

药物非临床发育神经毒性研究的神经病理学评价策略

屈哲¹, 吕建军^{1*}, 林志¹, 霍桂桃¹, 杨艳伟¹, 张頔¹, 张硕¹, 霍艳¹, 耿兴超¹, 王雪¹, 李波² (1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心、药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京100050)

摘要: 神经病理学评价是药物非临床发育神经毒性评价的重要组成部分和金标准, 本文从发育神经毒性神经病理学评价的实验动物设计、优选的动物年龄、神经系统解剖和组织处理、以及病理结果的解释方面概述了标准化的发育神经毒性神经病理学评价原则和方法。介绍了药物非临床发育神经毒性研究神经病理学评价相关国际指导原则要求, 为减少我国和其它国家及地区间实验程序的差异, 为我国从事药物非临床发育神经毒性研究的病理学家提供一定参考。

关键词: 发育神经毒性; 神经病理学评价; 指导原则; 非临床; 药物

中图分类号: R96 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)05-0624-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.05.009

Neuropathological Evaluation Strategy for Nonclinical Developmental Neurotoxicity Study of Drugs

Qu Zhe¹, Lv Jianjun^{1*}, Lin Zhi¹, Huo Guitao¹, Yang Yanwei¹, Zhang Di¹, Zhang Shuo¹, Huo Yan¹, Geng Xingchao¹, Wang Xue¹, Li Bo² (1. Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: Neuropathological evaluation is an important part and the gold standard of the evaluation of nonclinical developmental neurotoxicity (DNT) study of drugs. This article summarized standardized neuropathological evaluation principles and methods of DNT from the following aspects: the design of experimental animals, the optimal age of experimental animals, the necropsy and tissue process for nervous system and interpretation of pathological data. The paper also introduced the requirements of relevant international guidelines for neuropathological evaluation of nonclinical DNT of drugs in order to reduce the differences in the experimental procedures between China and other countries and regions and to provide references for pathologists engaging in nonclinical DNT study in China.

Keywords: developmental neurotoxicity; neuropathological evaluation; guidelines; nonclinical; drug

基金项目: 十二五国家科技重大专项课题“符合中药特点的有毒中药安评关键技术”(编号 2015ZX09501004-002); 十二五国家科技重大专项课题“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(编号 2015ZX09501007-004)

作者简介: 屈哲, 副研究员, 从事临床前药物安全性评价毒性病理学诊断工作; Tel: (010) 67872233-8210, E-mail: quzhe@nifdc.org.cn

通信作者: 吕建军, 主任药师, 从事临床前药物安全性评价毒性病理学诊断工作; Tel: (010) 67872233-8005; E-mail: lujianjun@nifdc.org.cn

发育神经毒性 (developmental neurotoxicity, DNT) 是公认的外源性物质对婴幼儿和青少年产生的神经系统损害^[1]。发育神经毒性研究是对围产期动物的发育神经系统出现的功能和形态损伤的研究, 并提供这些毒副作用与化合物之间的剂量-反应特征。评价包括观察神经系统和行为异常, 包括身体发育、行为发育、运动活动、运动和感觉功能、学习和记忆的评估, 以及对后代发育和成年期的神经病理学评价。随着神经病理学家在实际工作中经验的积累以及相关指导原则的颁布, 总结出了许多实用方法^[2-4]。美国环保署 (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) 和经济合作与发展组织 (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) 颁布了DNT研究的监管指南。EPA预防、农药和有毒物质办公室 (The Office Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS) 指南OPPTS 870.6300和OECD检测426指南适用于DNT研究, 而最近OECD通过的关于扩展I段生殖毒性研究 (extended one-generation reproductive toxicity study, EOGRTS) 的指南EOGRTS 443也和这一主题相关。这3个指南中特别对神经组织的处理和神经病理学分析进行了详细的说明, 这种基于神经系统组织结构的评价方法被认为是DNT系列研究中最有价值的组成部分。以上神经病理学评价策略从整体上看具有很好的一致性, 而且这些指南对实验设备的要求较灵活^[2]。

