

朱砂体内汞暴露与幼鼠记忆功能障碍的相关性

胡赵良, 邹文字, 宋敏, 杭太俊*, 陆宇婷**

(中国药科大学药物分析系, 南京 210009)

摘要 朱砂(α -HgS)是传统矿物类中药材,作为重镇安神药,常配伍用于治疗小儿高热惊风。但因其含有大量汞元素,对正处于发育期儿童的中枢神经系统有潜在危害,极可能造成严重的记忆功能障碍。本研究以幼年大鼠为对象,分别灌胃给予低、中、高剂量朱砂,每日1次,连续14周;采用原子荧光光谱法监测不同发育阶段大鼠血汞暴露量;利用HE染色和Morris水迷宫实验考察与记忆相关的组织结构病变与功能改变;通过相关性分析揭示朱砂和记忆功能障碍之间的剂量-血汞暴露量-毒性效应关系。结果显示,大鼠血汞暴露量呈时间和剂量依赖式增高;灌胃14周后,高剂量组大鼠海马锥体细胞出现核固缩、排列紊乱等病理改变;与对照组相比,高剂量组大鼠在水迷宫实验中的平台与目标象限潜伏期显著延长,目标象限停留时间显著缩短;且朱砂剂量与血汞暴露量间、血汞暴露量与记忆功能障碍间均存在显著的相关性。因此,幼年大鼠长期超量摄入朱砂,会增高体内汞暴露水平,破坏海马组织正常形态结构,导致记忆障碍。本研究为含朱砂儿童专用制剂临床使用的潜在汞中毒风险预警提供了参考。

关键词 朱砂;汞;幼年大鼠;记忆功能障碍;原子荧光光谱法;Morris水迷宫实验

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2023)04-0483-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.2023042603

引用本文 胡赵良, 邹文字, 宋敏, 等. 朱砂体内汞暴露与幼鼠记忆功能障碍的相关性[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(4): 483 - 489.

Cite this article as: HU Zhaoliang, ZOU Wenyu, SONG Min, et al. Correlation between *in-vivo* mercury exposure from Cinnabaris and memory disorders in juvenile rat[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(4): 483 - 489.

Correlation between *in-vivo* mercury exposure from Cinnabaris and memory disorders in juvenile rat

HU Zhaoliang, ZOU Wenyu, SONG Min, HANG Taijun*, LU Yuting**

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Cinnabaris(α -HgS) is a mineral traditional Chinese material medica, as a tranquilizer and sedative, which is widely used in combination with herbs for the treatment of children high fever and convulsion. However, a large amount of mercury in Cinnabaris poses a potential risk to the immature central nervous system of children and probably causes severe memory disorders. In this study, three groups of juvenile rats were given low, medium, and high doses of Cinnabaris by oral gavage once a day for 14 continuous weeks, respectively. The blood mercury concentrations of the rats at different growth phases were monitored by atomic fluorescence spectrometry. The brain structural and functional changes related to the memory functions were investigated through HE staining and Morris water-maze test. Correlation analysis was conducted to clarify the dose-mercury exposure-toxic effect relationship of Cinnabaris and memory disorders. It was found that the blood mercury levels increased in both time- and dose-dependent manner. After the 14-week continuous administration of Cinnabaris, the pathological lesions in hippocampal neurons of rats in the high dose group were observed including pyknosis and disordered cell arrangement. In the Morris water-maze test, compared with the control group, rats in the high dose group exhibited the significantly prolonged latency to find the platform and the target quadrant, and the time spent in

收稿日期 2023-04-26 通信作者 *Tel:025-83271090 E-mail:hangtj@cpu.edu.cn

**Tel:025-83271090 E-mail:luyt@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81903911, 81473176);江苏省自然科学基金青年项目(BK20190556)

the target quadrant was obviously shortened. Thus, the significant correlations were established between Cinnabaris dose and mercury exposure, mercury exposure and memory disorders, respectively. In conclusion, the long-term and overdose administration of Cinnabaris in juvenile rats can increase the *in-vivo* mercury level, destroy the normal hippocampal morphological structure, and lead to memory disorders. This study provided scientific references for the potential mercury poisoning risks pharmacovigilance of Cinnabaris-containing paediatric formulations.

