

外用红油膏对大鼠体内汞蓄积及肝肾功能的影响*

葛巍 廖武 张梦婕 杨苏琴[#]

(江西中医药大学附属医院 南昌 330006)

摘要:目的:研究不同剂量的红油膏外用 30 d 对大鼠体内汞蓄积及肝肾功能的影响。方法:将 40 只大鼠随机分成正常组与红油膏低、中、高剂量组,每组 10 只。各组大鼠背部造成面积为 3 cm× 3 cm 的全层皮肤缺损创面,除正常组外,红油膏低、中、高剂量组分别予以 4.744 mg、94.875 mg、189.750 mg 红油膏纱条外敷。持续给药 30 d 后检测四组大鼠尿液、血液、肝脏及肾脏的汞含量,肝肾功能指标血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)。结果:红油膏各剂量组的血液和尿液中汞含量均明显高于正常组($P<0.05$, $P<0.01$);红油膏中、高剂量组的肝脏与肾脏中汞含量均明显高于正常组($P<0.01$),其中尿液、肾脏中汞含量呈剂量依赖性($P<0.01$);相比正常组,红油膏高剂量组中 AST 含量明显升高($P<0.05$),红油膏中、高剂量组中 BUN 与 CREA 含量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:红油膏长期、超量给药可造成大鼠体内汞蓄积及肝肾毒性,但日均剂量 4.744 mg (相当于人体临床日均剂量 230 mg)且持续 30 d 外用对肝肾汞蓄积及肝肾功能影响较小,可为红油膏临床安全性提供数据参考。

关键词:汞蓄积;红油膏;肝肾功能

Influence of Topical Red Oil Ointment on Mercury Accumulation and Liver and Kidney Function in Rats*

GE Wei, LIAO Wu, ZHANG Meng-jie, YANG Su-qin[#]

(Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)

Abstract: Objective: To study the influence of different doses of red oil ointment on mercury accumulation and liver and kidney function in rats after external used 30 days. Methods: 40 rats were randomly divided into normal group, low-dose group of red oil ointment, medium-dose group of red oil ointment and high-dose group of red oil ointment, with 10 rats in each group. The wounds with an area of 3 cm× 3 cm were modeled on the back of rats in each group. Except for the normal group, the low-dose group of red oil ointment, medium-dose group of red oil ointment and high-dose group of red oil ointment were applied with 4.744 mg, 94.875 mg and 189.750 mg red oil ointment gauze respectively. After continuous administration for 30 days, the mercury content in urine, blood, liver and kidney, and liver and kidney function indexes, such as serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CREA) were measured. Results: The mercury content in blood and urine in each dose group of red oil ointment were significantly higher than those in the normal group ($P<0.05$, $P<0.01$). The mercury content in liver and kidney in the medium-dose group of red oil ointment and high-dose group of red oil ointment were significantly higher than those in the normal group ($P<0.01$). The mercury content in urine and kidney were dose-dependent ($P<0.01$); compared with the normal group, the content of AST in the high-dose group of red oil ointment was significantly higher ($P<0.05$), and the contents of BUN and CREA in the medium-dose group and high-dose group of red oil ointment were significantly higher ($P<0.05$, $P<0.01$). Conclusion: Long term and excessive administration of red oil ointment can cause mercury accumulation and liver and kidney toxicity in rats, but the daily average dose of 4.744 mg (equivalent to 230 mg of human clinical daily average dose) for 30 days' continuous administration has little effect on liver and kidney mercury accumulation

* 基金项目:江西省中医药管理局科技计划项目(编号:2019A281)

[#] 通信作者:杨苏琴, E-mail: 75584426@qq.com

and liver and kidney function, which can provide data reference for the clinical safety of red oil ointment.

