

## 药物神经毒性评价体外模型的研究进展

田康<sup>1,2</sup>, 黄芝瑛<sup>2</sup>, 王雪<sup>1</sup>, 耿兴超<sup>1</sup>, 李波<sup>3</sup>, 吕建军<sup>1\*</sup>, 屈哲<sup>1\*</sup>

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. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

3. 中国食品药品检定研究院, 北京 100051

**摘要:** 神经毒性是药物安全性评价的重要方面。体外模型相比较体内动物实验在药物高通量筛选、分子机制研究、检测分析技术应用上具有显著优势。至今, 研究和评价药物神经毒性的体外模型主要包括原代神经细胞培养、神经细胞系培养、诱导神经干细胞分化模型, 三维细胞培养模型等。这些体外模型的复杂程度、对药物的敏感性及其检测方法不尽相同。概述各种神经毒性体外模型的应用领域及研究进展, 提出了神经毒性体外评价模型研究应用中存在的问题及今后的发展方向。

**关键词:** 神经毒性; 体外模型; 神经干细胞; 三维细胞培养

中图分类号: R99 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 07-1433-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.07.043

## Research progress on *in vitro* models for evaluating drug-induced neurotoxicity

TIAN Kang<sup>1,2</sup>, HUANG Zhiying<sup>2</sup>, WANG Xue<sup>1</sup>, GENG Xingchao<sup>1</sup>, LI Bo<sup>3</sup>, LÜ Jianjun<sup>1</sup>, QU Zhe<sup>1</sup>

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. School of Pharmaceutical Sciences Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100051, China

**Abstract:** Neurotoxicity assessment represents an important aspect of drug safety evaluation. *In vitro* models compared with *in vivo* animal experiments have several significant advantages in high-throughput drug screening, molecular mechanism research, application of detection and analysis technology. Up to now, the *in vitro* models for studying and evaluating drug-induced neurotoxicity mainly include primary neural cell culture, neuronal cell line culture, induced neural stem cell differentiation model, three-dimensional (3D) cell culture models, etc. These *in vitro* models are different in complexity, sensitivity to drugs, and detection methods. In this paper, we summarized the application fields and research progress of various *in vitro* models for evaluating neurotoxicity, and put forward the problems and future development directions in the research and application of *in vitro* models of neurotoxicity evaluation.

**Key words:** neurotoxicity; *in vitro* models; neural stem cells; 3D cell culture

神经毒性(Neurotoxicity, NT)是许多药物及先导化合物常见的毒副作用, 早期筛选神经毒性药物可避免药品研发企业后续的大量投入。现今, 经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)和国际人用药品注册技术要求国际协调会(The International

Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)关于神经毒性评价的指导原则仅限于体内实验<sup>[1-2]</sup>。动物实验主要依靠神经行为学观察和组织病理学检查方法, 其结果主观性强、实验周期长、成本高, 且不能从毒性作用机制上解释和评价药物的

收稿日期: 2020-02-23

基金项目: 十三五重大新药创制专项课题“创新药物非临床安全性评价研究关键技术”(2018ZX09201017)

第一作者: 田康, 研究生, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: tiank3@mail2.sysu.edu.cn

\*通信作者: 吕建军, 主任药师, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: (010)67872233-8005 E-mail: lvjianjun@nifdc.org.cn

屈哲, 副研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。Tel: (010)67872233-8210 E-mail: quzhe@nifdc.org.cn

神经毒性。在2003年,欧洲替代方法验证中心(European Center for Validation of Alternative Methods, ECVAM)要求建立可靠健全的体外毒理测试系统和监管体系,但是目前还没有神经毒性危险评估的体外方法指导原则<sup>[3]</sup>。

然而,神经毒性体外模型已用于基础研究领域很多年,尽管具有一定的局限性,如缺乏细胞代谢能力、复杂的细胞间相互作用、时间和区域依赖性的细胞间协调表达等<sup>[4]</sup>,但是相比较动物实验,体外方法仍具有显著优点:(1)人源细胞模型避免了种属差异问题。只有50%以下的啮齿类动物实验能够预测人体毒性。动物模型在致畸性研究中更难进行预测<sup>[5]</sup>。(2)体外模型给药浓度更接近真实浓度,而动物模型则需要更高的药物剂量。(3)遵循动物实验的减少、优化和替代(Reduction, Refinement, Replacement, 3R)原则。(4)高通量筛选药物,节约了经济和时间成本,提高了安全性评价的可信度。(5)可在细胞水平和分子机制水平进行研究。(6)模拟神经发育的各个阶段,评价发育神经毒性,成熟神经细胞毒性。

