

不同粒径朱砂对秀丽隐杆线虫的毒性作用

李丹清, 金司仪, 胡 倩, 李 静, 曹 艳*
(湖北中医药大学药学院, 省部共建中药资源和中药复方教育部重点实验室, 湖北 武汉 430065)

摘要: **目的** 研究不同粒径朱砂对秀丽隐杆线虫的毒性作用。**方法** 采用微米级朱砂和纳米级朱砂, 分别以 1.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 对 L4 期线虫进行 48 h 暴露处理, 考察其对线虫运动行为 (头部摆动和身体弯曲)、生长发育 (体长)、生殖行为 (后代数目)、细胞凋亡、活性氧自由基 (ROS) 水平、乙酰胆碱酶 (AChE) 活性和感知行为 (趋向系数) 的影响。**结果** 与对照组比较, 线虫暴露于不同剂量的微米级朱砂和纳米级朱砂后, 高剂量组的运动行为、生殖能力、ROS 水平和 AChE 活性均有改变 (微米级朱砂, $P<0.05$; 纳米级朱砂, $P<0.01$)。低剂量下仅纳米级朱砂组的运动行为有变化 ($P<0.01$); 同时, 其生殖能力和 ROS 水平也有改变 ($P<0.05$)。**结论** 不同粒径朱砂对线虫的神经系统、生殖能力和体内自由基的代谢等产生不良影响, 且与粒径和用药剂量有关。此结论可为制订朱砂的炮制工艺和用药剂量提供参考。

关键词: 微米朱砂; 纳米朱砂; 秀丽隐杆线虫; 毒性
中图分类号: R282.76 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)09-2558-05
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.054

朱砂为硫化物类矿物辰砂族辰砂, 主要成分为硫化汞 (HgS), 多为内服, 也可外用^[1-2], 主要功效为镇惊安神、解毒明目, 可用于治疗心悸易惊、失眠多梦、小儿惊风、视物昏花和疮疡肿毒等症^[3]。2020 年版《中国药典》中收载含朱砂的中成药占中药成方制剂总数的 10% 左右, 不少儿科成方中也含有朱砂^[4]。朱砂因含有大量的重金属汞, 使其安全性倍受争议, 近年来因服用朱砂而引起的不良反应或中毒事件也时有发生^[5], 《中国药典》曾先后 2 次大幅度下调朱砂的用量。朱砂常规炮制方法为水飞, 该法既可使药物粉碎到合适的粒径又可降低毒性。有研究资料表明, 药物粉碎至较小粒径时, 有利于有效成分的溶出, 但也可能会使毒性成分溶出增加。尤其是微米级颗粒粉碎至纳米级时, 毒性可显著增强^[6-7]。

秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) 是一种多细胞真核生物, 具有生命周期短暂、体型小、结构简单、可操作性强、易于在实验室培养等特点, 其全基因组已知, 近年来被广泛用于毒理学方面的研究^[8-10]。线虫的毒性评价指标有众多: 寿命、死亡率和细胞凋亡是研究衰老与毒性的基本手段; 运动行为、AChE 活性、学习行为和记忆行为主要用于研究神经毒性; 生长发育和生殖能力指标主要用于研究发育和生殖方面的毒性^[11]。本研究以秀丽隐杆线虫作为模型, 从寿命、运动行为、生长发育、生殖能力、细胞凋亡、ROS 水平、AChE 活性和化学趋向性等方面研究微米级朱砂 (WZ) 与纳米级朱砂 (NZ) 对线

虫的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试药品 朱砂取自湖北中医药大学标本馆。2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯 (上海源叶生物科技有限公司)。BCA 蛋白定量检测试剂盒和 AChE 活性测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。无水乙醇、氯化钠、氢氧化钠和次氯酸钠等化学药品均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器 MS2000 马尔文激光粒度仪、Zetersizer Nano ZS 纳米粒度、Zeta 电位及分子量分析仪 (英国马尔文仪器公司); 体视显微镜 (南京江南永新光学有限公司); IX73 型荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); MM400 冷冻混合球磨仪 (德国 Retsch 公司); 424R 小型台式高速冷冻离心机 [艾本德 (中国) 有限公司]; WaterPurifier, SC083696 超纯水机 (沃特林水处理设备有限公司)。