目前, 关于DNT实验的3个指南还存在一些不足, 尤其在发育神经系统定量形态测定分析方面, 当进行DNT动物实验的同行评议时, 个人经验与指南的灵活应用仍存在差异和挑战。在DNT神经病理学分析中, 获得可靠的形态测定数据的主要困难在于是否能够制备高度一致性的脑切面, 是否能够在这些高度一致性的脑切面中进行重复定量测量脑特征。针对以上DNT神经病理学评价的影响因素, 本文阐述了发育神经组织病理学组织加工处理的最佳程序和方法、以及分析评价DNT神经病理学数据的策略和原理, 结合EPA和OECD等关于DNT实验的指导方针, 介绍了国内外有经验的神经病理学家对DNT研究数据和方法^[5-6], 包括DNT神经病理学评价的实验动物设计、优选动物年龄、神经系统的解剖和组织处理、以及病理结果的解释, 介绍了药物非临床发育神经毒性研究神经病理学评价相关国际指

导原则要求, 为减少我国和其它国家及地区间实验程序的差异, 为我国从事药物非临床发育神经毒性研究的病理学家提供参考。

1 DNT神经病理学评价的实验动物设计

常规DNT研究包括结构 (神经病理学) 评价和功能 (神经行为学) 评价。行为测试反应了动物处于富集环境时的情况, 评价质量可能存在个体差异。富集环境将增加大鼠脑组织暴露于神经毒剂时突触的密度, 但对测量区域的线性尺寸或体积的影响还不清楚^[7]。因此, 为了进行神经行为学和神经病理学检查, 应设计从不同的实验组中抽取动物, 避免因行为训练和测试提供的富集信息影响形态测量的区域结构。该策略在标准的DNT研究中很容易实施^[8], 但是, 不能在EOGRTS中采用, 因为后一设计要求相同的动物用于神经行为和神经病理学评价^[9]。

2 DNT神经病理学评价的优选动物年龄

EPA DNT公布的指南, 要求啮齿类动物DNT研究中的暴露期从妊娠7日 (gestational day, GD) 延伸到出生后11日 (postnatal day, PND)。然而, EPA农药计划办公室最终公布的EPA DNT指南, 将暴露时间延长到PND 21。OECD DNT 426和EOGRTS 443指南通过了EPA农药计划办公室的要求, 将暴露时间持续到PND 21。结果子代的DNT风险性评价的神经病理学评价通常发生在PND 22和大约PND 70。OECD EOGRTS 443指南中的具体要求是将成年动物神经病理学分析的阶段降为成年后的PND75至90之间。美国毒性病理学协会 (Society of Toxicologic Pathology, STP) 的“最佳操作”建议进行DNT神经病理学评价, 除非现有的信息认为需要选择不同的年龄, 否则PND 22是第一代动物神经病理学分析的最佳年龄, 特别是在收集线性形态测量数据时^[10], 因为PND 11的大鼠脑在尺寸上具有固有的较大的生物变异性^[11]。

3 DNT神经病理学评价神经系统的解剖和组织处理

在DNT研究中, 需要获得高度一致性的组织切面, 该组织处理程序与通常进行的哺乳类动物毒性研究标准操作规程 (standard operating procedure, SOP) 指南中的组织处理程序有显著不同。此外, 人为差异是由组织处理造成, 即在不同时间段处理不同剂量组石蜡块, 例如在一个时间点处理高剂量

组和对照组,之后再处理中剂量组和低剂量组,这几乎对组织病理学的定性评价没有影响,但是,可以影响定量形态测定评价,而导致所得的数据集不具备足够的质量。病理学家可通过关注DNT研究中特殊SOP的发展以及相关的文献内容,将这样的困难最小化,保证在相同条件下获取和处理所有剂量组的神经组织(特别是大脑),以相同的描述方式和培训,帮助组织技术员识别高度一致性脑切面所在的特定神经解剖学标志性部位。

保证获取高度一致性脑切面是最重要的环节,因此,负责脑组织切片和准备取材进行定量评估的工作人员必须接受足够的动物神经解剖学培训,以便能够识别预期进行形态测量的脑层级切面中的关键神经解剖区域。为此目的他们必须做到准确识别有限的结构,因此,需要个人学习区分特定的神经组织结构区域。

