

【综述】

影响药物毒性神经病理学评价质量的主要因素

屈哲¹, 林志^{1*}, 吕建军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: 神经毒性是许多药物或化合物常见的毒副作用。在新药研发早期要进行神经毒性筛选。对于可能通过血脑屏障影响神经系统的小分子药物或疫苗类的生物制品在临床前安全性评价中要进行非人灵长类动物的神经毒性评价。毒性病理学或神经病理学评价是临床前药物神经毒性评价的金标准。针对影响药物毒性神经病理学评价质量的几个主要因素, 包括神经病理学评价的一般策略、最佳的评价时机、特殊的神经组织屏障系统、神经组织病理制片中的取材方法以及人工假象对神经病理学诊断的干扰, 进行详细的解析, 以期为我国神经毒性评价指导原则的制定和药物非临床神经毒性研究提供参考。

关键词: 毒理学; 神经病理学; 小分子药物; 临床前安全性评价; 神经毒性; 新药研发

中图分类号: R994.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2017) 09-1348-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.09.031

Major factors influencing quality of neuropathology evaluation of drug toxicology

QU Zhe¹, LIN Zhi¹, LÜ Jian-jun¹, HUO Gui-tao¹, YANG Yan-wei¹, ZHANG Di¹, ZHANG Shuo¹, HUO Yan¹, GENG Xing-chao¹, 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: Neurotoxicity is one common adverse effect caused by many drugs or compounds. In the early phase of new drug development, it is necessary to screen for neurotoxicants. Neurotoxicity studies in nonhuman primates (NHP) are used to evaluate the neurotoxicity of small-molecule drugs or vaccines that may affect the nervous system across the blood-brain barrier during preclinical safety assessment. Toxicologic pathological evaluation or neuropathological examination is the “gold standard” for the evaluation of drug neurotoxicity in preclinical drug safety studies. In this paper, the majority factors influencing the quality of neuropathology evaluation in toxicology, including the general strategy of neuropathology evaluation, the optimal timing of evaluation, the specific blood-brain barrier in the nervous system, the method of sampling in the histopathology of nerve tissue, and the interference of artificial artifacts in diagnosis of neuropathology, were detailly analyzed in order to provide a reference for setting guidelines of neurotoxicity risk assessment in China and pathologists and toxicologists engaged in nonclinical neurotoxicity studies.

Key words: toxicology; neuropathology; small-molecule drugs; preclinical safety evaluation; neurotoxicity; new drug development

毒理学中的神经病理学评价是明确判断神经毒物引起神经组织损伤, 分析潜在的病因和机制的重要手段。在毒理学研究中, 熟练掌握神经病理学

评价技术需要具体了解神经系统的生物学, 病理学和毒理学知识。毒性病理学家的任务是发现每个实验的神经系统改变, 得出与实验相关的神经系统形

收稿日期: 2017-06-12

基金项目: 十二五国家科技重大专项 (2015ZX09501004-002, 2015ZX09501007-004)

作者简介: 屈哲, 助理研究员, 研究方向临床前药物安全性评价毒性病理学诊断。Tel: (010) 67872233-8210 E-mail: quzhe@nifdc.org.cn

*通信作者 林志, 副研究员, 研究方向临床前药物安全性评价毒性病理学诊断。Tel: (010) 67872233-8210 E-mail: linzhi@nifdc.org.cn

态改变。只要没有得出公认的神系统没有病变的结论,就应当认真检查多部位的脑和脊髓切面以及外周神经系统组织。评价神经系统的的第一步是建立完整的实验方案,确定需要评价的组织是否已经包含在实际评价的所有神经系统内^[1]。评价方案还要包括供试品或相关评价方法的文献检索,对于特殊受试物通过学习基本的药理知识进行分析,通过临床症状、神经行为功能观察组合实验(functional observational battery, FOB)确定脑组织特定部位的变化,以确定应该进行形态学检查的神经区域^[2-3],以及分析临床病理学数据等。