Key words Cinnabaris; mercury; juvenile rat; memory disorders; atomic fluorescence spectrometry; Morris water-maze test

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81903911, No. 81473176) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20190556)

朱砂(Cinnabaris)是传统矿物类中药材,主含硫化汞(α -HgS > 98%),性味甘,微寒,归心经。因其具有镇惊安神之功效,朱砂常配伍用于儿童中成药中,用于治疗小儿高热、小儿惊风等^[1,43]。《中华人民共和国药典》(2020版)收录了35种含朱砂儿科制剂,如小儿惊风散、小儿至宝丸、小儿清热片等^[1]。

汞是公认的有毒重金属,各种形式的汞化合物都可能造成体内汞暴露量增高,引发毒性反应^[2]。朱砂作为含汞中药材,不合理使用导致的汞中毒事件时有发生^[3-5],使其安全性备受质疑。儿童作为特殊的用药群体,对汞化合物的毒性尤为敏感,因此含朱砂儿童专用制剂的临床使用应当更为慎重。汞的毒性累及人体各个器官,对中枢神经系统损害尤甚^[6]。对于处在发育阶段的儿童,长期高水平的汞暴露可引起神经发育障碍,包括记忆功能障碍、儿童自闭症、注意力缺陷、阅读及运动障碍等^[7-8]。其中记忆功能障碍是儿童汞中毒后较为常见的一种表现,即使摆脱汞暴露,记忆功能也不易恢复^[9]。

虽然朱砂的水溶性与口服生物利用度极低,毒性远小于其他形式的汞化合物,但已有研究表明,复方配伍与胃肠道消化作用能显著增加机体对朱砂中汞的吸收,并促进汞进入大脑^[10]。此外,儿童的血脑屏障发育不完善,更易受有害重金属的影响^[11],极大地增加了含朱砂儿童专用制剂引发记忆功能障碍的风险。

因此,本研究以幼年大鼠为实验对象,使用冷原子-原子荧光光谱法(CV-AFS)测定幼鼠灌胃给予低、中、高剂量水平朱砂后不同发育阶段的血汞暴露量,观察海马神经元形态变化,测试大鼠的记忆

功能,并利用相关性分析揭示朱砂与记忆功能障碍间的剂量-血汞暴露量-毒性效应关系,从而为含朱砂儿童专用制剂的临床合理使用提供科学指导与理论依据。

1 材料

1.1 试剂

朱砂(凤凰县红飞药用朱砂有限责任公司,批号:20190401,硫化汞含量:98.8%,总汞含量:0.85 mg/mg,可溶性汞盐小于0.10%,符合《中华人民共和国药典》2020年版一部“朱砂”项下的要求^[1,43]),汞单元素标准物质(中国计量科学研究院,批号:19041)。其余试剂均为市售分析纯试剂。

1.2 仪器

AF-640A冷原子-原子荧光光谱仪(北京瑞利分析仪器有限公司);AF-2型汞元素荧光空心阴极灯;Morris水迷宫设备、Xeye Aba V3.2动物行为轨迹视频分析系统(北京天鸣宏远科技发展有限公司);正置显微镜(德国Leica公司);BS21S分析天平(德国Sartorius公司)。所有玻璃仪器均使用20%硝酸浸泡24 h以上,并用超纯水洗净。

1.3 动物

清洁级SD幼年大鼠32只(雌性,3周龄,体重为 50 ± 2 g,浙江维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(浙)2019-0001),在清洁级无汞环境下饲养,每个鼠笼4只大鼠。饲养室温度(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对空气湿度40%~45%,12 h/12 h光照/黑暗交替,自由饮水摄食。所有动物实验操作均经过中国药科大学动物伦理委员会批准(批号:2020-03-007),符合实验室动物饲养和使用指导原则。