3.1 发育中啮齿类动物神经组织取材

Robert Garman^[12]博士提出了啮齿类动物发育神经毒性研究病理部分的实用性技巧。首先,在成年动物中通常可定性判断毒物引起细胞的变性和死亡,在慢性损伤中可伴有胶质细胞即星形胶质细胞和小胶质细胞的活化和/或增殖。相比之下,发育中脑的毒性损伤通常表现为细胞数目(异常区域大小)、位置(异位)和/或分化(例如有缺陷的髓鞘形成或突触形成)的异常。成熟之前中枢神经系统中发生退行性病变可以部分或完全修复,通常不引起炎症反应或神经胶质反应。因此,可以使用一系列组织学染色方法进行啮齿类动物的DNT研究,组织染色通常包括HE染色以及突出髓鞘完整性的染色,例如勒克司坚牢蓝染色(Luxol Fast Blue, LFB),也可使用用于寻找神经元极性改变过程的银染色。通常用于评价成年动物神经毒性作用的其它染色剂还有用于显示神经元坏死,显示神经胶质反应的细胞特异性标志物,例如胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)用于标记星形胶质细胞,小胶质细胞的离子化钙结合分子1,都可在不同的DNT研究中应用。

其次,在没有定性发现的情况下,简单的形态测量(例如线性或面积维度)的定量改变也提示存在神经毒性^[10,13]。如果有多个检测终点同时受到影响,那么结果更可信^[14]。有效的形态测量评价的根本前提是所有动物的切片必须高度一致,这

要求技术人员能够确定包埋组织或未染色切片的关键神经解剖结构。测量方法的选择取决于诸如监管指南、尺寸的生物相关性、测量捕获的可靠性以及病理学家和良好评价程序等因素。尽管与简单的形态测量相比,体视学计数是潜在的更加敏感的DNT评价参数,但选择的神经细胞群的体视学计数不适用于常规DNT筛选研究,因为它们需要更多的时间来收集,且不能检测出常见的DNT非细胞指数的改变,如白质髓鞘缺陷、突触数目减少和/或树突状分支减少等^[13-15]。

3.2 成年啮齿类动物和非啮齿类动物神经组织取材

虽然啮齿类动物和非啮齿类哺乳动物之间的结构和功能存在明显差异,但对所有实验动物应该常规选择相同的神经解剖学部位进行病理学检查。美国国家毒理学计划(National Toxicology Program, NTP)首次采用的改进方法中的说明,适合一般毒性研究中神经病理学分析的神经组织取样程序是修取7个啮齿类动物冠状脑切面^[16]。传统的啮齿类动物脑取样仅选用了3个冠状切面^[17],NTP 7个切面法包括易受毒性影响的关键神经解剖区域如尾部下丘,与神经退行性病变相关的区域如帕金森病的黑质,以及与神经行为学、神经化学和神经生理学终点相关的区域。总之,7个切面包括代表了啮齿类动物脑中认知、学习和记忆、运动、感觉、成瘾、抑郁和内稳态神经元电路的约50个特定神经解剖区域^[18]。在一般毒性筛选中常规使用NTP的7个切面取样法的基础上扩大取样将减少遗漏微小变化甚至主要病变的可能性,特别是常规的修块方案中没有的部位(例如尾部下丘^[19])。

非哺乳类动物(狗,非人类灵长类动物)的常规显微镜评价通常评价1个半球即半切片的冠状定位的6个样本。单边评价是因为双边结构通常对潜在的神经毒物表现出相同的敏感性。当然,如果条件允许应该检查双侧大脑。除了相对于啮齿类动物较小的非啮齿类动物嗅球区域,要评价的非啮齿类动物脑区域应包括啮齿类动物中评价的所有主要结构/区域^[20]。一般来说,在啮齿类动物毒性研究中常规的神经病理学检查应当包含嗅球,因为在这些物种中嗅觉是重要的部位,发生嗅觉的区域由占脑重量7%的脑实质^[21]。尽管如此,关于是否评价嗅球应由委托方自行决定。

除了脑取样外,神经毒性的综合分析还需要

对其它的神经器官如脊髓颈部、胸部和腰椎节段,背根神经节特别是与主要的神经干相关的脊髓和神经(至少包括坐骨神经干)进行取样^[18]。更加优选的实验方案还需对额外的躯体神经取样以达到不同的目的,这取决于物种,例如腓肠神经在非人灵长类动物和人中仅携带感觉纤维,但在啮齿类动物中含有运动和感觉纤维。尽管本质上是非系统性的,但是自主神经节和神经通常可以在其他器官和组织内进行评价。

