

纳米材料的神经毒性作用机制及评价方法

杨颖^{1,2}, 王雪^{2*}, 文海若^{2*}, 耿兴超² (1. 中国药科大学, 南京 210009; 2. 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)

摘要: 近年来, 纳米材料在多种生物医学领域被广泛应用, 其生物安全性也受到越来越多的关注。多种纳米材料可穿透血脑屏障进入中枢神经系统, 产生神经毒性。本文讨论了纳米材料进入中枢神经系统的方式及因素; 纳米材料的特异性以及非特异性的中枢神经毒性效应、外周神经毒性及其作用机制; 并论述了国内外用于体内神经毒性、体外神经细胞培养模型的神经毒性以及替代的评价方法, 为纳米材料的安全性评价及神经毒性探究提供参考。

关键词: 纳米材料; 中枢神经毒性; 外周神经毒性; 神经细胞培养模型; 神经毒性替代评价方法

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)09-1061-10

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.09.012

Mechanisms of Actions and Evaluation Methods of Neurotoxicity Induced by Nanomaterials

Yang Ying^{1,2}, Wang Xue^{2*}, Wen Hairuo^{2*}, Geng Xingchao² (1. Chinese Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Safety Evaluation, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China)

Abstract: In recent years, nanomaterials have been widely used in a variety of biomedical fields, and their biosafety has received much attention. Many types of nanomaterials are able to penetrate the blood-brain barrier and enter the central nervous system, resulting in neurotoxicity. The article discusses the ways and influencing factors of nanomaterials entering the central nervous system; The specific and non-specific central neurotoxicity, peripheral neurotoxicity and the mechanisms of nanomaterials are also discussed. The neurotoxicity and alternative evaluation methods used in vivo neurotoxicity and *in vitro* neurocell culture models at home and abroad are discussed, which provide references for safety evaluation and neurotoxicity research of nanomaterials.

Keywords: nanomaterials; central neurotoxicity; peripheral neurotoxicity; neural cell culture models; alternative evaluation methods for neurotoxicity

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(编号 2018ZX09201017-001)

作者简介: 杨颖 E-mail: 271058540@qq.com

通信作者: 文海若 E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

王雪 E-mail: xue_wang@nifdc.org.cn

神经毒性指通过干预神经传导影响中枢或外周神经系统正常功能产生的毒性作用^[1]。因神经系统的可再生性差,缺乏有效防御机制,且对微环境变化较为敏感,暴露于毒性物质后易产生不可逆的损害,严重时可能影响学习、记忆、认知,以及感觉功能^[2]。正常情况下,只有亲脂性物质和小分子化合物可通过血脑屏障。纳米材料(通常为三维空间尺度至少一维不超过100 nm的颗粒)虽然为非脂溶性,但可通过氧化应激反应,导致内皮细胞的细胞膜发生通透性的改变,从而影响到细胞间的紧密连接。纳米颗粒的结构特性使其可通过受体介导的血脑屏障内吞、吸附于血脑屏障后胞吞等特殊途径透过血脑屏障并进入中枢神经系统^[3]。

近年来,纳米材料的应用范围逐渐从工业制造转向食品、化妆品、药品和医疗器械等与人群日常生活更为密切的领域,其生物安全性,尤其是神经毒性风险已成为纳米材料安全性评价与监管的重要关注点。本文就纳米材料如何进入神经系统及其作用方式,对中枢神经系统的非特异性和特异性毒性及作用机制、外周神经系统作用机制,以及体内体外相关评价方法进行综述,为纳米材料的安全性评价及神经毒性探究提供参考。

1 纳米材料进入神经系统的方式

纳米材料主要通过以下三种途径进入脑组织:1)经循环系统进入血脑屏障。血脑屏障是循环系统与大脑之间的重要屏障,对维持循环系统与大脑之间的平衡环境起到至关重要的作用。纳米材料可通过体循环进入血液-淋巴循环系统,通过损伤血脑屏障构成细胞,导致血脑屏障通透性、完整性的改变,从而穿透血脑屏障^[4]。2)经嗅球摄取。纳米材料经吸入暴露后沉积于鼻腔黏膜,并经嗅粘膜上皮摄取转运至嗅球组织,从而绕过血脑屏障入脑^[5];Oberdorster等^[6]研究发现,当¹³C纳米颗粒以吸入的方式进入呼吸道后,可以直接到达嗅球,并沿着嗅神经的轴突进入到中枢神经系统。3)经感觉末梢神经转运。由三叉神经发出的感觉神经末梢贯穿于鼻腔黏膜及嗅黏膜。纳米材料经吸入沉积于鼻腔后,可直接经感觉末梢神经转运入脑。李晓波^[7]研究发现当经鼻滴入纳米二氧化钛颗粒后,利用电感耦合等离子体质谱法(Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS)检测小鼠各个脑区内二氧化钛的含量发现,在嗅球、大

脑皮层、海马、小脑均可检测到纳米二氧化钛的存在,且在海马区的含量最高。尹芳蕊等^[8]通过研究ICR小鼠经鼻腔滴注给予约3.0~5.0 nm量子点溶液30 min后,可经活体成像法观察到量子点扩散至嗅球,并在大脑组织切片中观察到量子点,提示其可以经过鼻黏膜和嗅球进入脑组织。