2 方法

2.1 实验动物分组与处理

大鼠适应性喂养3 d后按体质量随机分为4个剂量组:对照组(C group)、朱砂低剂量组(L group)、中剂量组(M group)、高剂量组(H group),每组8只。根据《中华人民共和国药典》规定的朱砂最高摄入量 $0.5 \text{ g/d}^{[1143]}$,按大鼠间体表面积折算大鼠剂量约为 50 mg/kg ,设置为低剂量,该剂量的5倍(250 mg/kg)、20倍(1000 mg/kg)分别为中、高剂量。对照组灌胃给予 $0.5\% \text{ CMC-Na}$ 水溶液,朱砂组分别灌胃给予朱砂混悬液(50 mg , 250 mg , 1000 mg/kg ;以 $0.5\% \text{ CMC-Na}$ 水溶液作为混悬介质),每日1次,连续灌胃14周。

每日记录大鼠体质量、饮水量、摄食量,观察大鼠状态;分别于第8周、10周、12周、14周末次给药24 h后,眼内眦静脉丛取血 0.3 mL 至含有肝素钠的离心管中,混匀,置 -80°C 保存待测;于第13周进行Morris水迷宫实验;于第14周末次给药24 h后,腹腔注射乌拉坦(1.2 g/kg)麻醉大鼠,暴露胸腔,心脏灌注生理盐水约 250 mL ,低温条件下取大鼠脑组织,称重后置于 4% 多聚甲醛中固定24 h。

2.2 大鼠血汞暴露量的测定

2.2.1 大鼠全血样品前处理 取全血 0.2 mL ,置 50 mL 凯氏烧瓶中,加入 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4(4:1)$ 5 mL ,混匀,过夜。于 $120\sim 140^\circ\text{C}$ 加热消解2 h,保持微沸,必要时补加 HNO_3 适量,加热至溶液澄清透明,溶液体积约 1 mL ,停止加热,放冷。用 $5\% \text{ HNO}_3\text{-}0.05\% \text{ K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 转移至 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。同法制备空白溶液。

2.2.2 冷原子-原子荧光光谱检测条件 以 $2\% \text{ HNO}_3$ 溶液为载流; $0.1\% \text{ KBH}_4\text{-}0.2\% \text{ KOH}$ 水溶液为还原剂;蠕动泵转速为 100 r/min ;PMT负高压为 -270 V ;主灯电流为 30 mA ;原子化器温度为 200°C (冷原子,低温);载气氩气流量为 400 mL/min ;辅助气流量为 400 mL/min ;原子化器高度为 7 mm ;连续流动程序为:进样(8 s);停泵(4 s);注入(25 s);停泵(1 s);以峰面积定量,峰形对称且平滑。

2.3 大鼠海马组织形态学病理检测

固定后的脑组织经脱水透明,石蜡包埋后切片,切片厚度为 $3 \mu\text{m}$,烘干脱蜡后进行HE染色,对切片进行脱水透明,用中性树胶封片。在正置显

微镜下观察和拍摄。

2.4 Morris水迷宫实验

Morris水迷宫实验在直径 150 cm ,高 60 cm 的宫体中进行,宫体被平均分为4个象限,并在第4象限(目标象限)放置直径为 10 cm ,高为 30 cm 的平台,水温为 $23\sim 25^\circ\text{C}$ 。Morris水迷宫实验过程分为连续6 d的定位航行实验和第7天的空间探索实验两部分。定位航行实验期间,设置平台可见,训练大鼠对平台位置的记忆,每天训练2次,每次游泳时间为 90 s ;空间探索实验期间,撤去平台,测试大鼠的记忆能力,分别记录 90 s 内大鼠平台潜伏期、目标象限潜伏期、平台停留时间、目标象限停留时间、目标象限停留总时间(平台停留时间+目标象限停留时间)以及穿台次数。

2.5 统计分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 23软件进行两组之间的双尾独立样本Student's *t*-test、Spearman相关性分析与Pearson相关性分析,当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。使用GraphPad Prism 8软件绘制结果统计图,使用R语言Pheatmap包绘制相关性热图。

3 结果

3.1 朱砂对幼年大鼠生长发育、体质量及脑组织脏器系数的影响

给药期间,各组大鼠饮水摄食正常,生长发育情况良好,未见明显中毒症状。如图1所示,各组大鼠体质量增长速度接近,无统计学差异;给药结束后,剥取脑组织,称重,计算脏器系数(脑重/体质量 $\times 100$),无统计学差异。

