

神经毒性评价策略及技术方法的研究进展

刘玉玲¹, 谢寅^{1#}, 霍桂桃¹, 李双星¹, 杨艳伟¹, 张頤¹, 林志¹, 耿兴超^{2*}, 屈哲^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院安全评价研究所, 细胞及基因治疗药物质量和非临床研究与评价北京市重点实验室, 药品监管科学全国重点实验室, 北京 100176
2. 中国食品药品检定研究院生物制品检定所, 北京 102629

摘要: 系统阐述目前国内外神经毒性评价的相关策略及监管指南。伴随急性毒性研究、慢性毒性研究、发育/生殖毒性研究所开展的一般神经毒性评价依循 OECD 和 ICH 多项准则, 主要通过动物体内的神经行为学检查和组织病理学检查方法进行评估。注重多方面观察指标, 警惕假阳性干扰。分层评价策略针对大量筛选化合物, 首先排除不太可能具有神经毒性的物质, 减少资源浪费。通过危害识别、靶点或作用机制确认和有害结局路径 (AOP) 框架评估 3 个层次完成评价。对于一些神经毒性评价药物其临床前动物实验的给药方式比较特殊, 如颅内注射给药, 研究者需关注特殊给药方式的评价特点和风险。沿用体内评价方法的同时, 体外模型在神经毒性评价中也应用已久并不断发展新的体外模型。类器官因优势明显成为更好选择, 类器官智能领域为神经毒性评价带来新方向。总之, 这些评价策略与方法有助于提高对神经毒性的识别与管理水平, 为药物研发和安全性评估提供重要参考。

关键词: 神经毒性; 神经毒性评价; 指南; 分层评价策略; 颅内注射给药; 类器官

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)12-3729-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.028

Overview of strategies and regulatory guidelines for neurotoxicity evaluation

LIU Yuling¹, XIE Yin¹, HUO Guitao¹, LI Shuangxing¹, YANG Yanwei¹, ZHANG Di¹, LIN Zhi¹, GENG Xingchao², QU Zhe¹

1. Beijing Key Laboratory of Quality Control and Non-Clinical Research and Evaluation for Cellular and Gene Therapy Medicinal Products, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, Institute for Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. Institute for Biological Products Control, National Institute for Food and Drug Control, Beijing 102629, China

Abstract: Systematically elucidates the key aspects of current strategies and regulatory guidelines for neurotoxicity evaluation in global drug development. Routine neurotoxicity assessment conducted alongside acute toxicity studies, chronic toxicity studies, and developmental/reproductive toxicity investigations typically adhere to multiple OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) and ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) guidelines, primarily employing neurobehavioral examinations and histopathological analyses in animal models. A multi-parametric observation system is emphasized to minimize false-positive interference. A tiered evaluation approach can effectively screen substances, thereby reducing resource expenditure. The evaluation is completed through three levels: hazard identification, target or mode of action confirmation, and adverse outcome pathway framework assessment. Special administration routes (e.g., intracranial injection) in preclinical studies require protocol customization to address unique pharmacokinetic characteristics and risk profiles. While traditional *in vivo* methods remain fundamental, *in vitro* models have evolved significantly through technological advancements. Organoids, due to their demonstrable benefits, are emerging as a superior alternative. The application of “organoid intelligence”

收稿日期: 2025-09-01

基金项目: 干细胞及其衍生物创新药非临床评价关键技术研究资助项目 (2024YFA1107302)

作者简介: 刘玉玲, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: 13865086540@163.com

#共同第一作者: 谢寅, 男, 学士, 助理研究员, 研究方向为药物安全性评价。E-mail: xieyin1974@163.com

*通信作者: 屈哲, 女, 博士, 研究员, 主要研究方向为药物安全性评价。E-mail: quzhe@nifdc.org.cn

耿兴超, 男, 博士, 研究员, 研究方向为药物非临床安全性评价。E-mail: gengxch@nifdc.org.cn

promises to open new avenues for neurotoxicity assessment. In conclusion, these evaluation strategies and methodologies contribute to enhanced identification and management of neurotoxic potential, ultimately providing essential benchmarks for drug development and safety assessment.