1.2 线虫培养与同步化 实验用秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*, 野生型 N2) 及缺陷型大肠杆菌 (*E. coli* OP50) 均由华中农业大学动科院胡敏教授惠赠。将涂布有大肠杆菌的线虫生长培养基 (NGM) 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 待 NGM 冷却后, 将线虫置于 NGM 上, 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养。用新鲜配制的线虫裂解液 (1% NaClO 和 1 mol/L NaOH) 裂解怀卵成虫, 得到虫卵, 培养 48 h 后, 对生长至 L4 期线虫进行暴露。

收稿日期: 2020-03-13
基金项目: 湖北省教育厅优秀中青年科技创新团队计划项目 (T201608)
作者简介: 李丹清 (1995—), 女, 硕士生, 从事中药制剂新剂型新技术研究。Tel: 13007156858, E-mail: 1321854060@qq.com
* 通信作者: 曹 艳 (1975—), 女, 博士, 副教授, 从事中药制剂新剂型新技术研究。Tel: 15972044808, E-mail: caoyan7593@163.com

1.3 材料处理和暴露方法

1.3.1 材料处理 将朱砂研磨处理后，过 300 目标标准筛，得到微米级朱砂（马尔文粒度分析仪测得其粒径分布 D10 为 1.21 μm，D50 为 10.72 μm，D90 为 21.36 μm）。将朱砂球磨仪处理 60 min，得到纳米级朱砂 [纳米粒度和 Zeta 电位及分子量分析仪测定其粒径 Z-Average 为 (458.3±30) nm]。下文中均分别用 WZ、NZ 指代微米级朱砂和纳米级朱砂。

1.3.2 暴露方法 用 M9 缓冲液将 WZ 和 NZ 配制成一定质量浓度的悬浊液，加入到每个培养皿中，等 M9 缓冲液挥发或者浸入到 NGM 后，WZ 和 NZ 沉积下来，均匀分散在 NGM 表层^[12]。WZ 和 NZ 采用的质量浓度均为 1 μg/cm² 和 5 μg/cm²，空白对照组在 NGM 中加入相应体积的 M9。暴露前 24 h 将 WZ 和 NZ 注入培养皿中。

1.4 运动行为试验

1.4.1 身体弯曲频率 线虫暴露 48 h 后，将其转至不含 OP50 的 NGM 板中恢复 1 min，每组 10 条，对 20 s 内线虫身体弯曲的次数进行计数。线虫相对于其身体长轴方向 1 个波长的运动记为 1 次身体弯曲。

1.4.2 头部摆动频率 线虫暴露 48 h 后，于不含 OP50 的 NGM 板上滴加一滴 M9 溶液，将线虫置于 M9 中恢复 1 min 后，再观察 1 min 内线虫头部摆动次数，每组 10 条。线虫头部从一侧摆到另一侧再摆回来记为 1 次头部摆动。

1.5 生长发育试验 将给药暴露后的线虫挑至滴加有 M9 的 2% 琼脂片上，每组 10 条，再滴加 0.4% NaN₃ 溶液，待虫体麻醉后，置于荧光倒置显微镜下拍照并测量线虫体长。

1.6 生殖行为试验 将暴露后线虫挑至不同组别的 NGM 板上，每板 1 条，每 24 h 将其转入新的 NGM 中，直至排卵期结束。含卵板均在 20 ℃ 孵育 48 h 后再计数，各板后代数相加即为该线虫总后代数，每组约 10 条线虫。