3.2 大鼠灌胃朱砂后血汞暴露量检测

3.2.1 大鼠血汞暴露量检测方法学验证 对建立CV-AFS血汞暴露量测定方法进行了线性、专属性、精密度、回收率、稳定性考察。以全血系列标准样品荧光峰面积(*Y*)对血汞暴露量(*C*, ng/mL)进行回归。典型回归方程为 $Y = 32.26C + 52.86$,相关系数 $r = 0.9996$ 。结果表明,血汞暴露量在 $5\sim 80 \text{ ng/mL}$ 的范围内线性关系良好,定量限浓度为 5 ng/mL 。分别配制低、中、高3个质量浓度水平(10 、 35 、 60 ng/mL)的全血总汞标准样品各6份,同法操作并测定。结果表明,本法测定大鼠血汞暴露量的专属性良好,内源性物质对测定无干扰;低、中和高

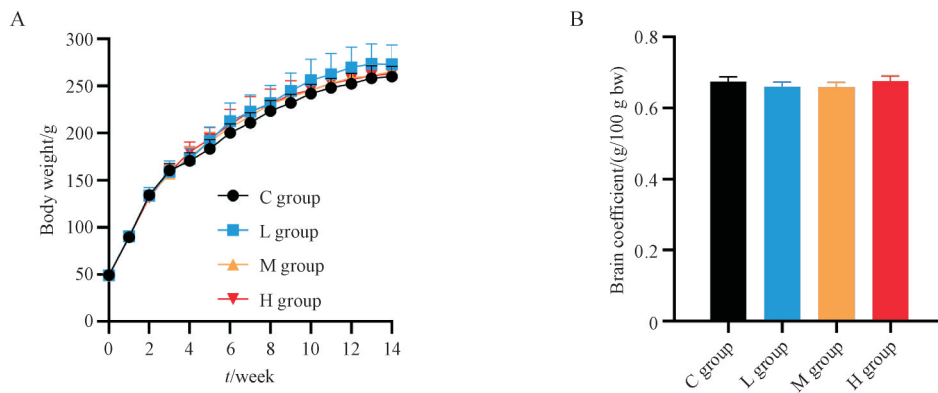


Figure 1 Effect of Cinnabaris on rats' body weights and brain coefficients ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: Mean growth curves of rats in 4 groups; B: Mean brain coefficients of rats in 4 groups; C group: 0.5%CMC-Na; L group: 50 mg/kg Cinnabaris; M group: 250 mg/kg Cinnabaris; H group: 1 000 mg/kg Cinnabaris

浓度样品的批内和批间精密度良好(RSD均小于15%);加样回收率在91.68%~109.1%之间。全血样品在 -80°C 冰箱冰冻保存30 d,反复冻融3次,消解结束后室温放置2 d的稳定性均良好,适用于血汞暴露量的测定。

3.2.2 大鼠血汞暴露量测定结果 各组大鼠不同发育阶段的全血总汞浓度如图2所示。正常生理条件下,大鼠全血总汞质量浓度范围在10~30 ng/mL,且全血总汞浓度随周龄增加而上升^[12-13]。实验结果显示,随着给药时间延长,各剂量组大鼠血汞暴露量呈上升趋势,在给药10周内,血汞暴露量显著升高,继续给药2~4周,上升速度放缓,趋于平稳,呈现出时间依赖性。低、中、高剂量组大鼠给药后的血汞暴露量随朱砂剂量依次升高,并且均显著高于对照组($P < 0.001$),呈现出明显的剂量依赖性。

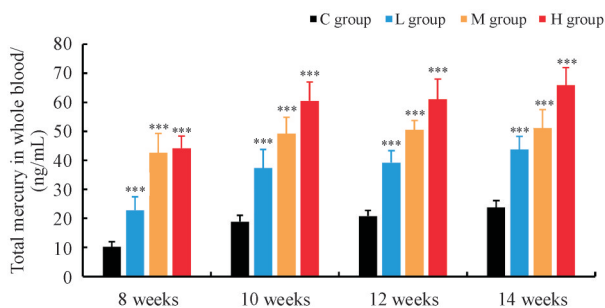


Figure 2 Total mercury concentration in the rats' whole blood samples at different growth phases ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