此外,药物还可在外周静脉给药或肌肉注射时,穿刺、渗透进入浅表神经末梢,从而引发周围神经毒性。且曾有PICC留置管引起患者手臂及手指麻木,导致触电感的周围神经损伤的相关案例^[9]。

2 影响纳米材料进入神经系统的因素

纳米材料的理化性质可影响其与生物体的作用形式,包括胞吞、胞吐、清除及细胞间相互作用的能力,其中粒径、形状、表面电荷、表面修饰等为主要决定因素。研究提示,纳米颗粒的粒径越小越易于透过血脑屏障。因组成血脑屏障的内皮细胞形成紧密连接,在正常生理状态下当纳米颗粒粒径大于4 nm时无法通过血脑屏障的细胞间隙。Etame等^[10]比较不同粒径的纳米金穿透血脑屏障的能力,结果显示粒径为4 nm的纳米金透过血脑屏障的比率明显高于粒径为16 nm及以上者。通常认为,球形纳米材料比椭圆形等其他形状的纳米材料更易于被细胞摄取^[11]。纳米颗粒的表面所带电荷,则是影响血脑屏障通透性的另一个重要因素。大多数表面带正电的纳米颗粒可吸附于带负电的血脑屏障表面,进而通过胞吞机制透过血脑屏障。研究^[12]显示,经静脉给大鼠注射携带不同种电荷的蜡纳米颗粒后,颗粒透过血脑屏障的能力由大至小依次为携带正电荷纳米颗粒、携带负电荷纳米颗粒和中性纳米颗粒。脑血管内皮细胞表面分泌、吸附多糖-蛋白质复合物,因此在正常的生理环境中表现负电性。携带正电荷的纳米颗粒可更为牢固地吸附在内皮细胞表面,增强其通透性。此外,纳米材料的表面修饰基团可影响纳米材料在体内的分布及清除效率。如聚乙二醇修饰可提高纳米颗粒的生物兼容性和稳定性,修饰后的纳米颗粒可经内吞进入血脑屏障。张钰坤等^[13]比较小檫碱原料药和小檫碱介孔二氧化硅纳米颗粒在大鼠体内的药代动力学后发现,大鼠静脉注射后脑匀浆中小檫碱原料药的半衰期为6.88 h,而小檫碱介孔二氧化硅纳米颗粒的半衰期则为14.08 h,后者在脑内的滞留时间明显延长。此外,研究显示内源性修饰,例如载脂蛋白表面修

饰、转铁蛋白表面修饰等，可以增强纳米材料的生物相容性，以及纳米材料对血脑屏障的靶向作用等^[14]。

因理化属性各异，不同纳米材料进入脑组织的途径及特征亦有所差异（表1）。无机纳米材料是目前人群最为广泛接触到的一类纳米材料，包括金纳米粒、磁性氧化铁纳米粒、二氧化硅纳米粒、碳纳米管等。该类纳米材料对血脑屏障的通透性强，可吸附于血脑屏障内皮细胞内侧，通过增大浓度差促进被动扩散，也可延长药物在体内的循环时间。其中，金属纳米颗粒可释放金属离子，后者可诱导氧化应激反应，导致体内微循环障碍。天然高分子材料包括壳聚糖纳米微粒、透明质酸、蛋白质纳米微粒（白蛋白、铁蛋白、脂蛋白）等。这类

大分子具有较强的生物相容性以及较长的半衰期，可通过网格蛋白或小窝蛋白介导的内吞透过血脑屏障。合成纳米材料包括聚乳酸（Polylactic Acid, PLA）、聚乳酸-羟基乙酸共聚物[Poly（Lactic-co-glycolic Acid）, PLGA]、聚己内酯（Polyethylene Glycol-Polycaprolactone, PEG-PCL）等，其中大多数具有生物可降解性，具有良好的生物相容性。这类纳米材料往往通过抑制药物外排系统提高血脑屏障的通透性从而进入中枢神经系统。半导体纳米晶体，即量子点。通常由Ⅱ~Ⅵ族元素或Ⅲ~Ⅴ族元素（例如硅、镉、锌、铅、铜等）等材料构成，也可由2种或2种以上的半导体材料构成。该类材料可释放无机离子并形成微米级的聚集体，该聚集体可导致脑组织产生炎性浸润。

表1 纳米材料类型及进入血脑屏障的方式与特点

类型	举例	进入方式	进入特点
无机纳米材料	金纳米粒、磁性氧化铁纳米粒、二氧化硅纳米粒、碳纳米管	被动扩散、胞吞	强通透性、半衰期长、分布范围广
天然高分子材料	壳聚糖纳米微粒、透明质酸、蛋白质纳米微粒（白蛋白、铁蛋白、脂蛋白）	受体介导的血脑屏障内吞、胞吞	生物相容性强、半衰期较长
合成纳米材料	聚乳酸、聚乳酸-羟基乙酸共聚物、聚己内酯	抑制外排、受体介导的血脑屏障内吞	生物相容性强
半导体纳米材料	硅量子点、硫化铅量子点、硒化铅量子点	吸附、胞吞	易被摄取、释放无机离子