在设计神经毒理学评价方案时,以下这些因素是影响神经病理学评价质量的主要因素。首先,要有一个合理的并且符合指导原则的神经病理学评价策略^[4-5];在这个策略的指引下选择神经病理学评价的最佳时机;需要考虑神经系统血脑屏障能否允许药物进入神经系统^[6];神经病理组织制备中的取材方法决定了后续病理诊断的全面性和可靠性;最后,在神经病理学诊断中,应该排除某些病理学改变如黑色神经元、神经元空泡变性、神经纤维变性、髓鞘泡沫样是由人工假象所引起的改变,而非真正有意义的与供试品相关的病变,这项工作对每位病理学家都极具挑战^[7]。本综述对以上因素逐一进行解析,以期从事药物非临床神经毒性研究的病理学家和毒理学家提供参考。

1 神经病理学评价策略

每位病理学家依据神经毒性评价指导原则以及个人对神经系统知识和技术的培训都会形成一套特有的神经系统检查或评价技术。如果这些神经毒性评价方法是对一组制备合理的神经组织在正确的时间点,采用适当的技术进行的评价,则该评价结果是可信的。从病理学角度,多数形态学评价受限于光学显微镜检查,通常为石蜡组织包埋、切片和苏木素-伊红(HE)染色。但合理且标准化地完成以上步骤已经足以对神经系统进行完整和全面的评价。神经系统评价的关键是充分检查神经组织部位,尤其是大脑。另外,许多以形态学为基础的技术可用于补充和加强HE检查^[8-9]。

以下概述了神经毒性评价指南中对特定解剖结构进行显微镜下病变检查的一些建议^[10]。(1)髓鞘/外周神经:真正的神经脱髓鞘病变通常很容易通过传统的HE染色检查。围绕外周神经纤维的髓鞘显色,评价G率(轴突直径/总的有髓神经纤维直

径)和确定微小神经纤维变性的作用机制可以采取锇后固定,树脂包埋,和神经横断面的甲苯胺蓝或其他髓磷脂染色。锇后固定加上神经横断面的石蜡包埋可提高神经检查。(2)无髓鞘神经纤维:检查这样非常小的结构需要透射电子显微镜。虽然锇后固定,树脂包埋,甲苯胺蓝染色截面可以显示无髓鞘神经纤维,但还不足以进行无髓鞘神经纤维的形态学或形态测量检查。

中枢神经系统的空泡变性通常需要透射电子显微镜检查确定空泡的位置,特殊染色方法也可以帮助确定空泡的位置。如,空泡周围环绕一圈胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)阳性的胞浆说明空泡在星形胶质细胞的突触中。检查微小的神经元坏死要求应用特殊的Fluoro-Jade B染色、铜银染色方法^[11-12]。此外,免疫组织化学技术在确定病变性质上也具有优势。

如果病变不能通过肉眼明显地观察到,那么就只能通过形态测量方法检查细胞或细胞结构的丢失或增加^[13]。如果残留损伤没有在形态学检查的时候出现,则不能检查到背根神经节中的感觉神经元丢失。然而,应用体视学方法对神经元计数可以显示神经元的丢失。皮肤活组织冰冻切片检查表皮神经纤维计数是检查四肢远端感觉神经纤维减少的一个非常敏感的方法^[14]。

2 神经病理学评价时机

神经系统与其他组织器官相比,观察供试品相关损伤的评价时机十分重要,尤其是在评价神经元和小胶质细胞反应时。因为这些反应发生较早亦或短暂,之后可能会留下也可能不会留下一些能够观察到的残留物。

毒理学家和监管人员还有部分病理学家的传统观念是如果已知供试品具有神经毒性,应该每天给予供试品达90 d,这样与单次给药相比能够产生更多的明显的损伤作用。而通常检查慢性给药后的累积毒性暴露情况是一个错误的传统观念。对于许多化合物或供试品引起的神经元作用或可能的小胶质细胞作用,最初的暴露决定了主要的毒性作用。所有可能受影响的神经元在第一次供试品暴露时就可能被影响了。各种神经毒物引起神经元坏死的峰值时间是非常早的,通常在第一次暴露之后的2~4 d^[15]。一些N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic Acid, NMDA)拮抗剂(MK-801原型)早期引起神经元空泡变性,然后在暴露后的2~5 d可