*** $P < 0.001$ vs C group

3.3 朱砂对幼年大鼠海马神经元形态结构的影响 各组大鼠海马CA1区、CA3区及DG区HE染

色结果如图3所示。对照组大鼠各区域海马锥体细胞排列整齐,层次清楚,锥体细胞核大而圆,核仁明显、数目多;朱砂低剂量组大鼠仅CA3区锥体细胞出现轻微核固缩;中剂量组大鼠海马DG区未见明显病变,CA1区、CA3区均出现不同程度的锥体细胞核固缩,CA3区较为严重,且锥体细胞形态不规则;高剂量组大鼠DG区同样未见明显病变,CA1区、CA3区锥体细胞核固缩程度较重、细胞形态不规则,且CA3区出现锥体细胞排列紊乱的病理改变。

3.4 朱砂对幼年大鼠记忆功能的影响

如图4所示,灌胃给予朱砂14周后,与对照组比较,低、中、高剂量组大鼠平台停留时间略有缩短,平台穿越次数减少,但无显著差异;平台潜伏期与目标象限潜伏期随朱砂给药剂量升高而延长,相较于对照组,中剂量组大鼠平台潜伏期有显著差异($P < 0.05$),高剂量组大鼠平台潜伏期与目标象限潜伏期均有显著差异($P < 0.05$);目标象限停留时间与目标象限停留总时间则随朱砂给药剂量升高而缩短,相较于对照组,中、高剂量组大鼠均有显著差异($P < 0.05$)。长期给予高剂量朱砂可导致大鼠记忆功能受损,剂量越高,对记忆功能的影响越大。

3.5 朱砂与记忆功能障碍的剂量-血汞暴露量-毒性效应相关性分析

对给药剂量和不同发育阶段各组大鼠的血汞暴露量进行Spearman相关性分析;对各发育阶段血汞暴露量与水迷宫实验指标进行Pearson相关性分析,结果如图5所示。结果表明,给药8~14周,

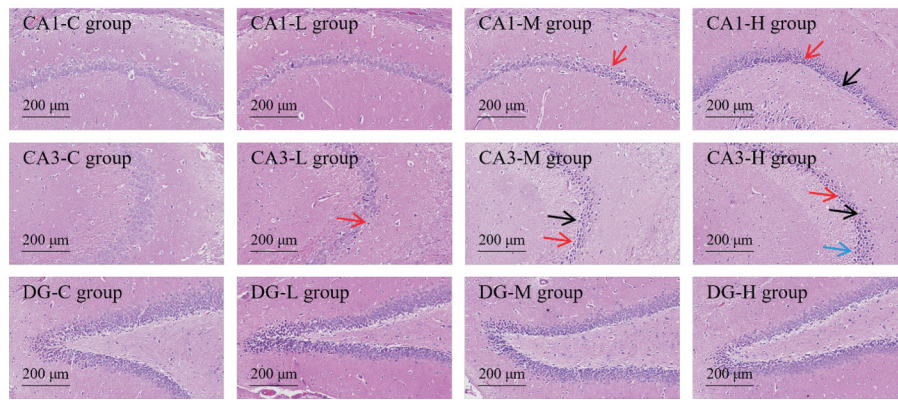


Figure 3 Effects of Cinnabaris on rats' morphological features of hippocampal pyramidal neurons by HE staining ($\times 200$)
 → represents the pyknotic pyramidal neurons; → represents the pyramidal neurons with irregular cell morphology; → represents the pyramidal cells arranged in disorder