1.7 细胞凋亡测定 将暴露后线虫挑至含 5 μg/mL 吖啶橙 (AO) 染液和 OP50 的 M9 溶液中，于 20 ℃ 染色 1 h，吸出染色线虫，于含 OP50 的 NGM 板中恢复 45 min，全程注意避光。将线虫挑至含 2 滴 0.2% NaN₃ 溶液的 2% 琼脂载玻片上，荧光显微镜（激发波长 485 nm，发射波长 530 nm）下观察拍照^[13]，并用 Image Pro Plus 6.0 软件分析各照片荧

光强度，每组约 10 条线虫。

1.8 活性氧自由基 ROS 测定 将暴露后线虫挑至含 50 μL M9 的无菌 96 孔板中，随后加入 50 μL H₂DCF-DA，至其终浓度为 50 μmol/L，于 20 ℃ 处理 3 h 后，将线虫转至滴加 0.2% NaN₃ 溶液的 2% 琼脂载玻片上，荧光显微镜（激发波长 485 nm，发射波长 530 nm）下观察拍照^[14]，并用 Image Pro Plus 6.0 软件分析各照片荧光强度，每组约 10 条线虫。

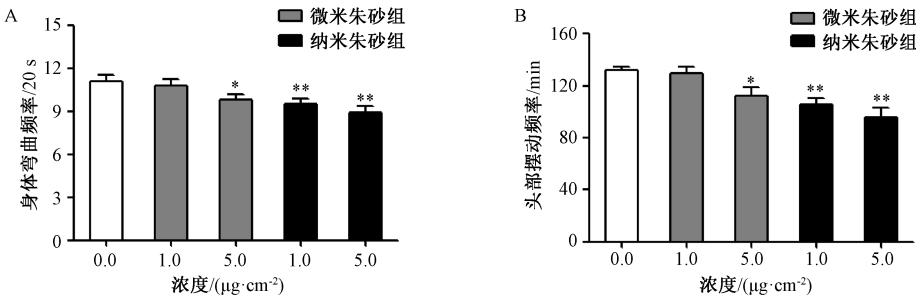
1.9 乙酰胆碱酯酶活性测定 将暴露后的线虫用 M9 缓冲液洗下，每组约 1 000 条线虫，在冰水浴下超声破碎，离心，上清液分别用 BCA 蛋白定量检测试剂盒和 AChE 活性测定试剂盒测定总蛋白质质量浓度和 AChE 活性。

1.10 感知行为试验 线虫暴露 48 h 后，用 M9 洗 3 次后将其放置于 9 cm 平板的中心，每组约 100 条线虫。在距平板边缘 0.5 cm 的一点（a 点）滴加乙醇稀释的 0.5% 苯甲醛 1 μL，并滴加 1 mol/L 叠氮化钠 1 μL（使运动到该位置的线虫麻痹），在平板相对的另一点（b 点）滴加乙醇和叠氮化钠。60 min 后，将距 a 点、b 点 1.5 cm 左右范围的线虫数量记为 A 和 B。趋向性指数（CI）=（A-B）/（A+B）。

1.11 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，通过 GraphPad Prism 5.0 软件进行作图，结果以（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 朱砂对秀丽线虫运动行为的影响 头部摆动频率和身体弯曲频率作为反映神经系统基本功能的指标，已经被广泛用于神经毒性的分析。暴露于不同组别朱砂 48 h 后，各组线虫身体弯曲频率和头部摆动频率如图 1 所示。与对照组比较，暴露于 1 μg/cm² WZ 的线虫身体弯曲频率和头部摆动频率无变化，而暴露于 5 μg/cm² WZ 组的线虫身体弯曲频率和头部摆动频率降低（P<0.05）。暴露于 NZ 的 2 个剂量组后，线虫身体弯曲频率和头部摆动频率均低于对照组（P<0.01）。对于同粒度材料而言，随着给药浓度的增加，线虫身体弯曲频率和头部摆动频率均有降低的趋势。