许多兽医神经解剖学和兽医神经病学专著中提供了将生命功能与特定大脑区域相关联的描述和直观表示^[22]。以类似的方式,有注释的神经解剖学图谱可用于多动物种属非临床毒性研究的神经病理学中定位需要评价的脑区域。最近的文章中已经定义了应该在一系列脑切面中评价的主要神经解剖区域即啮齿类动物的7个冠状切面和非啮齿类动物的6个冠状半切面。脊髓的结构/功能相关性也已经被界定。参与非临床研究神经病理学分析的病理学家也应该了解跨物种数据转化的一些资料。将来,那些通过常规组织病理学评价的病变也可通过非侵入性或微创方法进行补充。在非临床研究中,采用的主要方式包括无创成像平台,如磁共振显微镜(magnetic resonance microscopy, MRM),正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)或超声生物显微镜(ultrasound biomicroscopy, UBM)。非临床神经毒性评价中,额外的成像可能使我们在脑修块之前和/或更长研究(PET, UBM)中通过体内逐渐跟踪发现脆弱细胞群中的微小损伤。另外,数字化成像可以自动定量采集线性、面积或体积数据,但将这些信息用于评价人类的风险性以及将这样的成像技术广泛的推广到转化神经科学中还需要经过仔细的验证。随着时间的推移,开发微创技术用于获取中枢神经系统的少量液体样本或组织样本用于检测新的神经毒性核酸或蛋白质生物标志物十分重要。目前,常规使用的神经标本不能用于预测转化分子生物标志物^[23-24]。

3.3 DNT神经病理学分析的最佳固定程序

根据动物的年龄,推荐不同的最佳固定方法用于神经系统的保存。EPA和OECD指南要求对成年动物进行全身灌注固定。EPA DNT指南建议通过浸入固定保存PND 11的神经系统,而OECD DNT

426和EOGRS 433指南允许通过浸入或灌注固定。STP的“最佳操作”建议DNT神经病理学评价在PND 22和PND 70进行灌注固定,以最佳保存神经系统,并减少解剖和固定过程中破坏细胞特征的人为假象的出现,或增加脑尺寸的个体间变异性。

主要通过定性手段(即组织病理学)而不是定量手段(例如线性形态测定分析)分析PND 11脑时,采用浸入式固定可以很好的保持脑的解剖结构。因为,PND 11大脑较小且无髓鞘,因此,浸入到标准的固定剂中可有效穿透脑组织。PND 11幼犬可以采用灌注固定,但输注压力必须严格控制并保持在收缩血压约100mmHg的较低范围,以防止软脑组织的血管破裂和人为扭曲^[6,10]。

3.4 神经组织的包埋和切片

OECD关于DNT和EOGRS实验指南中要求,为了准确的进行形态测定分析,所有剂量水平的脑组织应该同时包埋入合适的介质中,以避免出现因固定剂的长期储存产生的皱缩假象。EPA DNT指南规定中枢神经系统(central nervous system, CNS)和周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)的组织应分别被包埋入石蜡和塑料中。在DNT研究中,PNS(包括背根神经节)和脊髓的系统分析通常集中在评价成年动物(PND 70)的结构。

选择用于包埋PNS的塑料需要平衡组织分辨率和实用性。选择硬塑料如环氧树脂可以很好的提高轴突和髓鞘特征的分辨率,尤其通过饿后固定还能增强这样的效果,这是详细评价髓磷脂结构所必不可少的技术,难点是硬塑料难以切片,限制了每只动物处理和评价的样本数量,通常为1或2个神经和每个脊髓段颈部,胸部和腰部各1个背根神经节。使用易于切片的软塑料如甲基丙烯酸酯可以在单个块内评价更多数量的背根神经节和脊神经,但不能像在单个石蜡块中那样包埋许多组织。有经验的病理学家认为在没有饿增强的情况下,嵌入软塑料中的PNS(神经/神经节)特征的分辨率相对于石蜡包埋没有明显改善。饿后固定并包埋在树脂/硬塑料中的神经横截面确实比石蜡包埋组织有本质性的改善。如果因为费用等原因不能开展树脂包埋,则需要横截面检查的神经样品可能被渗透并包埋在石蜡中。由于神经纤维的重叠,进行纵切面评价的神经样本通常不会被渗透,并且由饿后固定产生的黑色髓鞘掩盖了许多细胞结构特征。