Key words: Mercury accumulation; Red oil ointment; Liver and kidney function

中图分类号: R285.5

文献标识码: B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2022.02.038

红油膏是由九一丹、东丹按比例配以凡士林调和而成的矿物类中药外用制剂,具有拔毒祛腐、敛疮生肌之功效,临床上多用于肛周脓肿、肛瘘、肛窦炎、乳痈及慢性皮肤溃疡等脓腐或难愈创面,且疗效稳定、确切^[1-2]。九一丹作为红油膏疗效的重要来源,其中升丹主要成分为氧化汞(HgO),有研究显示超剂量、长时间用药可能导致体内汞蓄积甚至汞中毒,易造成肝肾功能损伤^[3]。由于红油膏在肛肠疾病中的应用范围较广且疗效确切,但对其毒副作用、用药剂量及时间的研究鲜有报道。因此,本实验通过大鼠外用不同剂量红油膏 1 个月,并观察其血液、尿液、肝脏及肾脏中汞含量和肝肾功能,以期为红油膏临床安全性提供数据参考。现报道如下:

1 材料

1.1 药品与试剂 红油膏粉(煅石膏、升丹、东丹按 9:1:1.5 比例混合制成),由江西中医药大学附属医院药剂科配制;医用凡士林纱布(国械注准 20193141543);水合氯醛溶液(江西省儿童医院,批号 H20120021);75%乙醇溶液(江西健宝医药科技有限公司,批号 20201006);氯化钠注射液(国药准字 H10983065);汞标准液(1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,中国计量科学研究院)。

1.2 仪器 3110 全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司);RA-915M 赛曼原子吸收汞分析仪(北京 Lumex 分析仪器公司);5430R 小型台式高速冷冻离心机(Eppendorf 艾本德中国有限公司);ME55 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多国际贸易有限公司)。

1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠 40 只,体质量 200 g,雌雄各半,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。置于江西中医药大学动物实验中心分笼饲养,恒温恒湿,采食全价标准饲料,自由饮水,适应性喂养 7 d 后开始实验。动物实验严格遵守江西中医药大学实验动物中心动物伦理

委员会要求,批准号:JZLLSC20210024。

2 方法

2.1 不同剂量红油膏的制备 将煅石膏、升丹、东丹研极细粉,过 80 目筛,按 9:1:1.5 比例混合制成红油膏粉^[4]。根据九一丹人体临床日均剂量为 200 mg(上海中医药大学附属龙华医院提供)^[5],按人与大鼠体表面积换算,人体表面积约 1.6 m^2 (体质量 60 kg),则人日均剂量为 125 mg/m^2 ;大鼠表面积约 0.033 m^2 (体质量 0.2 kg),则大鼠日均剂量为 4.125 mg/m^2 。因此,大鼠红油膏粉日均剂量为 4.744 mg(相当于人体临床日均剂量 230mg)。称取红油膏粉 4.744 mg、94.875 mg、189.750 mg 均匀涂抹于 3 $\text{cm} \times$ 3 cm 医用凡士林纱条上,制成低剂量红油膏纱条(相当于正常剂量)、中剂量红油膏纱条(相当于正常剂量 20 倍)、高剂量红油膏纱条(相当于正常剂量 40 倍)。

2.2 实验分组与给药 将 40 只大鼠随机分成 4 组(正常组、红油膏低剂量组、红油膏中剂量组、红油膏高剂量组),每组 10 只。按体质量予以 10%水合氯醛(0.35 ml/100 g)腹腔注射麻醉后,大鼠背部剃毛,面积约 5 $\text{cm} \times$ 5 cm ,用橡皮筋捆住四肢,呈俯卧位固定在大鼠固定板上,75%乙醇局部消毒手术区,选择距肩胛骨以下 2 cm ,以背中部脊柱为中点制作 3 $\text{cm} \times$ 3 cm 的全层皮肤缺损创面,深至深筋膜层,形成机械损伤动物模型,每隔 3 d 用刀片刮伤,保持新鲜、不愈合状态。给药前予以氯化钠注射液清洗创面,正常组予以医用凡士林纱条贴敷,给药组分别予以红油膏低剂量纱条、红油膏中剂量纱条、红油膏高剂量纱条贴敷。换药结束后予纱布覆盖,胶布固定,每日换药 1 次,持续 30 d。