3 纳米材料中枢神经毒性效应及作用机制

纳米材料对中枢神经产生毒性的作用机制主要包括非神经系统特异性作用机制（如炎症反应、氧化应激、细胞自噬、细胞凋亡等），以及神经系统特异性作用机制等。

3.1 非神经系统特异性毒性机制

3.1.1 炎症反应

纳米材料进入体内后会诱发炎症反应并产生大量炎症因子，如体内核转录因子（Nuclear-transcription Factor- κ B），NF- κ B、白细胞介素（Interleukin, IL）-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α （Tumor Necrosis Factor- α ，TNF- α ）和转化生长因子- β （Transforming Growth Factor- β ，TGF- β ）等。这些炎症因子可进入体循环引起全身性的炎症反应，进而透过血脑屏障诱发脑部炎症

反应，对脑部神经元、胶质细胞等造成损伤^[15]。韦巧慧^[16]研究提示，纳米颗粒可作用于小胶质细胞，对神经系统产生毒性的炎症因子在此大量表达，造成神经损伤。在碳纳米管的作用下，神经元和胶质细胞分泌细胞因子，并导致白介素和肿瘤坏死因子等的表达水平升高。且单壁碳纳米管与巨噬细胞的Toll样受体（Toll Like Receptor, TLR）疏水基团可相互作用，触发机体的先天免疫反应并分泌白介素和趋化因子等炎症因子。Shin等^[17]研究发现，纳米ZnO₂可刺激小鼠小胶质细胞，促进TNF- α 和NF- κ B的产生，激活炎症级联效应的发生。

3.1.2 氧化应激

纳米颗粒作用于细胞后，可在早期阶段通过神经炎症激活小胶质细胞，造成线粒体功能障碍，产生芬顿反应，以及改变溶酶体膜的通透性等，产

生活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS), 并引起氧化应激反应。后者能够增强血脑屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB) 的通透性, 是纳米材料诱导的神经毒性的主要机制之一, 可造成DNA、蛋白质和膜损伤, 以及信号通路障碍, 甚至诱发神经退行性病变。因脑组织较为脆弱敏感, 脑内大量的蛋白质、核酸更易受到活性氧带来的功能性损伤。研究提示, 纳米 $\text{SiO}_2\text{-Fe}$ 可激活巨噬细胞的Nrf2信号传导, 并显著增加其含量^[18]。纳米 ZnO_2 可通过直接损伤星形胶质细胞膜, 并攻击细胞膜中的多不饱和脂肪酸, 导致生成过量的丙二醛。纳米二氧化硅作用于PC12细胞24 h后, 可抑制20S蛋白酶体的活性, 并降低泛素-蛋白酶体系统 (Ubiquitin-Proteasome System, UPS) 中泛素以及泛素羧基末端水解酶 L1 蛋白的水平。

3.1.3 细胞自噬

细胞自噬指一些损坏的蛋白或细胞器被双层膜结构的自噬小泡包裹为自噬体, 之后被运送至溶酶体分解其包裹的可降解成分。纳米颗粒可触发细胞自噬, 导致细胞核固缩、自噬体和溶酶体的形成等。Chen等^[19]研究发现, 量子点可诱发神经细胞发生自噬, 从而对神经突触造成一定的损伤。此外, 纳米氧化铜可经p38和ERK信号通路诱导小鼠巨噬细胞发生自噬性损伤, 并提高细胞外调节蛋白激酶的磷酸化水平, 提示其可以对细胞自噬的进程造成影响^[20]。Barthet等^[21]发现, 典型的自噬在逐渐阻断神经元。这导致通过细胞核的核自噬介导的和高尔基体依赖性排泄激活的替代性清除途径, 其引起核变性和细胞萎缩。当增强自噬启动或阻断自噬转换时, 均引起核整体性改变。

3.1.4 细胞凋亡

细胞凋亡是由基因控制的细胞死亡, 涉及一系列基因的激活、表达以及调控作用, 导致组织、器官的损伤以及功能紊乱。其中凋亡相关因子caspase-3与凋亡级联过程的启动有关, 是细胞进入细胞凋亡相关信号通路的重要标志。纳米材料诱导的细胞凋亡主要与caspase的内源性通路密切相关。辛琦等^[22]发现, 在纳米银暴露的斑马鱼胚胎中, 纳米银可激活AKT/GSK-3/caspase-3 信号通路, 并导致凋亡过程的提前发生。此外, 纳米 SiO_2 可通过氧化损伤功能促进PC12细胞内的细胞色素C与凋亡因子、细胞凋亡诱导因子 (Apoptosis

Inducing Factor, AIF) 及 proeaspase-2、3、9的释放, 并通过激活caspase-9启动caspase级联反应, 进而引起细胞凋亡。有研究^[23]提示, 纳米氧化铁暴露于乳鼠神经细胞后, 可导致线粒体膜电位降低和细胞凋亡率增加。Wang等^[24]研究发现, 纳米 SiO_2 可促进PC12细胞内细胞色素C与凋亡诱导因子释放, 从而引起细胞凋亡。