由于中枢神经系统解剖学和生理学的复杂性,体外模型模拟体内功能需要各类神经细胞包括神经元和胶质细胞来维持复杂且完整的结构。总的来说,模型越复杂,与体内相似度就越高。从单细胞模型如神经元、胶质细胞培养,到混合细胞模型如原代细胞培养、三维(three-dimensional, 3D)细胞培养,再到脑切片培养。依据神经细胞培养特点和实验目的选择合适的体外模型,对于药物神经毒性评价至关重要。

## 1 原代神经细胞

原代培养是指从外周神经系统或者中枢神经系统取材,在培养基中维持24小时以上的培养方法。原代培养神经细胞的优点是能够维持发育过程中的关键事件以及细胞功能,如区域特异性、受体和神经递质的表达、神经元和胶质细胞的相互作用。原代神经元更接近体内情况。在神经毒性评价中,可以根据不同细胞类型对药物的敏感度选择不同的模型,在培养过程中阻断胶质细胞的增殖来定向分化神经元或者神经元和胶质细胞共培养。啮齿类动物原代神经细胞的研究领域较为广泛,有报道通过实时微波曝光结合激光扫描共聚焦显微镜检测微波对原代海马神经元的钙水平研究,发现原代海马神经元比原代心肌细胞对微波更敏感,且线粒体的敏感性高于内质网<sup>[6]</sup>。通过表征原代大鼠

海马神经元中亚铁转运蛋白及基质细胞衍生受体2的表达和定位来阐明神经元中铁运输的分子机制<sup>[7]</sup>。

星形胶质细胞在原代混合细胞培养中也应作为药物神经毒性的靶标进行评价。星形胶质细胞可以干扰药物对原代神经元神经突生长的抑制作用,是由于星形胶质细胞不仅支持神经元的生长,改变神经元对毒性化合物的反应程度,而且还通过星形胶质细胞-神经元介导中的谷氨酸-谷氨酰胺循环来传导神经元功能。研究表明神经毒性药物使原代星形胶质细胞的胞外谷氨酸和谷氨酰胺浓度改变,氨酰胺合酶活性降低,谷氨酸转运蛋白和谷氨酰胺转运蛋白的基因表达降低,从而使神经元氧化-抗氧化失衡,细胞凋亡增加和自噬异常<sup>[8]</sup>。

然而,原代细胞培养成本较高,对研究者以及硬件的要求高,且较难维持培养物的稳定性,限制其用于进一步研究。分离获取的原代神经细胞形态、功能、以及细胞间的相互作用会发生改变,代谢能力下降,影响对药物的反应性。但是,有研究表明采用机械研磨和沉淀法代替胰蛋白酶消化过滤分离和制备的新生Wistar大鼠原代海马神经元,均匀度和纯度较高,存活期长,且能节省时间、成本,降低污染风险<sup>[9]</sup>。原代细胞取材受限于供体,对于长期实验则需要冷冻保存,常规的冷冻方法可用于保存原代神经元<sup>[10]</sup>,但细胞活力差和存活率降低,高性能的冷冻培养基对原代小鼠胚胎皮层神经元有更好的保护作用,如此保存的神经元与新鲜神经元培养物的效果等同<sup>[11]</sup>。

原代神经细胞取材麻烦,培养成本高,且不能长期维持培养,但是能较高度维持细胞的原生特性,因此可用于实验周期短,对细胞生理代谢功能要求严格的药物筛选,为申请临床实验提供参考指标。

## 2 神经细胞系

神经细胞系是最简单的体外模型,细胞可以在培养基中增殖传代,在较短时间内获得大量细胞。细胞系通常来源于肿瘤细胞,还可以通过逆转录病毒将致癌基因导入原代培养。常用的神经细胞系有神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)、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。肿瘤来源的神经细胞系易于培养,性质稳定。