Key words: neurotoxicity; neurotoxicity evaluation; guideline; hierarchical evaluation strategy; intracranial injection; organoids

神经毒性是指外源化学物质对神经系统结构和功能造成的损害,可能导致神经元损伤、功能障碍甚至死亡。神经毒性评价是对化合物可能引起的神经系统不良反应的系统性评估,旨在确保化合物安全,预防潜在的中枢和外周神经系统损害,保护公众健康。

不同监管机构对神经毒性测试有不同要求。美国环保局农药项目办公室(USEPA OPP)要求对所有食品用农药进行成人急性和亚慢性神经毒性试验^[1]。其他监管机构如国际经济合作与发展组织(OECD)建议首先进行标准毒性测试,这些测试的终点涉及多个器官系统,神经系统亦在其中。若结果显示对神经系统存在潜在影响,则进一步开展神经毒性的专门评估^[2]。同样,美国食品药品监督管理局(FDA)2000年发布的《Redbook 2000》也推荐使用分层测试的方法来评估化学品的神经毒性潜力^[3]。笔者总结目前神经毒性的评价策略及方法,旨在为化合物以及创新药物研发和安全性评价提供理论依据和实践指导。

1 一般神经毒性评价原则

1.1 神经毒性评价的指导原则

一般神经毒性评价是对化合物可能引起的神经系统损害进行评估,包括急性毒性、慢性毒性以及发育/生殖毒性研究。参考OECD Test Guideline NO.418(OECD TG418)《急性暴露后有机磷物质的迟发性神经毒性》^[4]、OECD Test Guideline NO.419(OECD TG419)《有机磷物质的迟发性神经毒性:28天重复剂量研究》^[5]、OECD Test Guideline NO.424(OECD TG424)《啮齿类动物神经毒性研究》^[6]及OECD Test Guideline NO.426(OECD TG426)《发育神经毒性研究》^[7],以及人用药品注册技术要求协调化国际会议(ICH)发布的指导原则,如S5(R3)《人用药物生殖毒性检测指导原则》^[8],非小分子化合物的生物药也有其专属指导原则——S6(R1)《生物技术衍生药物的临床前安全性评价》^[9],同时适用于人用新化学实体和生物制品的有S7A《人用药品安全药理学试验指导原则》^[10]。

这些指导原则详细规定了各种神经毒性测试的实验设计、数据分析和报告要求,为国际间的神经毒性评价提供了标准化参考。研究收集了包括神

经系统在内的所有主要器官系统的功能和/或组织病理学评价信息^[2]。

OECD TG418采用家鸡模型,通过单次口服给药,核心在于测定给药后24~48 h内脑和脊髓中神经毒性酯酶(NTE)的活性抑制情况,并观察10~20 d后是否出现相应的延迟性临床症状与形态学改变。

OECD TG419作为TG418的补充,侧重于更长期的暴露,通过至少28 d的重复给药,综合评估行为、神经病理学改变及剂量-反应关系。此外,该指南还提供了关于如何根据其他数据(如单次剂量研究、体外筛选测试或结构活性关系)来设定初始剂量的指导。

OECD TG424提供了一个通用的神经毒性框架,可独立进行或与重复剂量毒性研究结合。该指南要求系统记录动物的神经行为学、神经病理学损伤,并可拓展至生化及分子生物学指标。

OECD TG426专注于评估生命早期暴露于化学物质对于子代神经系统发育和功能的潜在影响。该指南强调在发育关键窗口期给药,并全面评估子代神经系统的结构、功能和行为发育。

值得注意的是,基于OECD TG418,衍生出了发育神经毒性(DNT)体外组合实验(IVB),它利用人和啮齿类动物细胞测试多种关键的神经发育过程,为高通量初步筛选提供了工具^[11-12]。然而,DNT IVB目前尚不能完全模拟发育中神经系统的复杂特性,也无法代替整体动物实验来最终判定化学物质的人体发育神经毒性。

主要神经毒性评价指导原则对比情况见表1。

1.2 一般神经毒性评价方法

指导原则要求的一般神经毒性评价采用体内评价方法,包括行为学、神经生化、神经电生理、神经影像等方面^[13-14]。

行为学评价通过观察实验动物在化合物暴露后的行为变化来评估其对神经系统的影响。评价指标包括运动活性(评估动物的移动频率、速度等以反映其神经系统对运动控制的调节能力)、学习记忆能力(通过迷宫测试、条件反射等方法评估认知功能)、感觉功能(测试触觉、触觉、听觉等感官反应判断感觉系统是否受损)等。

表1 主要神经毒性评价指导原则对比
Table 1 Comparison of main guidelines for neurotoxicity evaluation

评价指南	应用对象	动物模型	关键检测终点与特点
OECD TG 418	有机磷单次暴露	家鸡	检测 NTE 活性, 观察延迟症状
OECD TG 419	有机磷重复暴露	家鸡	28 d 行为与病理综合评估
OECD TG 424	通用化学品	啮齿类	系统评估行为与病理损伤, 应用广泛
OECD TG 426	发育神经毒性	啮齿类	全面终点: 评估子代神经发育
ICH S5(R3)	小分子药物	常规使用大鼠/小鼠	严格遵循 GLP 规范, 间接评估发育神经毒性
ICH S6(R1)	生物制品	优先使用非人灵长类	物种特异性强, 策略灵活