3.2 神经系统特异性毒性机制

3.2.1 干预GABA代谢途径

γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric Acid, GABA) 是哺乳动物中枢神经系统中最为重要的抑制性神经递质, 可维持大脑皮层神经元的兴奋性。当GABA平衡被破坏时, 可发生神经系统异常兴奋, 可能诱发癫痫。研究^[25]显示纳米银可导致脑内 GABA 含量显著降低, 抑制神经元的兴奋性, 使GABA 代谢通路关键基因mRNA 表达显著上调, 影响GABA代谢途径。王雅等^[26]将纳米银 (Ag Nanoparticles, AgNPs) 暴露给斑马鱼幼鱼后, 其GABA 受体通路相关基因表达发生了显著的变化, 且GABA 受体的活性受到AgNPs的干扰。可见, 当纳米材料进入脑后, 通过研究其对GABA代谢通路及相关蛋白的影响, 可能会反映出纳米材料产生的中枢神经毒性。

3.2.2 调控神经轴突导向因子表达

神经轴突导向因子 (Netrin-1) 是一种类似层粘连蛋白的蛋白质, 与受体结合后可抑制炎症细胞迁移、减轻炎症反应、降低促炎介质的血清水平, 在血管新生、细胞转移、组织形态发生等方面发挥重要作用。研究^[27]发现, Netrin-1可以有效降低纳米材料毒性反应造成的细胞损伤, 为细胞的功能性修复提供良好条件。Liu等^[28]研究提示, 碳纳米管可对神经元细胞产生毒性并刺激Netrin-1的表达。

3.3 外周神经毒性作用机制

纳米材料的外周神经毒性研究较少, 主要分为纳米载体导致的非靶向毒性和纳米材料自身导致的外周神经毒性两类。多种抗癌药 (如顺铂、紫杉醇等) 的原料药水溶性差且结构不稳定, 经纳米材料递送系统改造后可高效地抵达肿瘤组织, 更好地发挥药效作用。因此, 当前多数纳米药物的适应症均为各类肿瘤疾病。如顺铂纳米粒具有良好的生物相容性且能够快速地被肿瘤细胞所吞噬, 实现顺铂药物在肿瘤细胞内的释放^[29]; 使用白蛋白作为纳米

载体来承载紫杉醇后可改善紫杉醇的免疫反应,并快速且长效地在肿瘤组织中发挥药效。然而,纳米抗癌药物的药代特征与传统小分子化合物有所不同,可引起额外的外周神经毒性。文献报道,使用奥沙利铂后24~48 h可出现急性神经毒性,表现为四肢感觉障碍,遇冷后加重^[30],而在治疗间歇期减轻。也有研究发现,通过外周静脉给药和放置中心静脉留置管时,纳米紫杉醇可累及外周神经并长期蓄积,易于产生四肢麻木、感觉异常、肌肉痉挛和疼痛等外周神经毒性症状^[31]。此外,纳米材料自身也存在周围神经毒性风险,研究提示,背根神经节(Dorsal Root Ganglion, DRG)暴露于铜纳米颗粒后,可出现空泡和部分神经元脱离基质,以及神经网络断裂,毒性与粒径大小有关^[32]。Erriquez等^[33]发现, TiO₂-NPs可通过内化进入DRG,并诱导细胞凋亡,产生ROS,导致促炎症细胞因子IL-1 β 表达发生变化,以及轴突逆行迁移发生改变。Pallavi等发现粒径为175 nm的纳米金颗粒(Au Nanoparticles, AuNPs)可降低DRG的活力,并影响神经突分化^[34]。

4 纳米材料神经毒性的评价方法

4.1 体内神经毒性评价方法

体内动物试验主要包括神经系统的安全药理学试验,以及结合重复给药毒性试验开展的神经系统评价,必要时可考虑开展神经行为学试验,使用成像技术追踪纳米药物及载体在神经系统内的迁移、分布和吸收等研究。目前,药物神经毒性非临床安全性评价主要依靠动物试验的组织病理学检查和神经行为学检查。神经行为学评价是经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)推荐的神经毒性评价的重要方法之一,通过多种测试项目及组合反映神经功能状态,评价药物神经毒性。神经行为学试验包括水迷宫、新物体识别模型、情境恐惧条件反射模型、转棒试验等。刘仕昌等^[35]开展水迷宫试验并发现纳米二氧化钛可影响大鼠的学习能力并降低其空间认知能力。

组织病理学检查通过考察病理学形态改变确认神经损伤及可逆程度,是药物非临床神经毒性评价的经典方法。苏木精-伊红染色切片可用于在显微镜下观察神经组织的结构及病变,特异性神经病变可进一步采取免疫组化或特殊染色进行识

别,电镜技术则用于观察细胞表面形态和细胞内超微结构,如鉴别细胞器中空泡变性的具体位置。冷法宁等^[36]观察小鼠纹状体和海马神经组织病理切片并开展免疫组化试验,发现Cu₂-xSeNP₃可导致小鼠纹状体细胞排列杂乱,部分细胞核固缩,胞浆染色不均,染色质溶解现象明显,组织结构密度明显降低,海马组织细胞排列松散等。