SH-SY5Y被广泛用于模拟帕金森综合

征(Parkinson's disease, PD)模型<sup>[12]</sup>,具有儿茶酚胺能神经元特性,虽然来源于癌变,但却没有改变与PD相关的基因和通路<sup>[13]</sup>。此外,SH-SY5Y还被广泛用于其它神经科学模型,如阿尔茨海默症、神经缺血、肌萎缩性脊髓侧索硬化、神经缺氧的研究<sup>[14-17]</sup>。已经有很多实验分化SH-SY5Y,获得不同神经元特性的亚型细胞,但分化比例、分化后细胞的选择性和特性尚无系统报道<sup>[12]</sup>。PC12细胞用于模拟脑缺血再灌注损伤特性,常见的研究机制包括钙超载、氧化还原电势、脂质过氧化和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)调节等<sup>[18]</sup>。PC12细胞具有两个不同的囊泡池,相对于其他神经分泌模型(包括嗜铬细胞)具有一定优势,被用于研究神经递质的传递和摄取<sup>[19]</sup>。C6癌细胞系是大鼠神经胶质瘤细胞系,可以整体模拟多形胶质母细胞瘤的高速生长,高血管化和高度浸润特性,是一种安全常用的神经胶质瘤模型<sup>[20]</sup>。小鼠胚胎瘤P19与人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y和大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞PC12相比,对甲基汞、丙烯酰胺的细胞毒性更为敏感,可能是研究化学物质神经毒性作用的有效模型<sup>[21]</sup>。

在神经细胞系培养过程中,可以通过添加诱导剂和生长因子,使其分化成类神经元,以控制实验进程及调整实验设计。这些优点使神经细胞系培养可以用于高通量筛选,而且很多细胞系都是人源的,因此对于预测药物对人的毒性作用具有优势。但是细胞系培养和原代细胞有所不同,细胞在增殖过程中可能丢失或改变一些复杂的特性。

神经细胞系适用于构建特定的疾病模型,如阿尔茨海默症、帕金森综合征等,因为神经细胞系可以多次传代培养,维持成本较低,但是由于癌变基因的原因,细胞的生理功能会发生一定程度的改变,所以可用于先导化合物、环境污染物如重金属等的早期大量筛选。

### 3 神经干细胞

神经干细胞(neural stem cells, NSC)可以自我更新并且能够分化产生3种组成中枢神经的主要细胞类型:神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。人神经干细胞主要来自囊胚中分离的胚胎干细胞、人脐带血分离的干细胞、骨髓中分离的多功能祖细胞,以及中枢神经组织或者其它组织。现今,多数商品化的神经干细胞都是由诱导多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)分化获得,避免了伦理争议和法律问题。但是神经干细胞具

有寿命限制,在传代一定次数后,神经干细胞容易自发分化或者不可逆的生长停滞。近年来发展的已商品化的人胚永生性神经干细胞,如皮质、中脑源的神经祖细胞(ReNcell)、端脑源的神经祖细胞(hSN12W-TERT)、源于胚胎干细胞H9的神经祖细胞(ENStemA)<sup>[22]</sup>,由于具备可传代性和多能分化性(根据不同需要诱导分化为多巴胺神经元、胆碱能神经元、 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)能神经元、星形胶质细胞等细胞类型),是药物神经毒性筛选的良好工具。

神经干细胞可以直接作为毒理学工具评估发育神经毒性。研究用镍抑制NSC的增殖和分化,发现与磷酸化Ras家族-1(phosphorylated Ras family-1)、磷酸化丝裂原细胞外激酶1/2(phosphorylated mitogen extracellular kinase1/2, p-MEK1/2)和磷酸化细胞外调节蛋白激酶1/2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, 1/2p-ERK1/2)的蛋白质水平上调有关<sup>[23]</sup>,证实了干细胞分析用于发育神经毒性测试的可行性和可靠性。NSC也可以经诱导分化后评价神经毒性,磷脂酶D1(phospholipase D1, PLD1)介导的信号分子可通过介导Rho家族的鸟苷三磷酸酶(guanosine triphosphatase, GTPases)和 $Ca^{2+}$ 依赖性信号传导调节Src同源区2蛋白酪氨酸磷酸酶-1/信号转导与转录激活因子3(Src-homology protein tyrosine phosphatase-1/Signal transducer and activator of transcription 3, SHP-1/STAT3)激活动态调节神经干细胞的神经元分化<sup>[24]</sup>。此外,电刺激激活特定的离子通道如钠离子通道 $\alpha 1$ 亚单位基因(sodium channel  $\alpha 1$  subunit gene, SCN1 $\alpha$ )和L型钙离子通道 $\alpha 1C$ 亚基基因(calcium channel, voltage-dependent, L-type,  $\alpha 1C$  subunit gene, CACNA1C)来影响NSC分化,电刺激的感应电场可以指导轴突生长并诱导定向细胞迁移,而电磁场促进神经发生和NSC分化为功能性神经元<sup>[25]</sup>。神经嵴细胞(Neural crest cell, NCC)是发育胚胎中的多能和迁移细胞群。NCC的发育,分化和迁移缺陷可导致一类被称为神经病变的综合征和疾病。近年来,许多研究涉及NCC发育和相关疾病,建立了从人多能干细胞(human pluripotent stem cells, hPSC)衍生NCC的方案,并进一步将这些NCC分化为神经细胞,间充质细胞和其它谱系,深入地研究了人类神经嵴发育中涉及的分子机制<sup>[26]</sup>。