以观察到神经元坏死^[16]。NMDA 拮抗剂普遍对各类神经元产生影响,但主要影响扣带回的大神经元。这种仅对一小簇神经元产生的影响是微小的,所以如果在最初暴露后 7 d 或更长时间时再检查脑组织,就可能错过病变。因而,必须视神经元为单个的,将神经元暴露于神经毒物中类似于单纯的无保护的将一群个体暴露于传染病中,这些神经元在第一次暴露时就会生病,第一次暴露时存活下来的神经元可能在之后的暴露中也存活下来。因此,必须较早地抓住检查神经元坏死的最好时机,选择染色方法是重要的诊断手段。

神经元、小胶质细胞可以出现早期反应即获得反应型,然后反应会快速减弱,因此,检查时机十分关键。90 d、28 d 甚至 14 d 研究结束时再进行记录都可能会错过病变或无法准确地反映最初形态学改变的程度。

3 神经系统血脑屏障

选择性隔离外源性和内源性神经毒素进入部分神经系统有 3 个重要的屏障。这 3 个屏障系统是血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 也称为血-间质液屏障,血-脑脊液屏障 (blood cerebrospinal fluid barrier, BCSFB) 和血-神经屏障 (blood nerve barrier, BNB)^[17]。“屏障”这个词可能给委托方、实验负责人,甚至病理学家一种错觉,认为受试物在中枢神经系统是安全的。事实上,这些屏障是选择性通道,允许多种营养素产生主要的定向流动,如肽的通过、葡萄糖和神经递质前体的进入^[18]。这 3 种主要的屏障由内皮细胞或室管膜细胞修饰^[19]。3 个主要的内皮细胞修饰具有独特的神经系统微血管特征:内皮细胞之间 (BBB 和 BNB) 和室管膜细胞 (BCSFB) 之间的紧密连接增加,没有或很少的细胞内孔或窗,以及胞饮作用减少。

在一定程度上,星形胶质细胞足突可以起到保护作用或阻止某些物质的通过。主要的屏障是内皮细胞或室管膜细胞。任何能够改变内皮细胞或室管膜细胞的因素 (如创伤、传染源、炎症、渗透剂、导液管或放置的其他装置物) 也能够改变这些屏障。某些室周器官 (circumventricular organs, CVOs) 的内皮细胞因为紧密连接较少和窗孔较多而有漏洞。与脑和脊髓中相应物质相比,松果体和背根神经节的内皮细胞渗透性更强^[20]。

脂溶性分子、相对分子质量小的分子和一些水溶性分子 (咖啡) 可以通过膜扩散方式,以不饱和

形式穿过 BBB^[18]。尽管受到一定限制,胞饮或内吞作用可以非选择性的运输在受体介导的内吞作用中被捕获的几乎任何物质或溶质通过 BBB^[18]。特定的氨基酸、维生素和调节蛋白可以穿过屏障。主动转运发生于葡萄糖、胰岛素、某些肽和细胞因子、维生素和脂肪酸。

当破坏 BBB,理论上对于任何分子甚至高相对分子质量的生物可以以某种方式利用转运机制或者直接或者间接通过另外分子使大多数物质进入脑组织。虽然依据对 BBB 的了解某些行为还没有被证实,但多数情况下有迹象表明单抗可以进入脑组织。

通常认为破坏屏障系统是物质意外进入脑组织的一个可能机制。人脑组织中有数以万计的血管,要求沿着这些血管的 BBB 完全完整,所有的紧密连接都工作良好是不太可能的。因此,不要主观认为治疗剂、甚至生物剂就不会进入脑组织或神经系统。

4 神经组织取材方法

如果对肾脏进行横向或纵向取材,最终可以修取合理的样本并确定与受试物相关的肾脏改变。肝脏也是如此。其他组织如肺脏、心脏、皮肤和消化系统具有一定的变异性,修取多组织切面以保证充分显示可能的作用结果。但神经系统复杂,特别是沿着任何脑轴的变异性巨大,因此所有涉及到修取组织块的方案都无法用于充分评价药物毒性作用。