此外,各类神经影像学技术如磁共振成像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)、正电子发射断层扫描(Positron Emission Tomography, PET)等也适用于动物活体成像。MRI的优势是分辨率高、电离辐射低,PET是分子定量成像技术,可与结构成像互补。各种体内评价方法和技术的不断发展推动了药物神经毒性非临床动物试验研究。Cole等^[37]利用基于经典X射线计算机断层扫描,结合金纳米颗粒作为标记剂,开发了一种对外泌体纳米颗粒进行纵向和定量体内神经成像的方法。

4.2 体外神经毒性评价方法

常见的体外培养用神经细胞类型见表2。对于具有潜在神经毒性风险的纳米药物,纳米药物非临床安全性研究技术指导原则^[38]建议开展相应的体外毒性研究,如神经细胞活力测定和细胞功能测定等。

4.2.1 神经细胞培养模型的选择

对于原代神经细胞和神经干细胞来说,永生神经细胞系是较为简单的体外神经细胞模型,通常来自肿瘤细胞,更易于培养且状态较稳定。神经母细胞瘤细胞被广泛用于模拟帕金森综合征模型。该细胞具有儿茶酚胺能神经元特性,且保留了与帕金森病(Parkinson's Disease, PD)相关的基因和通路。此外,人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)还被广泛用于阿尔茨海默症、神经缺血和缺氧的研究。PC-12细胞是来源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤的单克隆细胞株,具有神经细胞特性,是目前国际上公认的体外神经生物、神经化学及神经系统疾病研究的理想模型。其他常用的神经细胞系包括神经胶质瘤细胞(C6)、肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)、人神经胶质瘤细胞(H4)、成神经瘤细胞(N2a)、人脐血管内皮细胞(ECV304)等。

原代培养的神经细胞的优点更接近体内的情况,可模拟神经递质在突触间的表达、神经元和星形胶质细胞之间的相互作用等。研究提示,具有神经毒性的药物(例如阿霉素、氨基糖苷类抗生素、

有机磷酸酯、长春新碱、秋水仙碱、紫杉醇、胺碘酮等)可降低原代星形胶质细胞胞外谷氨酸和谷氨酰胺的浓度^[39],使谷氨酰胺合成酶的活性降低,从而导致细胞凋亡和氧化自噬。故神经星形胶质细胞通常作为药物神经毒性评价的重要靶标。然而,原代神经细胞取材困难,培养所需成本高且稳定性不佳,仅适用于周期较短、针对神经细胞代谢过程及细胞间相互作用进行研究的试验。

神经干细胞具有分化为三种组成中枢神经系统主要细胞(神经元、星形胶质细胞和少突胶质细

胞)的潜力,主要来自胚胎干细胞、骨髓分离的多功能细胞等。该类细胞寿命有限,经几次传代后分化过程不可控,并可发生生长停滞。但该类细胞可定向分化为具有特殊功能的细胞,广泛用于神经系统生理学、神经毒理学等的研究。在外源化合物作用的情况下,通过研究神经干细胞在神经系统发育过程中的关键性事件,如神经细胞增殖和凋亡、分化与迁移、神经元突起的形成以及突触的形成、神经元之间的联系、髓鞘的形成、神经递质表型和功能等的改变,来观察神经发育毒性。

表2 常见的体外培养用神经细胞类型

人神经细胞	小鼠神经细胞	大鼠神经细胞
人星形胶质细胞	小鼠皮层神经元	大鼠皮层神经元
人H9-衍生神经干细胞	小鼠海马神经元	大鼠海马体神经元
人胚胎神经干细胞		大鼠神经胶质前体细胞
		大鼠皮层星形胶质细胞
		大鼠胎儿神经干细胞

4.2.2 形态学改变

细胞受到损伤时,常伴有形态学改变。不同浓度的纳米二氧化硅颗粒作用于SH-SY5Y细胞24 h后,可导致细胞数减少、染色质嗜碱性染色增强、细胞脱落增加、排列紊乱,甚至细胞核崩解^[40]。冷法宁等^[36]发现,正常培养条件下,分化的PC-12细胞多呈三角形或梭形,向外延伸并长出神经丝,细胞相互重叠成团。加入Cu_{2-x}SeNP₃作用24 h后,活细胞数目显著减少,死亡细胞增多;细胞形态表现为胞核固缩、胞体回缩,细胞突起变短,有的甚至消失,胞质内可见许多空泡,颗粒物增多,透光度变差;细胞间突起处连接点减少,易脱落。神经小胶质(N9)细胞在经过纳米氧化铝24 h处理后,细胞失去正常形态,突起消失,细胞密度降低,胞体内可见黑色颗粒沉积。