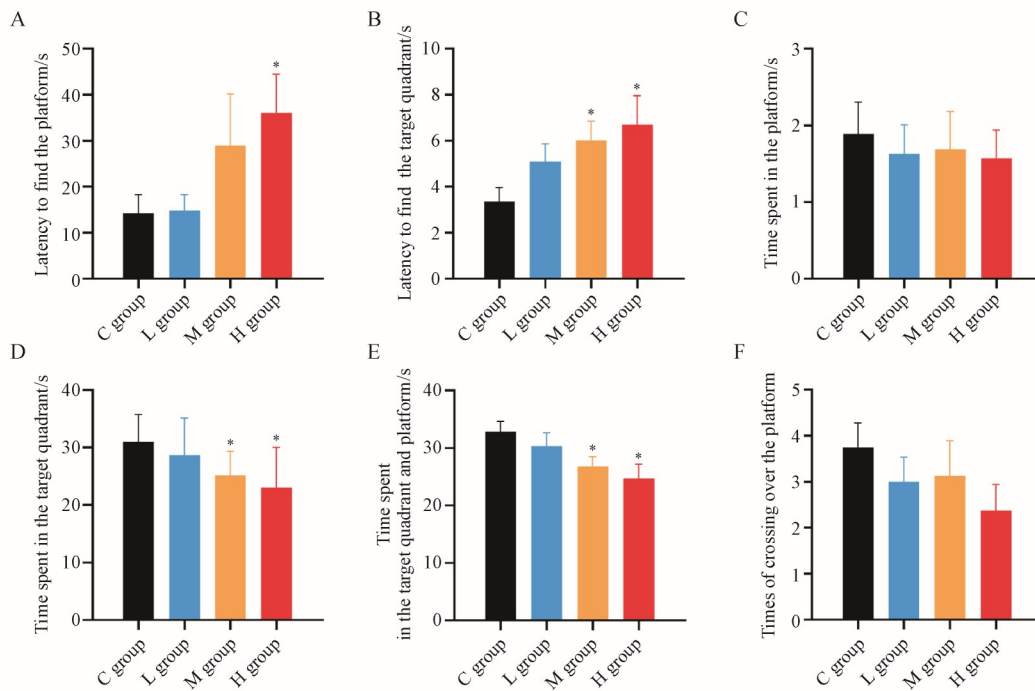


Figure 4 Effects of Cinnabaris on rats' memory functions ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
 A: Latency to find the platform; B: Latency to find the target quadrant; C: Time spent in the platform; D: Time spent in the target quadrant; E: Time spent in the platform and target quadrant; F: Times of crossing over the platform
 * $P < 0.05$ vs C group

大鼠血汞暴露量与朱砂剂量的 Spearman 相关系数分别为 0.87、0.94、0.95 和 0.93, 呈现极强的正相关 ($r > 0.87, P < 0.01$)。目标象限潜伏期与给药 8 周、12 周、14 周的血汞暴露量呈现弱到中等程度的正相关 ($0.36 < r < 0.43, P < 0.05$); 平台穿越次数与给药 14 周的血汞暴露量呈现弱的负相关 ($r = -0.38, P < 0.05$); 目标象限停留时间与目标象限停留总时间与各发育阶段的血汞暴露量呈现中等到强的负相关 ($-0.71 < r < -0.44, P < 0.05$), 且相关

程度随发育时间延长而增强。

4 讨论

由于朱砂含有大量重金属汞, 其临床使用安全性备受关注。欧美等国家和地区对含朱砂中药按化学药品重金属杂质进行严格的总汞量控制, 并警告公众警惕其质量不合格以及潜在的毒性风险^[14-15]。但是从化学角度分析, 朱砂属于共价化合物, 极难溶于水, 不易被人体吸收, 用总汞量评价

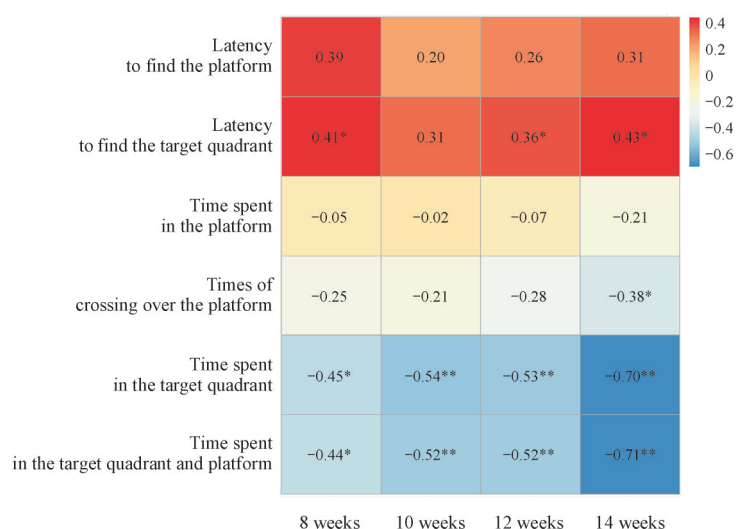


Figure 5 Heatmap of Pearson correlation coefficients between *in-vivo* mercury exposure at different growth phases and evaluation indicators of Morris water-maze test ($n = 8$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