为了获取多个单个脑核团,要求详细检查每隔 0.35 mm 的大鼠脑组织切面,以及每隔 1~1.25 mm 的犬和猴的脑组织切面^[15]。这样的脑取材方案需要修取 60~65 个切面,如此多数量的切面可能会震惊到多数病理学家和监管部门,但这是有意义的,并已证明是一个可靠和实用的检查脑核团的方法。如,黑质致密部中含有受帕金森病影响的神经元,检查从前到尾约 2 mm 的大鼠脑组织。对于最感兴趣的脑区域,或者为了确保多数脑切面为不同动物间相对应的切面,或者想要开展体视学研究,那么要求每隔 0.35 mm 或更小的距离修取多组织切面进行切片。特殊神经毒物的靶区域可能相当小^[15],要求将全部脑组织包埋,准备连续的冰冻切片。当然这并不适用于所有实验,这种切片方法对于排除特殊脑核团中的神经元坏死是相当有用的。

事实上,这种切片方法用于特定的脑研究,尤其用于特别设计的检查神经元坏死的实验。在已知

具有神经活性或能够通过血脑屏障的受试物已经表现对脑组织的作用尤其是神经元坏死时,建议定向研究发育循环中某段时间的脑病变^[1]。

多数临床前安全性实验不会用到这样的脑组织切片方法。现今多数病理工作组提倡更高等的脑切片方法,优于之前美国国家毒理学计划(National Toxicology Program, NTP)通过的多数实验采用的经典的3个脑切面方案,该方案被认为是较全面的脑评价方法^[21]。由于时间有限或费用较高,不可能做太多的脑切面,大鼠中通常可以检查超过3个切面,犬和非人灵长类动物可检查三或四个切面。监管指导原则中关于需要检查多少个脑切面的规定有些含糊。临床前一般毒性研究推荐的啮齿类动物(大鼠)脑组织切片和检查方法由国际环境健康与安全研究所(National Institute of Environmental Health and Safety, NIEHS)以光盘或手稿形式出版,猴脑组织切片和检查方法(与犬的方法相类似)由Pardo等出版^[22]。啮齿类动物中枢神经系统方案描述了7个全部横切面加嗅叶(1个重要的但不常检查的啮齿类动物脑部位)的切片或检查^[23]。相关指南^[24-25]中还提供了关于这些部位的关键解剖区域的位置信息。食蟹猴方案描述了检查6个脑切面并规定适合切片的标准包埋盒^[26]。临床前安全性研究中,对于大动物应考虑修取最少的脑切片。

除了脑,神经系统检查中还应对以下组织进行保存和检查:(1)至少2个脊髓切面,颈部和腰部膨大处,增加脊髓C1/C2区域有助于检查该部位微小的神经纤维变性。(2)至少2个背根神经节或脊神经根切面,如果可能,啮齿类动物再横向修取脊髓切面。(3)坐骨神经的横向和纵向切面代表外周神经。(4)基于供试品种类或对其了解,如果可能或怀疑有其他外周神经病变也要修取。人的腓肠神经活检是典型的附加外周神经检查方法。(5)如果显示供试品具有肾上腺素能激动或拮抗活性,还应检查一个或更多的交感神经节。其他的研究部位由研究特性和供试品性质决定。

5 神经病变学诊断中的人工假象

由于神经系统细胞成分的复杂性,结构和功能区域的多变性以及这些组织器官病理学改变的多样性,使得脑和脊髓的病理学诊断极具挑战。尤其是在神经组织样本制备过程中,如果对样本解剖,取材,固定,组织处理,切片和染色过程中存在不规范的操作,必然会产生人工假象。然而,即便是

按标准的操作规程完成的神经组织制片,在神经病理学检查中我们仍然要仔细分辨人工假象与供试品相关病变的区别。因此,以下列举了神经病理学诊断中常见的一些人工假象仅供病理学家参考和总结。