对于CNS和PNS组织,需要权衡所有剂量组样本包埋处理时所涉及的所有方面。因此,实际中,每一个组织处理周期应包括来自每个剂量组的随机选择的包埋盒,而不局限于一个剂量组的包埋盒,例如不能将所有对照组的脑组织在一个周期中处理,而高剂量组的脑组织放在另一个周期处理。该策略将确保即使发生组织处理误差,也不会产生系统的偏差。

导致人为差异的另一个程序因素与组织学技术人员操作的一致性有关。理想的做法是让一个组织学技术人员包埋和切片指定脑平面的所有脑块。这个策略将大大减少部分切面上的差异,从而提高切面之间的一致性程度。然而即使接受相同SOP培训的个人也会发生微小的差异。如果在单次研究中有许多人参与制备脑切面,那么技术人员可能被分配专门处理一个性别脑块的工作,因为神经病理学发现中的性别差异通常比风险性评价中的剂量依赖性差异更小。类似,如果需要进行性别之间的脑比较,那么由同一技术人员同时处理雄性和雌性的指定脑平面的脑块,以确保组织处理条件的等效性^[25]。

啮齿类动物DNT研究中对所有剂量组的脑组织处理环节应一直持续到切片保存在载玻片上。经过一段时间,诸如技术人员或其它实验因素如更换新的切片机,切片机叶片的角度变化,波动的水浴条件等都可能发生变化,而这些因素中的任何变化都可能造成早期处理的组织(对照和高剂量组)和后期处理的组织(中、低剂量组)之间出现形态测量的偏差。但分析之前同时处理4个剂量组脑组织的缺点是切片的成本可能会增加。例如当监管机构要求对中、低剂量组进行形态测量时可能已经是完成对照组和高剂量组评价之后的两年了,在此期间实验室工作人员、设备和程序都可能发生变化。

进一步考虑在前期就对所有剂量组同时进行定量形态测量分析的原因包括以下情况:(1)在DNT或EOGRTS研究中,已经获得了行为异常的证据;(2)在先前相同类型受试物的研究中,已经发现行为异常或神经病理学损伤的证据;(3)在低剂量水平下检测到最低可见的副反应水平可能影响风险性评价。即使病理学家将测量中的数值差异归因于高剂量组和对照组之间的延迟处理,或认为这些差异并无统计学意义,那么如果有DNT实验或其它研究表明存在供试品引起的CNS效应的

证据,则监管机构还是可能要求评价低剂量组和中剂量组。

4 DNT神经病理学评价结果的解释

在多数成年动物神经毒性研究中,病理学分析的重点是检测细胞变性的存在如神经元坏死及其反应如星形胶质细胞或小胶质细胞反应,轴突反应如分裂或肿胀/球体形成、炎症和/或脱髓鞘。然而,在DNT研究中,未成熟的神经系统通常很少表现出急性神经元坏死的迹象,而是仅产生最小的胶质细胞反应。因此,进行DNT研究的病理学家将需要着重解释可能影响指定脑区域内程序性细胞死亡、细胞迁移、总细胞数量和末端细胞分化的先前事件的结果。一般来说,DNT研究中更加典型的脑损伤通常包括改变区域轮廓或大小(反映细胞数量的变化)、神经元异位(由于异常或不完整迁移)和/或受损的髓鞘形成(与延迟发育或少突胶质细胞生理学畸变相关)。通常,这些变化来自先前的损伤,之后是一定程度的代偿性修复^[26]。暴露于潜在神经毒物后,发育中的动物神经系统存在一个或多个结构性病变,说明可能存在DNT风险。想要对具有潜在DNT倾向的研究得出确切的结论必须依靠综合策略即“证据权重”,脑、脊髓或周围神经的解剖学损伤代表了一部分分析结果。创建一个决策树将明确的、可能的和模糊的发育神经毒性证据进行分类,这是病理学家和毒理学家在解释DNT神经病理学评价中所观察到的任何结构变化的重要工具^[13]。一些机构进一步强调这种综合分析方法,列出清单指出可能存在DNT风险的各种变化类别。使用这样的决策树和工作表简化了评价实验数据集中与供试品相关发现的潜在生物相关性,同时加强了DNT风险评价决策需要灵活的证据权重策略,而不是理论上应用潜在的任意标准,例如单次线性形态测量中剂量组之间统计学上具有显著的5%的差异。一般来说,作者认为潜在DNT的明确证据或者是通过快速定性评价识别药物引起的明显的神经解剖学病变,或者通过形态测量以及可证实的神经行为功能障碍识别药物引起的异常。重要的是影响形态测量必然涉及更复杂的模式,而非仅在一个时间点观察到单一的显著不同。相反,作者确定DNT效应的剂量依赖性形态学改变的模式包括一次或多次测量中存在的畸变:(1)在PND 22和PND 70都对动物产生影响,尤其对成年动物影响更大时;