4.2.3 细胞活力检测方法

细胞活性是判断细胞在药物处理条件下,能否正常生长的重要评价指标。常见检测方法包括细胞计数试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)法、噻唑兰[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]法、乳酸脱氢酶(Lactate Dehydrogenase, LDH)法和三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)发光法等。CCK-8在电子载体硫酸吩嗪(Phenazine Methosulfate, PMS)的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲臞产物,其数量与活细胞的数量成正比。用酶联免疫检测仪在450 nm波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。徐丽等^[41]将微米氧化铝、纳米氧化铝、纳米碳染毒过的细胞培养48 h后,结果显示三种物质在高剂量时均对神经细胞的活力值有很大的影响,使活力明显下降。MTT法的检测原理是活细胞内的线粒体琥珀酸脱氢酶可将外源性的MTT还原成蓝紫色结晶体甲臞,并沉积在细胞中。甲臞溶于DMSO后,在490 nm波长下用酶联免疫检测仪测定其吸光度值,在一定范围内,甲臞生成量与活细胞数目成正比,可间接反映细胞活力。杨艳艳等^[42]检测纳米二氧化硅对SH-SY5Y细胞存活率的影响,纳米SiO₂作用于SH-SY5Y细胞24 h,随着染毒剂量的增加,细胞存活率逐渐降低,呈剂量依赖关系。LDH法则

是利用在正常情况下,乳酸脱氢酶不能通过细胞膜渗透到细胞培养液中,而当细胞受损或死亡时,膜通透性增加,乳酸脱氢酶可释放到细胞外的特点。通过检测细胞培养液中LDH的酶活力,来判断细胞受损和膜通透性改变,检测纳米材料对细胞膜完整性的影响。此外,ATP水平的下降可直接表明线粒体功能受损,亦可反映细胞生存条件的变化。如凋亡、坏死或处于毒性状态下,细胞内的ATP水平均会显著降低,线粒体膜电位的降低常常同时发生。因此可根据荧光光强度与正常对照组变化的百分比,评估细胞内ATP活性的改变。

4.2.4 细胞功能检测方法

神经元是一种高度特化的细胞,具有感受刺激和传导兴奋的功能。目前,神经细胞的信号传导或信息传递功能的检测主要依赖细胞膜片钳技术,该技术通过玻璃微电极的尖端与单个细胞膜接触,以观测细胞膜离子通道的微小电流^[43]。然而在测定某种神经细胞膜离子通道电流时尚存在一些技术上的难题,一是体外培养细胞群体的活性在空间上具有随机性,二是细胞膜表面离子通道电流的改变往往是瞬时发生和消失的,具备时间上的随机性。姜晓丹等^[44]提出一种不受神经细胞功能随机性影响的神经细胞的信号传导或信息传递功能的评估方法。该方法分别制备含造影剂的神经细胞冷冻凝胶和不含造影剂的神经细胞冷冻凝胶,并进行磁共振功能成像,然后将二者的磁共振图像进行对照。如果含造影剂者磁共振图像较含未造影者的磁共振图像增强,则提示神经细胞具有传递信息的功能。

此外,因线粒体是产生细胞内活性氧和三磷酸腺苷的主要来源,神经细胞线粒体发生功能障碍在细胞凋亡过程中起关键作用。段秋红等^[45]通过体外培养神经母细胞瘤细胞株N2a模拟缺血再灌注,并使用MTT法、细胞色素C释放和跨膜压的改变判断线粒体的功能。结果提示,线粒体功能失调在缺血再灌注引起的N2a细胞凋亡过程中可能起到凋亡

早期的启动和随后的信号放大作用。

4.2.5 替代评价方法

斑马鱼是常用的纳米材料体外替代评价模型,其神经系统形成过程和发育机制与人类高度相似。其神经系统通常在受精后6小时开始发育,受精6天后发育完成。使用斑马鱼开展药物神经毒性评价,兼具快速、高效、经济的优点。王雅等^[26]研究发现,AgNPs暴露于斑马鱼30天后,其脑组织中抗氧化酶T-SOD和CAT活性显著降低,炎症因子相关基因的mRNA表达量发生了不同程度的提升,IL-1 β 和IL-8 mRNA表达量大大上升,癫痫标志物c-fos mRNA表达量亦显著上升。陈金等^[46]发现,纳米氧化铝可以造成成年斑马鱼的学习记忆障碍,且其毒性作用与粒径有关。黄涛等^[47]研究提示,纳米氧化铝可通过诱导过度自噬导致斑马鱼幼鱼早期神经发育毒性。此外,Li等^[48]研究发现,SiNPs可干扰斑马鱼的光/暗偏好、抑制其探究行为和记忆力等。

5 小结

当前国内外已就纳米材料的应用价值开展了广泛且较为深入的研究。纳米载体易于透过血脑屏障,在某些情况下可能会增加小分子药物本身的神经毒性。而部分纳米材料本身可进入中枢或外周神经系统并直接产生神经毒性。与此同时,关于纳米材料的毒性和安全性评价却远远落后于其相关应用探索。在复杂的生物环境下,神经毒性的发生可能涉及多重机制并涉及多种神经因子,其作用机制有待深入研究。体外试验可提示毒性作用机制,可用于早期毒性筛选。然而,因神经系统的结构和功能都极其复杂,体内试验结果可能更接近于人体实际情况。纳米材料的神经毒性研究应结合其体内代谢及分布特点开展,并综合评价神经毒性风险。此外,新兴的替代神经毒性评价方法将在今后有一定用武之地。不同评价体系各有利弊(表3),需相互补充,以更全面地了解纳米材料的神经毒性。