总之,干细胞不仅能定向分化为具有特定功能

的各类神经细胞如多巴胺能神经元、胆碱能神经元等,用于神经系统的功能-生理学评价,还能为毒理基因组学,生物信息学,系统生物学和表观遗传学研究提供新的模型<sup>[27]</sup>。因此,神经干细胞模型最有望替代动物实验用于药物临床前的安全性评价及毒性机制研究。

#### 4 三维细胞培养

目前普遍使用的神经细胞体外培养方式除了单层贴壁培养、悬浮神经球培养,还有3D支架培养。单层贴壁培养操作简单、环境可控性强、样品特征性和均一性好,但细胞在体外去分化后很难完成某些代谢功能。悬浮神经球培养,实现了神经干细胞的高密度悬浮培养,但随着神经球尺寸增大,球内细胞生长所需营养无法及时获得,导致球中心部位出大量细胞坏死和凋亡。与其它两种相比,3D培养体系可以使细胞间具有一定的空间排列形式,在空间和时间上可以相互调控关键的生理功能,进而实现整个器官或者组织的功能。3D培养体系不只是支架材料的固定结构,还要有可以维持细胞、组织和器官生存的生理环境,模拟体内的可溶性分泌因子作用,电信号传输以及细胞外基质介导的机械传导。

研究用导电纳米材料做功能性支架可以指导神经细胞的生长,分化和建立复杂的神经组织模式。纳米材料可能对神经细胞迁移和分化具有位置和电学提示的综合作用<sup>[25]</sup>。此外,还有用基质胶或IKVAV-3肽功能化的水凝胶作为3D支架模拟体内三维细胞微环境进行培养,同时评估在其中生长的神经球是否能进行发育神经毒性化合物甲基汞测试,结果表明这些条件支持人类神经干细胞的迁移,向神经元的分化以及神经网络的形成,且发现在3D支架培养中,甲基汞对神经干细胞的迁移抑制效力高于在层黏连蛋白涂层表面上的培养<sup>[28]</sup>,说明3D支架模型的灵敏度高于普通培养。有研究利用人胚胎干细胞诱导的神经祖母细胞,生成体外三维人类神经组织,这些3D神经组织可以维持2个月,并逐渐分化,早期神经系统标志物的表达逐渐减少,成熟神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的特异性标志物的表达逐渐增加,发育生长出突触和轴突周围未成熟的髓鞘,电生理检测也显示出自发电活动<sup>[29]</sup>,这些结果都证明了其潜在的体外神经毒性检测能力。用1-甲基-4-苯基吡啶离子(1-methyl-4-phenylpyridinium iodide, MPP<sup>+</sup>)、衣霉素和环氧脂肪酸处理的SH-SY5Y和永生化人类多巴胺能

神经元前体细胞系(lund human mesencephalic, LUHMES)神经毒性模型与3D培养相比,在2D培养模型中用这3种毒物处理后的SH-SY5Y细胞活力明显较低,但是LUHMES分别在3D与2D生长条件下未显示出显著差异。然而,LUHMES比SH-SY5Y细胞对MPP<sup>+</sup>,衣霉素和环氧霉素更敏感。因此,在解释体外神经毒性数据时,应同时考虑细胞系和生长环境<sup>[30]</sup>。