5.1 黑色神经元

这是毒性病理学家最常遇到的“病变”,必需与神经元坏死和变性相区分。黑色神经元可出现于浸泡固定的脑组织中,也出现于灌注固定的样本中。黑色神经元的特征是萎缩、黑色嗜碱性胞核和胞浆,常带有明显的树突。解剖和福尔马林浸泡固定后处理脑组织会加重这种人工假象。大的神经元易受影响,浸泡固定的脑组织切面常见黑色神经元,大脑皮质锥体细胞和任何神经元核团都可能受影响。这种人工假象很容易在小脑浦肯野氏细胞层中被误诊为真正的病变,可能因为这些细胞排列成线性,容易形成完整的视觉分析^[27]。

5.2 神经元空泡变性

神经元的空泡变性必需与人工假象空泡聚集相区分,这种辨别是相当困难的^[28]。神经元空泡变性是病理学改变,与自溶、固定或样本制备无关,可见影响单个或一组神经元的明显空泡,与对照组动物中所见的显著不同。由于组织处理能造成人工空泡变,因此应同时对所有组进行样本处理,而不是同一批处理对照组,然后再用其他处理方式处理供试品组。神经元空泡变性可能由蓄积性疾病,各种细胞器肿胀或感染过程引起。兽医病理学家可能更加了解与痒病有关的神经元空泡化。多数情况,为了获得有关神经元空泡所在的确切位置必需使用透射电镜(transmission electron microscope, TME)。多数技术人员不能区分神经元空泡变性和以多种形式弥漫分布于脑组织切片中的空泡变性,尤其对那些浸泡固定的样本。一旦存在病变神经元,应当采用数字成像或显微照片显示空泡变性的特征,在最初观察时进行记录。换言之,使用透射电镜就像光学显微镜,只是有更强大的镜头。如果发现空泡,使用TME至少能假定空泡在细胞内的实际位置,空泡主要位于神经细胞胞体内、树突干或其他细胞类型。神经元空泡变性在特定的脑核团中可能是正常的,尤其是在海马区域内或周围,包括犬的视神经核。

背根神经节神经元中通常可见大的,光滑的空泡,对照组动物中也可见。据报道这些空泡在化学

物质如有机磷酸酯作用下能够增多^[29]。然而无论这样的空泡是否与供试品相关,这些空泡都是类似的,与坏死或变性的神经元无关,规律的发生于对照组动物中。换言之,这些空泡常见于固定和准备时引起的人工假象。这些空泡在任何动物中可能到处都有,但最易出现于背根神经节中,也可规律地出现于三叉神经节中。

5.3 神经纤维变性

轴突或神经纤维变性(神经纤维是轴突或髓鞘或许旺氏细胞)是常见的显微镜下病变,在对照组动物中也常见,通常为极轻度。发现一些变性的神经纤维不一定是供试品引起的。轴突变性很难在光镜下证实,尤其仅采用 HE 染色方法。脊髓或外周神经纤维的纵切面中最容易观察到神经纤维变性,可能是因为这个切面与神经纤维走向平行,因此增加了看到变性病变的几率。不是所有的神经纤维变性都是典型的华勒变性^[30],穿过该区域具有完整轴突的髓鞘的局灶性肿胀非常常见。这些区域可能为人工假象,代表许旺氏细胞(或少突胶质细胞)丢失或变性的局灶性髓鞘肿胀。术语轴突变性应当保留,应用于实际观察到的变性轴突片段。实际中,常使用的是神经纤维变性术语描述各种变性特征。虽然纵向、HE 染色、石蜡包埋的切片对检测神经纤维变性敏感,但经四氧化锇后固定,硬塑料或树脂(如 Spurr's 或环氧树脂)包埋、甲苯胺蓝染色(或类似的异染性染剂)的神经横向切片对于准确描述轴突和髓鞘变性也是必不可少的。标准的 HE 染色石蜡包埋切片尤其是横向切片中很难看到髓鞘。神经髓鞘固蓝(Luxol Fast Blue)染色有助于病理学家观察髓鞘^[31],但后固定能充分固定髓鞘,使其完全可视。

5.4 髓鞘泡沫样

轴突明显完整或没有轴突变性的迹象,如巨噬细胞浸润进入肿胀的髓鞘中时,可使用髓鞘泡沫样描述局灶性的髓鞘肿胀。髓鞘泡沫样是继发于轴突变性的肿胀髓鞘(或人工假象),不是主要的形态学改变。