2.3 体内汞蓄积测定 持续给药 30 d,第 30 天收集各组大鼠 24 h 尿液。给药结束次日,大鼠麻醉后腹主动脉取全血置于抗凝管,静置 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 500 r/min 离心 10 min,取血清置于 EP 管;同时摘取肝脏和肾脏制备组织匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 500 r/min 离心 15

min, 分离上清液置于 EP 管。用赛曼原子吸收汞分析仪检测大鼠尿液、血液、肝脏及肾脏中的汞含量。

2.4 肝肾功能检测 同上述方法制成血清, 用全自动生化仪测定大鼠血清中丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (CREA) 的含量。

2.5 统计学方法 数据处理采用 SPSS22.0 统计学软件, 计数资料以 % 表示, 采用 χ^2 检验, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 红油膏对大鼠血液、尿液、肝脏及肾脏中汞含量的影响 持续 30 d 给药后, 相比正常组, 红油膏低、中、高剂量组的血液和尿液中汞含量均明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且红油膏中、高剂量组的肝脏、肾脏中汞含量均明显升高 ($P < 0.01$)。相比红油膏低剂量组, 红油膏中、高剂量组尿液、肝脏、肾脏中汞含量均明显升高 ($P < 0.01$)。相比红油膏中剂量组, 红油膏高剂量组尿液、肾脏中汞含量均明显升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 红油膏对大鼠血液、尿液、肝脏及肾脏中汞含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量 (mg/d)	血液 ($\mu\text{g/L}$)	尿液 ($\mu\text{g/L}$)	肝脏 (ng/g)	肾脏 ($\mu\text{g/g}$)
正常组	10	-	15.6 \pm 1.9	10.5 \pm 11.5	174.6 \pm 43.9	1.7 \pm 1.0
红油膏低剂量组	10	4.744	25.0 \pm 11.2*	291.8 \pm 70.6#	248.1 \pm 104.3	3.3 \pm 2.5
红油膏中剂量组	10	94.875	31.7 \pm 3.4#	1 819.8 \pm 306.9# [▲]	1 342.2 \pm 283.9# [▲]	47.8 \pm 12.5# [▲]
红油膏高剂量组	10	189.750	34.4 \pm 10.3#	2 399.9 \pm 386.8# ^{▲△}	1 568.7 \pm 292.6# [▲]	80.9 \pm 13.4# ^{▲△}

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与红油膏低剂量组比较, [▲] $P < 0.01$; 与红油膏中剂量组比较, [△] $P < 0.01$ 。

3.2 红油膏对大鼠肝肾功能的影响 持续给药 30 d 后, 在肝功能方面, 红油膏高剂量组中 AST 含量较正常组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其余各给药组中 ALT、AST 的含量与正常组比较,

差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在肾功能方面, 相比于正常组, 红油膏中、高剂量组中 BUN 与 CREA 含量均明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 红油膏对大鼠肝肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量 (mg/d)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	BUN (mg/L)	CREA (mg/L)
正常组	10	-	63.1 \pm 10.7	363.3 \pm 53.0	12.93 \pm 2.27	29.86 \pm 6.06
红油膏低剂量组	10	4.744	71.2 \pm 9.2	412.5 \pm 76.3	13.86 \pm 2.37	30.92 \pm 4.33
红油膏中剂量组	10	94.875	69.4 \pm 12.5	413.9 \pm 60.8	15.02 \pm 1.64*	50.09 \pm 4.24#
红油膏高剂量组	10	189.750	71.0 \pm 9.5	424.3 \pm 50.7*	15.12 \pm 1.58*	50.68 \pm 5.91#

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

4 讨论

中医丹药应用起源于春秋战国, 至明清达到鼎盛时期, 尤其在中医外科领域收获奇效^[7]。但其中不乏含有铅、汞、砷等有毒成分, 长期应用时应时刻警惕这些有毒成分蓄积及靶器官毒性反应^[8]。除了口服途径以外, 现代研究发现含汞矿物类中药外用也是造成汞蓄积及慢性肝肾损伤的重要原因, 且主要与用药剂量及时间有关^[9]。因此, 亟待开展红油膏外用安全性及毒性研究的动物实验。