如果将3D人神经细胞体外培养系统与高内涵细胞成像分析技术(high connotation analysis, HCA)有效结合将有助于药物神经毒性评价,不仅能够降低成本,实现高通量,尤其对人类危害识别的可预测性更高。因此,开发先进的图像识别系统和计算方法,可提高对神经元识别的阳性率,降低错误发现率,增强复合效应评估如评价“神经球特定”终点,径向迁移和迁移区域内的神经元密度分布<sup>[31]</sup>。

随着材料科学以及系统生物学的发展,三维培养技术近年来发展迅速。现在已经用于类器官的培养、脑片的培养,更能完整准确地体现细胞间的相互作用。相比较普通培养,三维培养更为敏感,因此在药物对人体出现毒性反应之前,可以用三维培养模型提前预测毒性。对能够影响神经网络整体活动的药物,如抗癫痫药、免疫抑制类药,可以选择三维培养模型。

#### 5 总结与展望

体外模型在评价药物神经毒性和研究毒性作用机制上发挥着重要作用,相比较动物实验具有独特的优势。原代细胞培养成本高、取材受限,因此需要提高试验操作,选择质量更好的培养基以及发展原代细胞的冻存复苏技术。神经细胞系和神经干细在培养过程中细胞生理功能可能发生改变,可以采用组学技术如基因组学、蛋白质组学等,比较神经细胞系、神经干细胞和原代细胞在关键基因的表达情况,使细胞系细胞和神经干细胞模型的生理功能更接近原代细胞。

在多种类神经毒性评价体外模型研究的快速发展中仍存在以下需要关注的问题:(1)国内外尚无神经毒性体外评价的指导原则,没有统一的标准。(2)如何将体外模型结果推至体内作用效果。体内存在血脑屏障、肝肾代谢,所以应建立科学的药代动力模型把药物浓度进行转化。(3)神经毒性体外模型应经过方法学的验证,确保模型的稳定性、灵敏度,同时还应考虑体外模型要与体外检测方法相适应。(4)组合式和单一式实验相结合,选择

多种检测技术和方法。由于神经系统的复杂性,因此需要判断特异性神经毒性,可以把组合式和分阶段相结合。将多种模型组合后用于研究,并对实验结果进行综合判定,能比较全面分析药物神经毒性特征。采用组合式实验方法能有效降低由于神经系统复杂性及测试指标多样性带来的结果判定上的困难。

总之,将体外模型用于药物神经毒性评价,应根据药物特性,细胞敏感度,选择适合的体外模型。今后,探索开发新型的可全面评估神经系统功能(如认知,运动和学习)的体外模型是研究神经毒性体外替代方法的发展方向。