髓鞘的主要成分是脂质,由于髓鞘暴露于组织处理的各种有机溶剂中,石蜡包埋的组织易于出现各种人为的改变。甚至临床前实验中标准的固定方法 10%中性福尔马林溶液也会引起髓鞘的人为开裂。许多髓鞘的人工假象也被描述为“泡沫样”。毒性病理学家的任务是识别人工假象,以及排除这

些人工假象与供试品的特异性相关,因此首先使用变性描述神经纤维、轴突或髓鞘的实际异常,然后说明变性的特征。由髓鞘的局部肿胀引起的髓鞘泡沫样,伴或不伴有轴突变性,也可称为髓鞘卵圆形,但这通常用于广泛性诊断神经纤维变性,不是主要的诊断。如果存在髓鞘的原发性病变,则应使用脱髓鞘或髓鞘质病作为诊断^[32]。

6 结语

神经病理学评价是药物非临床神经毒性评价的重要手段和金标准,同时也是毒理学中的一个难点。现今,我国临床前药物安全评价中,仅在一些减毒活疫苗(如乙脑、麻疹、腮腺炎等)的猴体神经毒力研究中有较为系统的神经病理学评价操作指南。但随着我们对多种中药制剂、化疗药物神经毒性的关注,以及纳米制剂等新剂型的研发,需要尽快开展并形成针对具有神经毒性药物的临床前安全性评价策略,其中毒性病理学或神经病理学评价是核心技术。

为了达到神经病理学评价的国际标准和各地区及同行业间评价标准的一致性,本文参考国际认可的相关神经毒性评价监管指南,包括 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,权威的行业标准以及神经病理学家发表的参考书目和文献^[33-35],主要从影响毒理学中神经病理学评价质量的 5 个方面进行详细的阐述。首先,要明确神经病理学评价的一般策略,虽然每位神经病理学家的评价方法不尽相同,但想获得可信的评价结果还应做到合理和规范。其次,单独提出神经病理学评价的最佳时机,这是神经毒性研究方案设计的重要方面。第三,在药物神经毒性研究中一定要特别注意的一个神经系统特有的组织结构即血脑屏障,许多药物或化合物在体外实验中都可能具有神经毒性,但我们应该考虑其在生理状态下是否能进入神经系统^[36]。第四,一个好的神经组织病理学制片方案决定了病理学诊断的准确性和可靠性,而其中神经组织取材是前提。最后,列举了在神经病理学阅片中常见的几个人工假象,需要与真正由药物引起的神经病变相鉴别。