神经生化评价通过定量分析神经组织或体液中的生物分子水平变化来揭示毒性作用靶点与潜在机制。常用技术包括高效液相色谱法 (HPLC)、放射免疫分析法 (RIA)、酶联免疫吸附实验 (ELISA) 等。

鉴于神经细胞通过电位传递信息, 电生理方法可直接、灵敏地记录神经元的功能状态。神经传导速度显著下降、波幅升高或降低等参数变化均是神经毒性的重要指征。常用于评价的仪器包括脑电图仪、诱发电位仪、神经肌肉传递仪。

神经病理评价通过显微镜直接观察神经系统组织的形态学变化, 观察神经元的形态变化, 如胞体萎缩、核固缩等, 以评估化学物质对神经元的损伤程度; 观察神经纤维的形态变化, 如脱髓鞘、轴突变性等, 以评估化学物质对神经纤维的损伤; 观察神经系统组织中的炎症反应, 如炎症

细胞浸润、水肿等, 以评估化学物质对神经系统的炎症反应。

神经毒性评价中重点关注功能观察组合实验 (FOB)、运动活动测量和神经病理检查^[15], FOB 包含数 10 种行为指标, 用以全面评估神经系统的功能状态。这些指标包括垂直活动、水平活动以及总活动水平(反映动物的整体活跃程度); 惊厥、震颤、重复行为(体现神经系统的异常放电或运动控制障碍); 呼吸模式、步态、排尿(反映自主神经系统的调控功能)等。

实验中某一指标的改变可能是由于毒物对其他器官的影响引起的, 例如, 高剂量的某一化合物对肝脏有毒性从而导致运动损伤, 甚至是由心理变化引起的, 但这种改变不被认为是该化合物具有神经毒性的证明, 因此需要注意测试的假阳性。主要神经毒性体内评价方法见表 2。

表2 主要神经毒性体内评价方法对比
Table 2 Comparison of main *in vivo* evaluation methods for neurotoxicity

评价类型	核心评价指标	主要技术/方法	优势	局限性
行为学评价	运动、学习记忆、感觉	开阔场试验、迷宫测试、听觉/触觉惊跳反射	反映神经系统整体功能	结果易受非神经因素干扰
神经生化评价	神经递质、酶活性、生物标志物	HPLC、ELISA、RIA	定量精确, 机制明确	需处死动物, 无法实时监测
神经电生理评价	神经传导速度、波幅、不应期	脑电图、诱发电位、神经肌肉传递仪	直接检测神经元电活动	技术门槛高, 设备昂贵
神经病理评价	神经元形态、轴突/髓鞘病变、组织切片、免疫组化 炎症反应	是确认神经毒性的终点检测; 可能错过短“金标准”	“金标准”	暂或可逆的功能变化

1.3 药物神经毒性评价特点

药物神经毒性评价的实验方法与化合物相同, 但在一些方面有特殊要求。药物评价需严格遵循药物非临床研究质量管理规范 (GLP), 并符合 ICH 相关指南。ICH S5 (R3) 中提到评估后代的神经功能缺陷, 虽不是独立的神经毒性检测, 但以整体发育结

局为评估重点, 是涉及神经系统发育的间接评估^[8]。针对生物药的 ICH S6 (R1) 明确在研究药物潜在的不良药理活性时, 需在适当动物模型中评估对主要神经系统(包括中枢神经系统)的功能影响^[9]。生物制品由于其相对分子质量大、作用机制独特, 需结合药物机制、物种特性及临床需求进行“个案分析”^[16]。

2 分层次神经毒性评价策略

分层测试是必要的,通过初步筛选排除不太可能具有神经毒性的物质,既降低了时间和经济成本,也减少了对实验动物的消耗。

测试的第一阶段,通过设定一系列剂量水平来筛选化学品可能存在的临床或病理的毒性迹象,尤其关注神经系统相关指标。若初筛未发现潜在的神经毒性证据,评估可在此阶段完成,若表现出明确的神经毒性迹象,则进行下一步实验^[17]。在后续实验中,重点转向采用更具特异性的终点指标,深入表征神经毒性并有效区分直接神经损伤与间接效应。同时,暴露人群的特殊性(如年龄、性别差异)也被纳入考量。为提高筛选效率,高通量体外测试系统(例如体外细胞分化模型或非啮齿类动物替代模型)被广泛应用,使资源能够集中于高风险化学品^[18]。在深入评估层面,一系列精细技术被用于机制探索。例如,免疫组织化学染色可检测胶质纤维酸性蛋白(GFAP)以识别星形胶质细胞肥大;神经纤维分离技术有助于观察轴突和髓鞘病变;电子显微镜能揭示亚细胞结构的改变。这些方法为明确神经毒性的作用靶点和机制提供了关键证据^[2]。