#### 参考文献

- [1] The guidelines of the Organisation for Economic Co-operation and Development. Test No 424 neurotoxicity study in rodents Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study [S]. 2007.
- [2] The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. S11 Nonclinical Safety Testing [S]. 2009.
- [3] Hartung T, Bremer S, Casati S, et al. ECVAM's response to the changing political environment for alternatives: consequences of the European Union chemicals and cosmetics policies [J]. *Altern Lab Anim*, 2003, 31(5): 473-481.
- [4] Rice D, Barone S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108 (Suppl3): S511-S533.
- [5] Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2000, 32(1): 56-67.
- [6] Jing Z, Hui W, Bo Z, et al. Real-time microwave exposure induces calcium efflux in primary hippocampal neurons and primary cardiomyocytes [J]. *Biomed Environ Sci*, 2018, 31(8): 561-571.
- [7] Ji C, Kosman D J. Molecular mechanisms of non-transferrin-bound and transferrin-bound iron uptake in primary hippocampal neurons [J]. *Neurochem*, 2015, 133 (5): 668-683.
- [8] Li Z, Liu Q, Liu C, Shao J. Evaluation of PFOS-mediated neurotoxicity in rat primary neurons and astrocytes cultured separately or in co-culture [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 38: 77-90.
- [9] 张小娟, 李延玉, 刘友学. 简易大鼠海马神经元原代培养方法及神经元兴奋性检测 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(9): 2080-2083.
- [10] Schwarz S, Spitzbarth I, Baumgärtner W, et al. Cryopreservation of canine primary dorsal root ganglion neurons and its impact upon susceptibility to paramyxovirus infection [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(5): 1-17.
- [11] Parker S S, Moutal A, Cai S, Mouneimne G, et al. High fidelity cryopreservation and recovery of primary rodent cortical neurons [J]. *eNeuro*, 2018, 5(5): 1-21.
- [12] Xicoy H, Wieringa B, Martens G J. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review [J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(10): 1-11.
- [13] Krishna A, Biryukov M, Trefois C, et al. Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15: 1-21.
- [14] Zhang M, Zhang Y Q, Wei X Z, et al. Differentially expressed long-chain noncoding RNAs in human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y): Alzheimer's disease cell model [J]. *Toxicol Environ Health A*, 2019, 82(19): 1052-1060.
- [15] Dong R F, Tai L W, Zhang B, et al. Neuroprotective effect of FMS-like tyrosine kinase-3 silence on cerebral ischemia/reperfusion injury in a SH-SY5Y cell line [J]. *Gene*, 2019, 697: 152-158.
- [16] Rizza S, Cirotti C, Montagna C, et al. S-nitrosoglutathione reductase plays opposite roles in SH-SY5Y models of Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 536238: 1-12.
- [17] Song Y K, Li Z, Wang Y, et al. Inhibition of BAG-1 induced SH-SY5Y cell apoptosis without affecting Hsp70 expression [J]. *Cell Biochem*, 2020, 121(2): 1728-1735.
- [18] Lahiani A, Brand-Yavin A, Yavin E, et al. Neuroprotective effects of bioactive compounds and mapk pathway modulation in "ischemia"-stressed PC12 pheochromocytoma cells [J]. *Brain Sci*, 2018, 8(32): 1-31.
- [19] Hu L, Savy A, Grimaud L, et al. Electroactive fluorescent false neurotransmitter FFN102 partially replaces dopamine in PC12 cell vesicles [J]. *Biophys Chem*, 2019, 2 (245): 1-5
- [20] Giakoumettis D, Kritis A, Foroglou N, et al. C6 cell line: the gold standard in glioma research [J]. *Hippokratia*, 2018, 22(3): 105-112.
- [21] Popova D, Karlsson J, Jacobsson S O P, et al. Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2017, 18(42): 1-11.

- [22] Ma W, Suh W H. Cost-effective cosmetic-grade hyaluronan , hydrogels for ReNcell VM human neural stem cell culture [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(515): 1-16.
- [23] Zhou Y, Fu Y, Bai Z, Zhang J, et al. Neural differentiation of mouse neural stem cells as a tool to assess developmental neurotoxicity of drinking water in Taihu Lake [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2019, 190(1): 172-186.
- [24] Park, S Y, Han, J S. Phospholipase D1 signaling: essential roles in neural stem cell differentiation [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(3): 333-340.
- [25] Zhu R, Sun Z, Li C. et al. Electrical stimulation affects neural stem cell fate and function *in vitro* [J]. *Exp Neurol*, 2019, 319: 1-15.
- [26] Srinivasan A, Toh Y C. Human Pluripotent stem cell-derived neural crest cells for tissue regeneration and disease modeling [J]. *Front Mol Neurosci*, 2019, 12(39): 1-8.
- [27] Hong Y, Chan N, Begum, A N. Deriving neural cells from pluripotent stem cells for nanotoxicity testing [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1894: 57-72.
- [28] Hellwig C, Barenys M, Baumann J, et al. Culture of human neurospheres in 3D scaffolds for developmental neurotoxicity testing [J]. *Toxicol In Vitro*, 2018, 52: 106-115.
- [29] Sandström J, Eggermann E, Charvet I, Stoppini L. Development and characterization of a human embryonic stem cell-derived 3D neural tissue model for neurotoxicity testing [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 38: 124-135.
- [30] Ko K R, Tam N W, Teixeira A G, et al. SH-SY5Y and LUHMES cells display differential sensitivity to MPP+, tunicamycin, and epoxomicin in 2D and 3D cell culture [J]. *Biotechnol Prog*, 2020, 36(2): 1-40.
- [31] Schmuck M R, Temme T, Dach K, et al. Omnisphero: a high-content image analysis (HCA) approach for phenotypic developmental neurotoxicity (DNT) screenings of organoid neurosphere cultures *in vitro*[J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(4): 2017-2028.