表3 体内体外试验方法比较

方法	优点	缺点
体内评价试验	1. 全面反映药物的各种毒性作用; 2. 能长期观察慢性毒性反应	1. 干扰因素较多; 2. 难以进行代谢和机制的研究; 3. 测试费用高昂、耗时长; 4. 种间差异和动物保护
体外评价试验	1. 简便、快捷、经济; 2. 可直接利用人体细胞; 3. 干扰因素少、易于控制; 4. 可进行代谢和机制的研究; 5. 解决了整体动物试验中大量使用实验动物且以动物濒死或死亡为终点的伦理问题; 6. 增加了试验过程中的可控因素, 提升了试验结果的可靠性	1. 不能全面反映药物的各种毒性作用, 缺乏整体毒代动力学的过程; 2. 难以研究药物的慢性毒性作用

参考文献:

- [1] 刘焕亮, 林本成, 刘晓华, 等. 纳米氧化锌中枢神经系统毒性及多巴胺能神经元损伤的生物标志物研究[C]. 2019年海峡两岸暨港澳青年科学家毒理学学术交流会议论文集, 2019: 67-68.
- [2] 张玉媛, 王取南, 王志刚, 等. 出生后接触氰戊菊酯对仔鼠神经行为发育及学习记忆的影响[J]. 毒理学杂志, 2008 (2): 12-15.
- [3] 淡墨, 刘丽, 李佐刚. 不同物理化学性质纳米颗粒的脑屏障通透机制及毒性影响研究进展[J]. 药物分析杂志, 2015, 35 (8): 1323-1328.
- [4] 谢琳, 冯晓黎, 邓梓, 等. 口腔纳米材料的神经毒性及作用机制[J]. 口腔疾病防治, 2020, 28 (9): 594-599.
- [5] 纪乐, 吴涛, 刘东杰, 等. 纳米材料神经毒性研究进展[J]. 中国职业医学, 2017, 45 (2): 227-230.
- [6] Oberdorster E. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass[J]. Environ Health Perspect, 2004, 112 (10): 1058-1062.
- [7] 李晓波. 金属氧化物纳米颗粒的神经毒性研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [8] 尹芳蕊, 陈春英, 董元兴, 等. 量子点经嗅觉通道进入中枢神经系统的可视化过程[J]. 科学通报, 2010, 55 (7): 547-552.
- [9] 黄道花. 1例PICC置管致患者周围神经损伤的护理[J]. 护理实践与研究, 2015, 12 (11): 157-158.
- [10] Etame AB, Smith CA, Chan WC, et al. Design and Potential Application of PEGylated Gold Nanoparticles with Size-Dependent Permeation Through Brain Microvasculature[J]. Nanomedicine, 2011, 7 (6): 992-1000.
- [11] Syama S, Mohanan PV. The Promising Biomedical Applications of Engineered Nanomaterials[M]// Elsevier: Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications, 2018: 530-542.
- [12] Kadam R, Ghawali J, Waespy M, et al. Janus Nanoparticles Designed for Extended Cell Surface Attachment[J]. Nanoscale, 2020, 12 (36): 18938-18949.
- [13] 张钰坤, 李新悦, 张瀛, 等. OX26/ApoE共修饰的载小檗碱介孔二氧化硅纳米粒药动力学研究[J]. 天津中医药大学学报, 2020, 39 (6): 702-710.
- [14] 陈钧, 周松雷. 一种载脂蛋白修饰的仿生纳米肿瘤疫苗及其制备方法和用途: CN112569207A[P]. 2021-03-30.
- [15] Kumari M, Singh SP, Chinde S, et al. Toxicity Study of Cerium Oxide Nanoparticles in Human Neuroblastoma Cells[J]. Int J Toxicol, 2014, 33 (2): 86-97.
- [16] 韦巧慧. 单壁纳米碳管对小鼠中枢神经系统毒性的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [17] Shin JA, Lee EJ, Seo SM, et al. Nanosized Titanium Dioxide Enhanced Inflammatory Responses in the Septic Brain of Mouse[J]. Neurosci, 2010, 165 (2): 445-454.