注：与对照组比较，* P<0.05，** P<0.01。

图 1 朱砂对线虫身体弯曲频率（A）和头部摆动频率（B）的影响

2.2 朱砂对秀丽线虫生长发育的影响 以秀丽线虫的体长
为指标对朱砂导致的秀丽线虫发育缺陷进行评价,结果不
同组别线虫并没有产生生长迟缓的现象。如图 2 所示,与
对照组比较,各组体长均无差异 ($P>0.05$)。由此可见,
在 $0.0\sim5.0\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 浓度范围内,WZ 和 NZ 对线虫的生
长发育均无抑制作用。

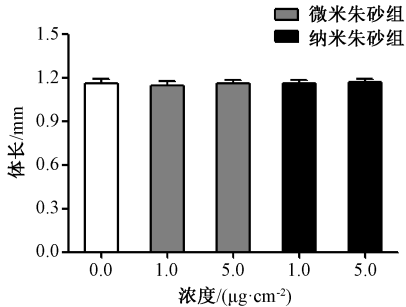
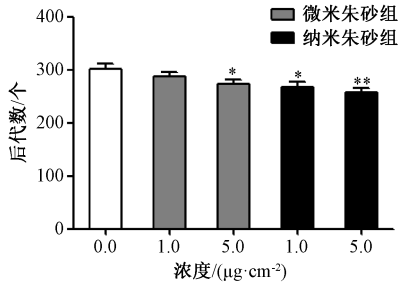


图 2 朱砂对线虫体长的影响

2.3 朱砂对秀丽线虫生殖行为的影响 为了评价不同粒径
朱砂暴露后对线虫生殖能力的影响,对线虫的子代数进行
了测定,结果见图 3。与对照组子代数比较,低剂量的 WZ
对线虫子代数目的影响无差异 ($P>0.05$);高剂量 WZ 和
低剂量 NZ 组的线虫后代数目减少 ($P<0.05$),其后代数分

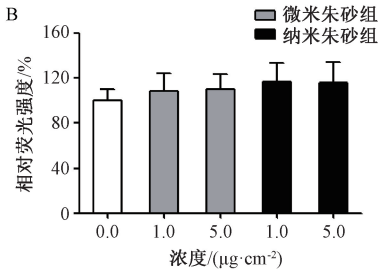
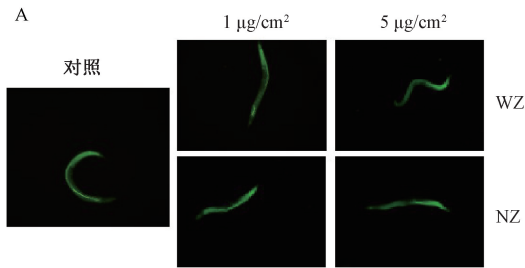
别降低了 9.6% 和 11.3%。高剂量 NZ 组的线虫后代数减少
($P<0.01$),其后代数降低了 14.4%。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 3 朱砂对线虫生殖行为的影响

2.4 朱砂对秀丽线虫细胞凋亡的影响 本研究采用吖啶橙
染色法分析秀丽线虫细胞凋亡的情况,线虫染色后,凋亡
细胞的核会变为亮绿色或者黄色,而正常细胞则是淡绿色,
暴露于不同组别朱砂 48 h 后,线虫的细胞凋亡情况如图 4
所示。与对照组比较,暴露于 WZ 的 2 个剂量组以及低剂
量 NZ 组的线虫通体均为浅绿色,咽部颜色略深,细胞凋亡
并不明显;高剂量 NZ 组的线虫生殖腺部位绿色较深,且体
内的卵为亮绿色。表明高剂量 NZ 一定程度上有导致秀丽线
虫生殖部位细胞发生凋亡的趋势。