(2) 或者改变发生于PND 70的两种性别中。

5 结论及展望

过去的三十年,病理学家和监管机构应用标准的DNT研究方法对发育中的大脑、脊髓和周围神经系统进行神经毒性风险性评价,结合“最佳操作”进行神经病理学评价使得机构和地区之间的做法趋于一致^[6,10-11]。然而,仍然存在一些技术限制和未解答的问题。本文通过总结指导原则以及神经病理学家的实际经验旨在解决DNT神经病理学评价中相关的一些争议问题,以实现更标准化的DNT研究。

为了进一步改进DNT神经病理学评价,还需要在以下几个领域展开进一步探讨。第一,目前采用的先处理对照组和高剂量组,再处理中、低剂量组的做法与早期同时处理所有剂量组的做法相比,势必会引起更大的偏差及更多的假阳性结果。第二,使用相同的切片比较几个病理学家之间多种测量的可重复性,以进一步完善用于风险性评价的最佳线性形态测量方法。第三,将非侵入性成像方法作为研究手段以替代常规的形态测量方法。最后,当我们试图对潜在的DNT作出评价时,多个DNT神经病理学数据与相应的神经行为学数据的综合分析可以为病理学家和毒理学家解释解剖损伤和行为异常之间的相关性提供更多的证据。总之,病理学家的全程参与和努力对成功完成DNT风险性评价至关重要。

参考文献:

- [1] Bearer CF. Developmental Neurotoxicity: Illustration of Principles[J]. *Pediatr Clin North Am*, 2001, 48 (5): 1199-1213.
- [2] Makris SL, Raffaele K, Allen S, et al. A retrospective Performance Assessment of the Developmental Neurotoxicity Study in Support of OECD Test Guideline 426[J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117 (1): 17-25.
- [3] Raffaele KC, Rowland J, May B, et al. The Use of Developmental Neurotoxicity Data in Pesticide Risk Assessments[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, 32 (5): 563-572.
- [4] Tsuji R, and Crofton KM. Developmental Neurotoxicity Guideline Study: Issues With Methodology, Evaluation and Regulation[J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2012, 52 (3): 122-128.
- [5] Bolon B, Bradley A, Butt M, et al. Compilation of International Regulatory Guidance Documents for Neuropathology Assessment During Nonclinical General Toxicity and Specialized Neurotoxicity Studies[J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39 (1): 92-96.
- [6] Kaufmann W. Pathology Methods in Nonclinical Neurotoxicity Studies: The Developing Nervous System. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* (B. Bolon and M. Butt, eds.)[M]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011: 339-363.
- [7] Anderson BJ. Plasticity of Gray Matter Volume: The Cellular and Synaptic Plasticity that Underlies Volumetric Change[J]. *Dev Psychobiol*, 2011, 53 (5): 456-465.
- [8] OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (Test No. 426) Developmental Neurotoxicity Study[EB/OL]. (2007-01-01) [2017-03-30]. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-426-developmental-neurotoxicity-study_9789264067394-en.
- [9] OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (Test No. 443) Extended One-generation Reproductive Toxicity Study[EB/OL]. (2012-01-01) [2017-03-30]. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/testno-443-extended-one-generation-reproductive-toxicity-study_9789264185371-en;jsessionid%2f1knsxwv043m.x-oecd-live-02.
- [10] Bolon B, Garman R, Jensen K, et al. A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing—for today[J]. *Toxicol Pathol*, 2006, 34 (3): 296-313.
- [11] Garman RH, Fix AS, Jortner BS, et al. Methods to Identify and Characterize Developmental Neurotoxicity for Human Health Risk Assessment II: Neuropathology[J]. *Environ Health Perspect*, 2001, 109 (2): 93-100.
- [12] Alok K, Sharma, James P. et al. Toxicologic Pathology Analysis for Translational Neuroscience: Improving Human Risk Assessment Using Optimized Animal Data[J]. *International Journal of Toxicology*, 2016, 35 (4): 410-419.
- [13] Garman RH, Li AA, Kaufmann W, et al. Recommended Methods for Brain Processing and Quantitative Analysis in Rodent Developmental Neurotoxicity Studies[J]. *Toxicol*