- [18] Zhang H, Zhou L, Yuen J, et al. Delayed Nrf2-regulated Antioxidant Gene Induction in Response to Silica Nanoparticles[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108 (7): 311-319.
- [19] Chen L, Miao Y, Jin P, et al. The Role of Elevated Autophagy on the Synaptic Plasticity Impairment Caused by CdSe/ZnS Quantum Dots[J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (38): 10172-10181.
- [20] 吴琼, 何会, 于超. 氧化铜纳米颗粒经 p38 和 ERK 信号通路诱导巨噬细胞自噬性损伤[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44 (6): 740-745.
- [21] Barthelet VJA, Ryan KM. Autophagy in Neurodegeneration: Can't Digest It, Spit It Out! [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28 (3): 171-173.
- [22] 辛琦, 章强, 程金平. 纳米银和银离子对斑马鱼胚胎早期生长发育的影响及作用机制[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10 (4): 55-64.
- [23] 葛翠翠, 李伟庆, 张勤丽, 等. 不同粒径纳米氧化铝对体外培养神经细胞凋亡的影响[J]. *环境与职业医学*, 2012, 28 (2): 72-76.
- [24] Wang F, Jiao CP, Liu JW, et al. Oxidative Mechanisms Contribute to Nanosize Silican Dioxide-induced Developmental Neurotoxicity in PC12 cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25 (8): 1548-1556.
- [25] 徐莺莺, 林晓影, 陈春英. 影响纳米材料毒性的关键因素[J]. *科学通报*, 2013, 58 (24): 2466-2478.
- [26] 王雅. 纳米银暴露对发育早期斑马鱼的神经毒性效应研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.
- [27] 贾正泰, 张志发, 赵钰琛, 等. Netrin-1在纳米材料修复神经损伤中的作用机制研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2017, 31 (12): 1201-1207.
- [28] Liu M, Zhou G, Song W, et al. Effect of Nano-hydroxyapatite on the Axonal Guidance Growth of Rat Cortical Neurons[J]. *Nanoscale*, 2012, 4 (10): 3201-3207.
- [29] 曹萌, 刘方舟, 张喜全, 等. 顺铂治疗细胞内部铂纳米颗粒的发现及其与耐药性关系的研究[J]. *中国科学: 材料科学(英文版)*, 2015 (8): 640-648.
- [30] 孟天霞, 贾永红, 范卉, 等. 奥沙利铂化疗致外周神经毒性的护理体会[J]. *肿瘤药学*, 2012, 2 (4): 317-319.
- [31] 韩滨, 李正翔. 紫杉醇致外周神经毒性的研究现状与进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2018, 37 (7): 375-379.
- [32] Prabhu BM, Ali SF, Murdock RC, et al. Copper Nanoparticles Exert Size and Concentration Dependent Toxicity on Somatosensory Neurons of Rat[J]. *Nanotoxicology*, 2010, 4 (2): 150-160.
- [33] Erriquez J, Bolis V, Morel S, et al. Nanosized TiO₂ Is Internalized by Dorsal Root Ganglion Cells and Causes Damage via Apoptosis[J]. *Nanomedicine*, 2015, 11 (6): 1309-1319.
- [34] Madhusudanan P, Jerard C, Katiyar N, et al. Effect of Gold Nanoparticle Treated Dorsal Root Ganglion Cells on Peripheral Neurite Differentiation[J]. *Toxicol In Vitro*, 2021, DOI: 10.1016/j.tiv.2021.105175.
- [35] 刘仕昌. 纳米二氧化钛对Wistar大鼠突触可塑性的影响及其机制的研究[D]. 天津: 南开大学, 2012.
- [36] 冷法宁. 硒化铜纳米粒的神经毒性评价及机制研究[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020.
- [37] Cole LE, Ross RD, Tilley JM, et al. Gold Nanoparticles as Contrast Agents in X-ray Imaging and Computed Tomography[J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2015, 10 (2): 321-341.
- [38] 国家药品监督管理局药品审评中心. 纳米药物非临床安全性研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. (2021-08-27) [2022-01-12]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/95945bb17a7dcde7b68638525ed38f66>.
- [39] 范德义, 方思羽. 网络酮对脂多糖诱导原代培养星形胶质细胞释放谷氨酸的抑制效应[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2004 (6): 35-37.
- [40] 金明华, 杨艳艳, 王佳慧, 等. 纳米二氧化硅颗粒通过线粒体途径诱导人神经母细胞瘤SH-SY5Y凋亡作用机制[C] //中国毒理学会毒理学替代法与转化毒理学专业委员会和中国环境诱变剂学会毒性测试与替代方法专业委员会. 2015年毒性测试替代方法与转化毒理学(国际)学术研讨会论文集, 西安, 2015: 134-135.
- [41] 徐丽, 张勤丽, 高福平, 等. 几种细胞毒性评价方法在纳米氧化铝神经细胞毒性研究中的应用比较[J]. *中华预防医学杂志*, 2010, 44 (9): 785-789.
- [42] 杨艳艳, 金明华, 李艳博, 等. 纳米SiO₂对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y细胞的凋亡诱导作用及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41 (2): 249-254.
- [43] 刘清君. 神经芯片及其在生物嗅觉传感机理中的研究

- [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [44] 姜晓丹, 法志强, 王志娟, 等. 一种神经细胞传递信息功能的定性和定量评估方法: CN102004114A[P]. 2011.
- [45] 段秋红, 王西明, 王忠强, 等. 体外模拟缺血再灌注诱导神经细胞线粒体功能改变的研究[J]. 卒中与神经疾病, 2004 (5): 271-274.
- [46] 陈金. 纳米氧化铝胚胎暴露致成年斑马鱼的学习和记忆能力进行性损伤[D]. 太原: 山西医科大学, 2020.
- [47] 黄涛, 王艳红, 陈金, 等. 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤在纳米氧化铝致斑马鱼幼鱼早期神经毒性中的作用[J]. 生态毒理学报, 2021, 16 (4): 250-259.
- [48] Li X, Ji X, Wang R, et al. Zebrafish Behavioral Phenomics Employed for Characterizing Behavioral Neurotoxicity Caused by Silica Nanoparticles[J]. Chemosphere, 2020, 240: 124937.

(收稿日期 2022年1月4日 编辑 邹宇玲)