在体内汞蓄积方面, 大鼠持续红油膏给药 30 d 后, 汞在血液和尿液中存在不同程度的蓄积, 随着用药剂量的逐渐加大, 肝肾脏出现明显汞蓄积, 其中尿

液和肾脏的汞蓄积呈一定剂量依赖性。特别注意的是肝脏、肾脏在正常临床日均用量下汞蓄积量未见明显差异。上述结果提示正常临床日均用量下外用红油膏 30 d 对肝脏、肾脏汞蓄积影响较小, 而过量使用红油膏是导致肝肾汞蓄积的主要因素。汞在体内代谢周期长, 易产生体内蓄积及靶器官毒性反应, 有研究显示小鼠连续 2 周灌胃朱砂可发现小鼠的肝脏、肾脏、血液均有明显汞蓄积^[10]。体内汞蓄积实验表明长期给药的汞蓄积量为肾脏 > 脑 > 肝脏 > 血液, 而单次给药的汞蓄积量为肝脏最多^[11]。肾脏作为汞的主要排泄器官, 汞蓄积可引发肾脏中半胱氨酸-汞-半胱氨酸耦合物形成、脂质过氧化损伤以及有

机阴离子转运体 Oat1 和 Oat 受到抑制,进而导致肾小管上皮细胞肿胀坏死、皮质增厚、肾肿大等肾实质损伤^[12]。汞还可与体内靶器官中的谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶等产生结合作用,导致含巯基的抗氧化剂损耗及蛋白质损伤,进而引发氧化应激介导的肝损伤^[13]。

对大鼠肝肾功能的相关指标检测发现,低剂量红油膏对 ALT、AST、BUN、CREA 水平影响较小,而高剂量红油膏可致 AST 含量明显升高,中、高剂量红油膏也可致 BUN、CREA 含量明显升高。血清 ALT、AST 是评价肝功能的重要指标,汞蓄积可诱导脂质过氧化,进而引发 ALT、AST 等肝功能异常升高^[14]。血清 BUN、CREA 是评价肾小球滤过功能的经典指标,两者水平升高能够间接反映肾脏损伤程度^[15]。上述实验结果提示超剂量使用红油膏可对肝肾功能造成损伤,而持续 30 d 的正常临床日均用量未见明显的肝肾毒性。然而,上述实验中红油膏中剂量组中 AST 含量与肝脏汞蓄积量存在滞后性,这也提示 AST 在评价汞蓄积所致肝毒性的灵敏度方面可能存在误差。中、高剂量红油膏中 BUN、CREA 含量上升趋势与肾脏汞蓄积量一致,表明 BUN、CREA 可能是评价红油膏汞蓄积所致肾毒性的可靠指标。

综上所述,红油膏长期、超量给药可造成大鼠体内血液、尿液、肝脏、肾脏中汞蓄积及肝脏、肾毒性,但日均剂量 4.744 mg (相当于人体临床日均剂量 230 mg)且持续 30 d 外用红油膏粉对肝肾脏汞蓄积及肝肾功能影响较小,可为红油膏临床安全性提供数据参考。尽管如此,人体临床日均剂量 230 mg 红油膏在血液和尿液中汞蓄积仍不可避免,建议通过

减少使用时间以保障红油膏临床用药安全。对于儿童、孕妇、老年人等特殊人群仍然缺乏相关安全性评价证据,建议禁用、慎用。

参考文献

[1]彭迎迎,胡晓阳,陈光华,等.肛门洗剂联合红油膏治疗急性化脓性肛窦炎临床观察[J].实用中西医结合临床,2017,17(10):119-120.

[2]王希,易军,许来宾,等.金黄膏等三种传统中药外用制剂在中医外科中的运用[J].中国民族民间医药,2019,28(18):59-61.