- Pathol, 2016, 44 (1) : 14-42.
- [14] Duffell SJ, Soames AR, Gunby S. Morphometric Analysis of the Developing Rat Brain[J]. Toxicol Pathol, 2000, 28 (1) : 157-163.
- [15] Powell KA, Wilson D. 3-Dimensional Imaging Modalities for Phenotyping Genetically Engineered Mice[J]. Vet Pathol, 2012, 49 (1) : 106-115.
- [16] Rao DB, Little PB, Malarkey DE, et al. Histopathological Evaluation of the Nervous System in National Toxicology Program Rodent Studies: A Modified Approach[J]. Toxicol Pathol, 2011, 39 (3) : 463-470.
- [17] Morawietz G, Ruehlfehlert C, Kittel B, et al. Revised Guides for Organ Sampling and Trimming in Rats and Mice—Part 3. A joint Publication of the RITA and NACAD Groups[J]. Exp Toxicol Pathol, 2004, 55 (6) : 433-449.
- [18] Rao DB, Little PB, Sills RC. Subsite Awareness in Neuropathology Evaluation of National Toxicology Program (NTP) Studies: A Review of Select Neuroanatomical Structures with Their Functional Significance in Rodents[J]. Toxicol Pathol, 2014, 42 (3) : 487-509.
- [19] Morgan DL, Little PB, Herr DW, et al. Neurotoxicity of Carbonyl Sulfide in F344 Rats Following Inhalation Exposure for up to 12 Weeks[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 200 (2) : 131-145.
- [20] Pardo ID, Garman RH, Weber K, et al. Technical Guide for Nervous System Sampling of the Cynomolgus Monkey for General Toxicity Studies[J]. Toxicol Pathol, 2012, 40 (4) : 624-636.
- [21] Bolon B, Garman RH, Pardo ID, et al. STP Position Paper: Recommended Practices for Sampling and Processing the Nervous System (Brain, Spinal Cord, Nerve, and Eye) during Nonclinical General Toxicity Studies[J]. Toxicol Pathol, 2013, 41 (7) : 1028-1048.
- [22] Summers BA, Cummings JF, DeLahunta A. Principles of Neuropathology: Veterinary Neuropathology[M]. St Louis, MO: Mosby, 1995: 3-50.
- [23] Bolon B, Bradley A, Garman R, et al. Useful Toxicologic Neuropathology References for Pathologists and Toxicologists[J]. Toxicol Pathol, 2011, 39 (1) : 234-239.
- [24] Bolon B, Butt M. Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques[M]. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2011: 513-514.
- [25] Maurissen, J. Practical Considerations on the Design, Execution and Analysis of Developmental Neurotoxicity Studies to be Published in Neurotoxicology and Teratology[J]. Neurotoxicol Teratol, 2010, 32 (2) : 121-123.
- [26] Kaufmann W, and Groters S. Developmental Neuropathology in DNT-Studies—A Sensitive Tool for the Detection and Characterization of Developmental Neurotoxicants[J]. Reprod Toxicol, 2006, 22 (2) : 196-213.

(收稿日期 2017年4月5日 编辑 范玉明)