参考文献

- [1] Bolon B, Butt M. Evaluation of the adult nervous system

- in preclinical studies. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* [M]. Hoboken N J: J Wiley & Sons, Inc., 2011, 321-338.
- [2] Bolon B, D. O'Brien. Localizing neuropathological lesions using neurological findings. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* [M]. Hoboken N J: J Wiley & Sons Inc., 2011: 1-563.
- [3] Moser V. Behavioral model systems for evaluating neuropathology. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* [M]. Hoboken N J: J Wiley & Sons, Inc., 2011: 105-113.
- [4] 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.
- [5] Kaufmann W. Pathology Methods in Nonclinical Neurotoxicity Studies: The Developing Nervous System. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* [M]. Hoboken N J: J John Wiley & Sons Inc., 2011: 339-363.
- [6] Patel M M, Patel B M. Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain [J]. *CNS Drugs*, 2017, 31(2): 109-133.
- [7] Pritam S. Sahota, James A. Popp, Jerry F. Hardisty, et al. Toxicologic pathology nonclinical safety assessment [M]. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2013: 895-930.
- [8] Volpicelli-Daley L A, Levey A. Immunohistochemical localization of proteins in the nervous system. In *Current Protocols in Neuroscience* [M]. Hoboken N J: J John Wiley & Sons Inc., 2004: 1-121.
- [9] Hilbig H, Bidmon H-J, Oppermann O T, et al. Influence of post-mortem delay and storage temperature on the immunohistochemical detection of antigens in the CNS of mice [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2004, 56(3), 159-171.
- [10] 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.
- [11] Krinke G J, Classen W, Vidotto N, et al. Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2001, 53(5): 365-372.
- [12] de Olmos I S, Beltramino C A, de Olmos de Lorenzo S. Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 1994, 16(6), 545-561.
- [13] Garman R H, Li A A, 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] Seger S, Stritt M, Doppler K, et al. A semi-automated method to assess intraepidermal nerve fibre density in human skin biopsies [J]. *Histopathology*, 2016, 68(5): 657-665.
- [15] Switzer, R. Fundamentals of neurotoxicity detection. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* [M]. Hoboken N J: J Wiley & Sons Inc., 2011: 1-57.
- [16] Fix A S, Ross J F, Stitzel S R, et al. Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex [J]. *Toxicol Pathol*, 1996, 24(3): 291-304.
- [17] Trujillo K A. Neuroanatomy and Neural Development on the Internet (California State University: San Marcos, CA) [EB/OL]. (2001-01-01)[2009-12-21]. <http://courses.csusm.edu/psyc391kt/linksanat.html>.
- [18] Banks W A. Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders [J]. *J Neurovirol*, 1999, 5(6): 538-555.
- [19] Vernau W, Vernau K M, and Bolon B. Cerebrospinal fluid analysis in toxicological neuropathology. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* [M]. Hoboken N J: J Wiley & Sons Inc., 2011: 271-283.
- [20] Azzi G, Bernaudin J, Bouchaud C, et al. Permeability of the normal rat brain, spinal cord and dorsal root ganglia microcirculations to immunoglobulins G [J]. *Biol Cell*, 1990, 68(1): 31-36.
- [21] 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.
- [22] Bolon B, Garman R H, Pardo I D, 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.
- [23] Rao D B, Little P B, Malarkey D E, 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.
- [24] Pardo I D, Garman RH, Weber K, et al. Technical guide for nervous system sampling of the cynomolgus monkey for general toxicity studies [J]. *Toxicologic Pathology*, 2012, 40 (4): 624.
- [25] Bolon B, Garman R, Jensen K. A 'best practices' approach to neuropathologic assessment in developmental neurotoxicity testing--for today [J]. *Toxicologic Pathology*, 2006, 34 (3): 296-313.
- [26] Pardo I D, Garman R H, 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.
- [27] Garman R. Common histologic artifacts in nervous system tissues. In *Fundamental Neuropathology for Pathologists and Toxicologists: Principles and Techniques* [M]. Hoboken N J: J Wiley and Sons Inc., 2011.
- [28] Wells G A H, Wells M. Neuropil vacuolation in brain: A reproducible histological processing artefact [J]. *J Comp Pathol*, 1989, 101(4): 355-362.
- [29] Rogers-Corone T, Burgess M, Hinckley J, et al. Vacuolation of sensory ganglion neuron cytoplasm in rats with long-term organophosphates [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38(4): 554-559.
- [30] Hannoun S, Durand-Dubief F, Roch J A, et al. Tracking successive Wallerian degenerations in a relapsing-remitting multiple sclerosis patient [J]. *J Neuroradiol*, 2016, 43(5): 359-361.
- [31] Carriel V, Campos A, Alaminos M, et al. Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System [J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1560: 207-218.
- [32] Watanabe S, Murayama A, Haginoya K, et al. Structural changes of the neuronal and stromal components of the n. tibialis in the case of diabetes mellitus [J]. *Brain Dev*, 2012, 34(2): 151-155.
- [33] Makris S L, 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.
- [34] Raffaele K C, Rowland J, May B, et al. The Use of Developmental Neurotoxicity Data in Pesticide Risk Assessments [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, 32(5): 563-572.
- [35] Tsuji R, Crofton K M. Developmental Neurotoxicity Guideline Study: Issues With Methodology, Evaluation and Regulation [J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2012, 52(3): 122-128.
- [36] ASalvati E, Re F, Sesana S, et al. Liposomes functionalized to overcome the blood-brain barrier and to target amyloid- β peptide: the chemical design affects the permeability across an *in vitro* model [J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 1749-1758.