[3]季炳武,陈伯仪,陈仲伟,等.九一丹研究综述[J].中医外治杂志 2020,29(6):73-75.

[4]陈红凤.中医外科学[M].第 4 版.北京:中国中医药出版社,2016.

[5]曹玉娥,陈小森,符胜光,等.外用九一丹 1 个月对家兔汞蓄、尿汞及肝肾功能的影响[J].中国中药杂志,2012,37(6):719-722.

[6]王治乔,袁伯俊.新药临床前安全性评价与实践[M].北京:军事医学科学出版社,1997.78.

[7]刘圣金,乔婷婷,林瑞超,等.含矿物药外用制剂的临床应用研究进展[J].中成药,2016,38(8):1797-1804.

[8]魏立新,张伯礼.含重金属传统药物安全性研究进展[J].药学进展, 2020,44(10):759-765.

[9]田悦,黄建梅,王晓辉,等.朱红膏中汞在破损皮肤模型大鼠体内的蓄积及毒性[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(8):34-39.

[10]王陶陶,董宇,常生,等.朱砂毒性的研究进展[J].沈阳药科大学学报,2018,35(10):897-902.

[11]梁爱华,李春英,薛宝云,等.朱砂汞在大鼠体内的蓄积性研究[J].中国中药杂志,2009,34(23):3068-3072.

[12]葛巍,谢昌营,叶梦琪,等.毒性矿物药的安全性思考[J].江西中医药大学学报,2020,32(6):1-5.

[13]尉梦瑶,陈华国,赵超,等.环境中常见重金属致肝毒性的研究进展 [J].环境与职业医学,2021,38(4):425-430.

[14]王蕾,谢月群,张和.松花粉对急性汞中毒大鼠肝肾的保护作用及机制研究[J].实用药物与临床,2018,21(1):10-13.

[15]杨红霞,张明,耿卢婧,等.藏药仁青常觉临床安全性评价[J].中华中医药杂志,2019,34(4):1692-1695.

(收稿日期: 2021-08-15)

(上接第 113 页)功:八段锦[M].北京:人民体育出版社,2003.3-13.

[8]齐军,吴倩,李森,等.哮喘控制问卷与哮喘生命质量问卷在哮喘患者中的应用价值研究[J].国际呼吸杂志,2014,34(3):174-176.

[9]李智鹏,熊雪芳,斯亚琴,等.中西医结合治疗支气管哮喘效果及对炎症因子和免疫功能的影响[J].中华中医药学刊,2018,36(3):709-711.

[10]成青,张云凤,周奇兴.中西医结合治疗对支气管哮喘患者疗效、免疫功能及肺功能水平的影响[J].吉林中医药,2018,38(7):782-785.

[11]李越峰,张睿,王佳,等.宣肺益气散对支气管哮喘缓解期肺脾气虚证患者疗效及免疫功能影响[J].临床军医杂志,2018,46(2):136-138,141.

[12]史凤磊,苏秋菊,潘春梅.穴位敷贴联合加味小青龙汤对支气管哮

喘急性发作期患者气道重塑及炎症细胞因子水平的影响[J].国际中医中药杂志,2018,40(3):218-221.

[13]卓燕薇,刘晓荣.八段锦在结核患者治疗护理中的效果研究[J].山西医药杂志,2020, 49(12):1613-1615.

[14]潘雁,王韡旻,张铭,等.八段锦康复训练对肺叶切除术后患者的肺功能康复作用[J].临床肺科杂志,2020,25(3):361-364.

[15]陈德林.八段锦联合复方异丙托溴铵治疗支气管哮喘疗效及对肺功能的影响研究[J].基层医学论坛,2021,25(1):74-75.

[16]折艳涛,刘东利,倪晓琴,等.加味前胡汤联合穴位贴敷治疗支气管哮喘的疗效及对肺功能影响的研究[J].四川中医,2018,36(9):70-72.

(收稿日期: 2021-10-28)