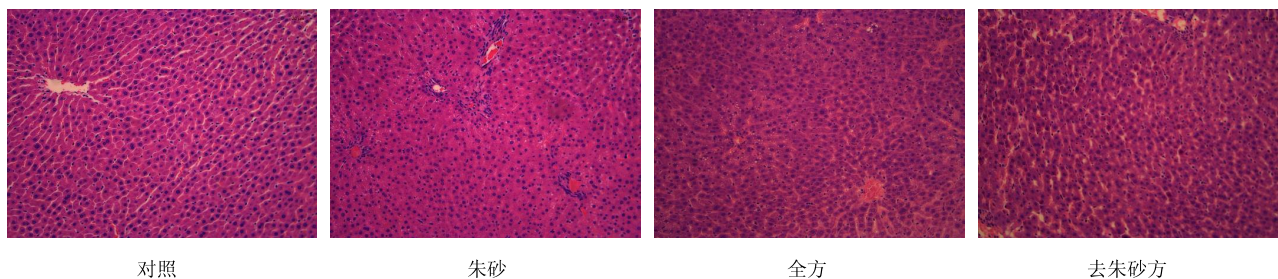


图 1 朱砂和万氏牛黄清心丸致大鼠的肝组织病理改变 (HE, ×400)

Fig. 1 Pathological change of liver tissue induced by cinnabar and Wanshi Niu Huang Qingxin Pills in rats (HE, ×400)

低, 本研究中朱砂组、全方组大鼠给药后粪便呈红色, 为未被吸收的朱砂。在肠道内, 朱砂可转变为可溶性的多硫化汞而被吸收入血, 其可能是朱砂发挥药效和毒性的主要成分^[8]。朱砂的毒效应源于汞在组织内的蓄积。本研究以 1.0 g/(kg·d) 的朱砂对大鼠连续 ig 给药 28 d, 朱砂组的血汞、肝汞水平明显高于对照组, 表明 ig 朱砂后, 有汞经胃肠道吸收并在肝脏内蓄积。病理学检测结果显示朱砂组可见轻微肝组织损伤, 肝功能检测结果显示朱砂组除个别动物 AST 值稍高之外, ALT 和 ALB 值与对照组相比均无明显差别, TP 值略高于对照组, 表明本研究条件下朱砂对大鼠的亚急性肝毒性作用很轻。

中药及其组方配伍理论是传统中医药理论的重要组成部分, 配伍应用不仅可提高单味药的疗效, 还可减少或消除单味药的毒副作用^[9]。在临床, 朱砂多与其他中药方配伍使用, 很少单独使用。有研究显示, 朱砂与其他中药配伍使用可使朱砂的毒效应减低^[10]。本研究以 9.83 g/(kg·d) 万氏牛黄清心丸 [相当于朱砂 1.0 g/(kg·d)] 对大鼠连续 ig 给药 28 d, 全方组的血汞、肝汞水平明显低于朱砂组, 表明万氏牛黄清心丸组方中的其他某(几)味药物对朱砂中汞的吸收有拮抗作用, 进而减少了汞在肝组织内的蓄积。全方组病理改变非常轻微, 肝功能检测结果中个别动物 AST 值稍高, ALT、ALB 和 TP 均未见明显异常, 表明本研究条件下万氏牛黄清心丸对大鼠的亚急性肝毒性作用很低。

本研究中, 虽 AST 均值的差异在各组间无统计学意义, 但朱砂组和全方组个别动物 AST 值偏高, 提示不同个体对朱砂和万氏牛黄清心丸的敏感性存在差异, 敏感个体在临床用药过程中应注意肝功

能监测。综上, 短期过量使用朱砂可引起肝汞蓄积和轻微肝损伤, 万氏牛黄清心丸引起的肝汞蓄积量和亚急性肝损伤低于单味朱砂, 方中其他中药可能对朱砂有配伍减毒作用。

参考文献

- [1] 尹晓静. 急性朱砂中毒 10 例临床分析及护理体会 [J]. 中外健康文摘, 2014, 66(3): 66-67.
- [2] 黄琼, 覃吉高, 冉秀芬. 皮疹腐蚀性消化道炎症朱砂中毒死亡 3 例临床分析 [J]. 中国医药指南, 2012, 25(10): 297-298.
- [3] 冯珍, 姚欣艳, 彭勃, 等. 朱砂中毒 1 例报道 [J]. 医学信息, 2011, 24(1): 177.
- [4] 王超, 李超, 刘艳军. 中药朱砂致汞铅中毒一例并文献复习 [J]. 中国全科医学, 2010, 13(30): 3457-3458.
- [5] 王大鹏, 王莹, 高显会, 等. 朱砂亚慢性染毒致大鼠肝毒性效应 [J]. 中国公共卫生, 2014, 30(6): 743-745.
- [6] Wang Y, Wang D P, Wu J, et al. Cinnabar-induced subchronic renal injury is associated with increased apoptosis in rats [J]. *Bio Med Res Int*, 2015, 2015: 278931.
- [7] 聂黎行, 戴忠, 马双成. 朱砂及其制剂中汞的分析方法研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 1075-1080.
- [8] Zhou X, Wang L, Sun X, et al. Cinnabar is not converted into methylmercury by human intestinal bacteria [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(1): 110-115.
- [9] 徐砚通. 方剂配伍的现代科学内涵探讨 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 465-469.
- [10] Wang H F, Bai J, Chen G, et al. A metabolic profiling analysis of the acute hepatotoxicity and nephrotoxicity of Zhusha Anshen Wan compared with cinnabar in rats using 1H-NMR spectroscopy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(2): 572-576.