朱砂难免会高估其健康风险。本组前期朱砂体外溶出研究表明,在模拟胃肠液中朱砂的生物可利用汞含量仅为 $0.12 \mu\text{g/g}$ ^[16],在医生指导下使用,相对安全。但简单的体外实验不能完全模拟复杂的体内过程,因此以体内汞暴露量评估朱砂的汞中毒风险更为科学合理。由于体内过高的汞暴露会严重损伤儿童的记忆功能,而朱砂引起的儿童汞暴露风险评估却鲜有报道,《中华人民共和国药典》对含朱砂儿童专用制剂也缺乏明确的安全限量。因此本实验以幼年大鼠为对象,围绕给予朱砂后体内汞暴露量与记忆功能损伤展开研究,为含朱砂儿童专用制剂的合理使用提供科学指导。

为了监测给予朱砂后大鼠体内汞暴露水平,需要选择准确可靠,容易获得的生物样本进行检测。常用于评价机体汞暴露水平的生物样本有血液、尿液和毛发^[17]。本组前期研究显示,成年大鼠灌胃朱砂后,极少量的汞能被吸收进入血液,并分布至脑、肝、肾等组织中,并且脑组织中的汞含量随血汞暴露量上升而增加^[10]。此外,血样可及性高、易采集,本研究选择血液作为生物样本,用于评估大鼠体内的汞暴露水平。血液中95%左右的巯基存在于红细胞,由于 Hg^{2+} 对巯基有高度的亲和力,可迅速结合红细胞,同时又可与血浆蛋白结合,选择全血作为研究汞在血液中动态变化规律的检测对象,使得汞暴露水平监测更加准确可靠。血汞暴露量检测结果表明,大鼠血汞暴露量呈时

间和剂量依赖式增高。前期研究表明,全血与脑组织中汞均表现出消除缓慢的特征^[10],因此在多次给予高剂量朱砂后,汞极易在脑中蓄积,极大地增加了朱砂对中枢神经系统的健康风险。

海马是大脑组织中负责记忆的关键区域,根据神经元形态与排布关系,海马通常被分为CA1、CA2、CA3和DG区。海马神经元从内嗅区发起,沿穿缘通路投射于齿状回(dentate gyrus, DG)颗粒细胞与CA1区锥体细胞;DG区颗粒细胞再通过苔状纤维通路投射于CA3区锥体细胞;最后由CA3区锥体细胞发出轴突,通过Schaffer通路投射至CA1区锥体细胞,由此构成了海马的三突触回路。三突触回路是记忆形成的结构基础,其中任何环节突触联系的损伤都会影响记忆功能。因此,本研究重点考察了各组大鼠海马HE染色中CA1区、CA3区与DG区神经元的形态变化,以评价朱砂对记忆功能相关组织结构的影响。病理检查结果表明,朱砂对DG区颗粒细胞形态影响较小;而随着朱砂剂量增高,低剂量组大鼠脑组织CA3区锥体细胞出现轻微核固缩,中、高剂量组大鼠脑组织CA1区与CA3区锥体细胞的病变程度依次加重,呈现剂量依赖性,且CA3区较CA1区更为严重。海马组织各区域病变程度的不同可能与神经元类型对汞暴露的敏感程度及组织内汞局部暴露浓度差异有关。

Morris水迷宫实验广泛应用于评价动物的空

间学习记忆功能。结果表明,朱砂低剂量组大鼠在水迷宫实验中与对照组大鼠无明显差异,而朱砂中、高剂量组大鼠的平台与目标象限潜伏期依次延长,平台与目标象限停留时间依次缩短,且多数指标与对照组大鼠有显著差异,并呈现剂量依赖性。HE染色与Morris水迷宫实验的结果,分别从组织结构与记忆功能的角度,共同验证了长期高剂量的朱砂摄入能够引起记忆功能障碍的结论。