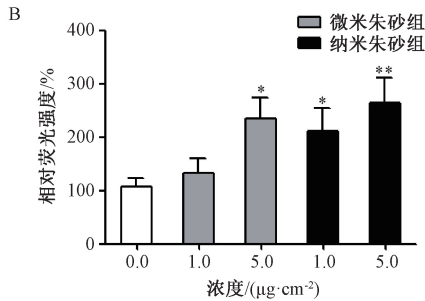
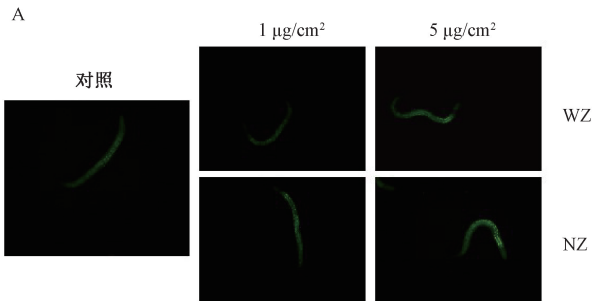


注:A 为各组线虫荧光图,B 为各组线虫相对荧光强度。

图 4 朱砂对线虫细胞凋亡的影响

2.5 朱砂对秀丽线虫 ROS 的影响 活性氧自由基 ROS 的
测定可以反映出机体是否受到氧化损伤,已有研究表明自
由基是引起衰老的根本原因,因此,对于 ROS 的测定是十
分有必要的^[15]。如图 5 所示,与对照组比较,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ WZ
对线虫 ROS 水平的影响无差异 ($P>0.05$),5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ WZ 和

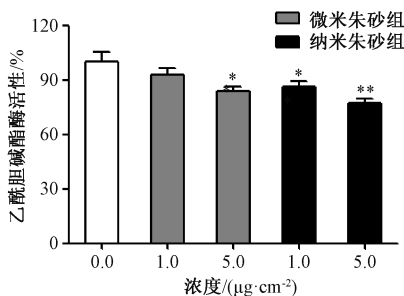
1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ NZ 组的线虫 ROS 水平升高 ($P<0.05$),5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
NZ 组的线虫 ROS 水平升高更多 ($P<0.01$),达 147.2%,
这表明 WZ 和 NZ 可以通过氧化应激途径对线虫产生损伤,
且这种损伤作用与朱砂的粒径和剂量有关。



注:A 为各组线虫荧光图,B 为各组线虫相对荧光强度。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 5 朱砂对线虫体内 ROS 水平的影响

2.6 朱砂对秀丽线虫 AChE 活性的影响 乙酰胆碱酯酶 AChE 是胆碱能神经在传递过程中的一种重要的神经递质，经常用于神经毒性评价体系，是神经毒性分析的经典指标之一^[16]。如图 6 所示，与对照组比较，1 μg/cm²WZ 对线虫 AChE 的活性几乎无影响，5 μg/cm²WZ 和 1 μg/cm²NZ 能够抑制线虫 AChE 活性 ($P<0.05$)，5 μg/cm²NZ 组的线虫 AChE 活性的抑制作用更强 ($P<0.01$)，表明 NZ 和 WZ 通过影响乙酰胆碱酯酶活性对线虫产生损伤，且这种损伤与朱砂的粒径和剂量有关。



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 6 朱砂对线虫乙酰胆碱酯酶活性的影响

2.7 朱砂对秀丽线虫感知行为的影响 线虫的趋向性行为能够综合反映出线虫对于外部刺激的学习行为，以及反应敏感性受到化学品的影响程度。如图 7 所示，虽然实验组的趋向系数有略低于对照组的趋势，但在 0~5.0 μg/cm² 浓度范围内，WZ 和 NZ 对线虫的趋向行为并无明显影响。

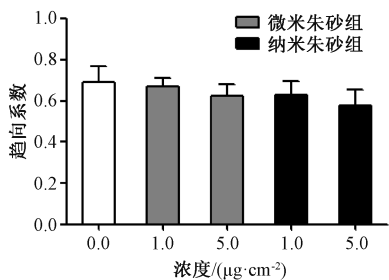


图 7 朱砂对线虫感知行为的影响

3 讨论

朱砂的主要成分为硫化汞，含汞化合物可以经过皮肤、呼吸道和胃肠道进入到人体内，汞离子能与血清白蛋白结合^[17]，并随着血液的循环分布到其他器官和组织，长期服用朱砂的过程中可能会引起肝肾毒性、神经毒性和生殖毒性等^[4]。本研究用生命周期较短的模式生物秀丽隐杆线虫探讨了不同粒径朱砂的毒性作用。