对朱砂和记忆功能障碍之间的剂量-血汞暴露量-毒性效应关系进行相关性分析,结果表明,朱砂剂量与各个发育阶段的血汞暴露量之间均存在极强的正相关性,而血汞暴露量与水迷宫实验中的4个指标都存在显著的相关性。由此可以证明,体内过高的汞暴露是朱砂引起记忆功能障碍的主要危险因素,且记忆功能障碍程度与朱砂呈现出剂量-血汞暴露量-毒性效应依赖式增加。

综上所述,幼年大鼠长期超剂量给予朱砂后,体内汞暴露水平增高,血液中的汞能透过血脑屏障侵入脑组织,破坏海马组织正常形态结构,影响记忆功能。因此,在含朱砂儿科制剂的临床使用过程中,应防止超剂量长时间服用,以避免朱砂中汞对儿童大脑记忆功能的损害。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia: part 1* (中华人民共和国药典:一部)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [2] Yang LX, Zhang YY, Wang FF, et al. Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*[J]. 2020, **245**: 125586.
- [3] Zhao MJ. Analysis of clinical characteristics and risk factors of adverse reactions induced by Chinese herbal pieces for tranquilization[J]. *Clin Res Pract* (临床医学研究与实践), 2020, **5** (21): 24-26.
- [4] Chen XX. Analysis of reasons for adverse reactions of sedative Chinese medicine decoction pieces and the countermeasures for rational use of drugs[J]. *Clin Res Pract* (临床医学研究与实践), 2018, **3**(35): 139-140.
- [5] Pan Y. Analysis on the reasonable application and clinical safety of cinnabar[J]. *Chin Med Mod Distance Educ China* (中国中医药现代远程教育), 2018, **16**(14): 56-58.
- [6] Lohren H, Blagojevic L, Fitkau R, et al. Toxicity of organic and inorganic mercury species in differentiated human neurons and human astrocytes[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2015, **32**: 200-208.
- [7] Sulaiman R, Wang M, Ren X. Exposure to aluminum, cadmium, and mercury and autism spectrum disorder in children: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, **33**(11): 2699-2718.
- [8] Ganguly J, Kulshreshtha D, Jog M. Mercury and movement disorders: the toxic legacy continues[J]. *Can J Neurol Sci*, 2022, **49** (4): 493-501.
- [9] Weihe P, Debes F, White RF, et al. Environmental epidemiology research leads to a decrease of the exposure limit for mercury [J]. *Ugeskr Laeger*, 2003, **165**(2): 107-111.
- [10] Lu YT, Qi WZ, Wang S, et al. Toxicity and risk assessment of mercury exposures from cinnabar and *Baizi Yangxin* Pills based on pharmacokinetic and tissue distribution studies[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, **250**: 112489.
- [11] Joo H, Lim MH, Ha M, et al. Secondhand smoke exposure and low blood lead levels in association with attention-deficit hyperactivity disorder and its symptom domain in children: a community-based case-control study[J]. *Nicotine Tob Res*, 2017, **19**(1): 94-101.
- [12] Liu BH, Yang MM, Ma NN, et al. Pharmacokinetics of mercury after oral single-dose of cinnabar and cinnabar-containing pediatric medication 'Yinianjin' in blood of juvenile rats[J]. *J Toxicol* (毒理学杂志), 2018, **32**(1): 7-10.
- [13] Liu BH, Li LD, Xie Q, et al. Neurobehavioral effects of cinnabar and the cinnabar-containing pediatric prescription, *Yi-Nian-Jin*, in juvenile rats[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2023, **76**: 127112.
- [14] U. S. Food and Drug Administration. Import Alert 66-10[R]. Washington D. C. :FDA, 2011.
- [15] Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. Arsenic and Mercury in Ayurvedic and Traditional Chinese Medicines[R]. London: MRHA, 2005.
- [16] Lu YT, Yang DY, Song XN, et al. Bioaccessibility and health risk assessment of mercury in cinnabar containing Traditional Chinese Medicines[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, **44**: 17-25.
- [17] Arain AL, Neitzel RL. A review of biomarkers used for assessing human exposure to metals from E-waste[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, **16**(10): 1802.