线虫的运动行为能够反映出神经系统的基本功能，且多用于重金属材料神经毒性的分析^[18]。线虫的头部摆动频率和身体弯曲频率是分析其运动行为的常用指标^[19]。本研究结果显示，纳米级朱砂组线虫的身体弯曲和头部摆动频率均降低，而微米级朱砂组仅高剂量表现出差异。可见线虫的运动行为受到了严重的影响，这可能是由于朱砂损害了线虫的运动相关神经元，从而抑制了其运动行为。线虫

的体长是衡量其生长发育的指标之一，能够反映出秀丽线虫的发育是否正常。本实验中线虫的体长并无变化。表明短时间内，朱砂对线虫的生长发育并无影响。

后代数目是检测秀丽线虫的繁殖能力的重要指标。有报道认为，朱砂对人的生殖能力有损害作用^[20]。本研究发现朱砂会导致秀丽线虫繁殖能力下降，这也进一步证实了朱砂存在着生殖毒性作用，并且这种毒性作用与朱砂的粒径和暴露剂量有关，证实了朱砂应为“妊娠禁忌药物”。有研究表明，生物个体行为和生殖上的异常可能与 AChE 的活性相关^[21]。而前文中朱砂对秀丽线虫的运动和生殖行为的抑制作用与朱砂对线虫 AChE 活性的抑制作用一致，因此我们推测这种说法可能是合理的。

细胞凋亡与细胞坏死并不一样，它是机体为了更好地适应生存环境而主动死亡的过程。本实验结果表明朱砂对细胞凋亡的影响较小。自由基水平可以反映出机体是否受到损伤^[19]，自由基过多可能会破坏免疫和信号传导等过程。实验结果表明，随着朱砂浓度升高，秀丽线虫体内 ROS 水平也相应增加；而对于同剂量的朱砂，随着粒径的减小，其 ROS 水平有升高的趋势。相比于微米级朱砂而言，纳米级朱砂毒性更大，且两者的毒性作用均具有一定的浓度依赖性。故可以推测朱砂的毒性可能与自由基代谢紊乱引起的氧化损伤有关。

秀丽线虫的感知行为主要受化学感应神经元的控制，该实验常用来分析药物对记忆和认知功能的影响^[22]。本实验利用秀丽线虫具有趋向于苯甲醛的特点设计了趋向试验。结果发现，朱砂对线虫的趋向行为的影响并不明显，表明朱砂对秀丽线虫的记忆损伤并不明显。

综上所述，不同剂量不同粒径的朱砂会降低线虫的运动行为，损害生殖能力，提高 ROS 水平，降低 AChE 活性。朱砂对线虫的神经系统和生殖能力有明显的毒性，且存在一定的氧化应激损伤。根据朱砂水飞炮制工艺及质量标准研究^[23]可知，朱砂炮制后粒径要求小于 25 μm，但只规定了粒径上限，没有规定其下限。本研究前期，对 3 批不同来源朱砂的粒度进行测定，发现不同批次的朱砂都有一定比例的小于 1 μm 的极细朱砂存在。由此说明，对朱砂的炮制工艺研究有必要对其粒径下限做出规定，以保证临床用药安全。本实验结果表明微米级朱砂在低剂量均表现出相对的安全性，提示我们在朱砂的用药过程中不可忽视其毒副作用，并需要控制好粒径和用药剂量。鉴于秀丽隐杆线虫的结构较为简单和完全，和人类相比有较高的保守性，因此，本研究可为后续进一步研究朱砂的毒性及其毒性机制提供一定的参考。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：143.
[2] 王晓桦，林瑞超，董世芬，等. 含汞矿物药的毒性研究进展[J]. 中国中药杂志，2017，42(7)：1258-1264.
[3] 丁 通，骆骄阳，韩 旭，等. 朱砂毒性的研究进展及配

伍必要性分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(24): 4533-4540.

[4] 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.

[5] 周末,程伟. 朱砂的不良反应概况[J]. 山东中医杂志, 2011, 30(8): 597-599.

[6] 高艳荣,贾玉巧,赵永东,等. 纳米和微米 SiO₂ 对 A549 细胞毒性及其炎症因子分泌的影响[J]. 环境卫生学杂志, 2014, 4(6): 518-522.

[7] Wu Q L, Wang W, Li Y X, *et al.* Small sizes of TiO₂-NPs exhibit adverse effects at predicted environmental relevant concentrations on nematodes in a modified chronic toxicity assay system[J]. *J Hazard Mater*, 2012, 243: 161-168.

[8] 金司仪,张凡,曹艳. 3 种常用防腐剂对秀丽隐杆线虫毒性作用的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 905-909.

[9] Wang J J, Dai H, Nie Y G, *et al.* TiO₂ nanoparticles enhance bioaccumulation and toxicity of heavy metals in *Caenorhabditis elegans* via modification of local concentrations during the sedimentation process[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 162: 160-169.

[10] Moon J M, Kwak J I, An Y J. The effects of silver nanomaterial shape and size on toxicity to *Caenorhabditis elegans* in soil media[J]. *Chemosphere*, 2018, 215: 50-56.

[11] 苗祥贞,张潇,袁炎炎,等. 黄连水提物对秀丽隐杆线虫毒性效应评价[J]. 中草药, 2018, 49(4): 874-878.

[12] 孔璐,唐萌,王大勇,等. 不同尺度纳米镍对秀丽线虫的发育毒性[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 623-628.

[13] Luo X, Xu S M, Yang Y N, *et al.* A novel method for assessing the toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chemosphere*, 2017, 168: 648-657.

[14] Yu Y B, Dosanjh L, Lao L X, *et al.* Cinnamomum cassia bark in two herbal formulas increases life span in *Caenorhabditis elegans* via insulin signaling and stress response pathways[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9339.

[15] 周兴华,张晓伟,张飞,等. 双酚 A 对秀丽隐杆线虫的急性毒性作用研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(12): 1-5; 76.

[16] 何雪珠,李洪博,胡亚茹,等. 2 种新烟碱类杀虫剂对秀丽隐杆线虫神经毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(5): 235-241.

[17] 马娜娜,张楠,孔玲,等. 硫柳汞对秀丽隐杆线虫神经行为及生长发育的影响[J]. 毒理学杂志, 2017, 31(2): 88-93.

[18] 张燕芬,王大勇. 利用模式动物秀丽线虫建立环境毒物毒性的评估研究体系[J]. 生态毒理学报, 2008, (4): 313-322.

[19] 李巧. 氟化钠对秀丽隐杆线虫毒性作用研究[D]. 长春: 长春理工大学, 2011.

[20] Huang C F, Hsu C J, Liu S H, *et al.* Exposure to low dose of cinnabar (a naturally occurring mercuric sulfide (HgS)) caused neurotoxicological effects in offspring mice[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 254582.

[21] Wang K, Qi S Z, Mu X Y, *et al.* Evaluation of the toxicity, ache activity and DNA damage caused by imidacloprid on earthworms, *eisenia fetida*[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2015, 95(4): 475-480.

[22] Chen W, Lin H R, Wei C M, *et al.* Echinacoside, a phenylethanoid glycoside from *cistanche deserticola*, extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* and protects from A β -induced toxicity[J]. *Biogerontology*, 2018, 19(1): 47-65.

[23] 李超英,滕利荣,魏秀德,等. 朱砂水飞炮制工艺及质量标准研究[J]. 中成药, 2008, 30(12): 1806-1809.