主要监管机构均支持分层测试理念。OECD《神经毒性试验指导原则》旨在确保获得必要和充分的数据以评估神经毒性风险^[2]。《Redbook 2000》推荐采用更详细的组织病理学检查,例如特殊染色^[3]。原国家食品药品监督管理总局(CFDA)要求当有其他证据提示潜在安全性担忧时,应进行追加和/或补充的安全药理学研究^[19]。

美国环境保护署(EPA)提出采用新的分层测试框架,第一层利用化学结构和高通量实验数据进行危害识别和分组,包括基于转录组测序技术的高通量转录组学(HTTr)和基于高内涵成像的高通量表型分析(HTP);第二层通过靶向体外测定确认生物靶点或作用机制(MOA);第三层利用有害结局路径(AOP)框架评估化学物质的潜在不良后果,同时解决现有高通量测序技术的局限性,如扩大测试化学品范围、改进挥发性化学品暴露系统和解决代谢能力问题^[20-21]。

3 颅内给药的神经毒性评价

颅内注射给药是某些药物安全性和有效性研究的特殊的给药方式,包括鞘内给药、脑实质给药、脑室内给药和硬膜外给药,与传统给药方式相比,颅内注射用药量少,全身暴露量低,直接作用于中

枢神经系统(CNS)能绕开血脑屏障,实现快速起效和精准靶向,但也因此带来了局部药物浓度较高、神经毒性风险增大等问题^[22]。其非临床神经毒性评价具有技术操作复杂、毒性风险高、免疫反应性等特点。颅内注射需要精确的操作,任何技术失误都可能导致机械损伤、感染或其他并发症,可能干扰对局部给药刺激性的评价^[23]。

鞘内注射通过腰椎穿刺将药物注射至蛛网膜下腔使其弥散在脑脊液中^[24]。鞘内注射药物的非临床神经毒性评价关注其对神经细胞的毒性及其对神经系统功能的影响。研究鞘内注射药物的局部刺激性是安全性评价的重点,需要对注射部位及周围的腰椎和脊髓进行组织病理学检查及刺激性评价(包括机械性刺激和化学刺激)^[23]。鞘内注射药物的药动学研究也是非临床神经毒性评价的一部分,主要研究药物在脑脊液中的分布、代谢及清除特性。

脑实质注射是一种将药物直接注入大脑特定区域(如海马体、纹状体等)的给药方式。在非临床研究中,除了评估药物本身的作用,还需密切关注注射过程可能带来的风险,例如局部出血、感染或神经损伤等。因此,注射后需要仔细观察动物的行为变化,以便评估药物对CNS的影响等^[25]。

脑室注射直接将药物注入脑室内,具有分布广泛、靶向性强、效果持久的特点。非临床注射前需通过脑立体定位仪确保精准定位,注射过程中需控制速度以防药物扩散不均或局部组织损伤(如产生血栓)^[26]。在小型动物模型中,通常建议累计注射次数不超过5次,以控制由多次穿刺造成的累积损伤^[25]。

硬膜外注射是将药物注射到脊柱硬膜外腔的一种方法。评价核心在于药物对硬膜外腔及其邻近神经根和脊髓的刺激性,需要警惕高浓度药物在局部滞留引起的炎症反应、细胞坏死或脱髓鞘等病理改变。长期实验中,应观察结构性变化(如炎症、水肿或瘢痕形成)及其对运动和感觉功能的长期影响^[27]。

4 神经毒性评价的新技术、新方法

2007年美国国家研究委员会(NRC)发布报告,倡导利用新工具和技术提高毒性测试效率^[28]。至2025年,美国FDA宣布将逐步取消单克隆抗体和其他药物的动物实验要求^[29]。

4.1 体外模型

传统毒性测试存在如成本高、时间长、种属外

推不确定等局限。因此,需要更高效、经济且与人类相关性更强的毒性测试方法,以适应大量化学物质评估的需求^[18]。这些模型虽尚未被正式纳入指导原则,但已在神经毒性评价中应用多年,其显著优势包括契合3R原则,即减少(reduction)、替代(replacement)、优化(refinement);能够实现高通量筛选;采用人源细胞规避种属差异;能深入揭示分子机制。

当前常用的体外模型,涵盖单细胞模型与混合细胞模型2种。其中单细胞模型如神经元、胶质细胞培养;混合细胞模型如原代细胞培养、三维(3D)细胞培养^[30]。

原代培养神经细胞最能模拟体内生理状态,但培养成本高且稳定性差,适用于实验周期短且对细胞生理代谢功能要求严格的药物筛选。

神经细胞系可用于先导化合物以及环境污染物如重金属等的早期大量筛选。如C6和SH-SY5Y细胞系已被提出作为研究重金属、卤代芳香烃和有

机磷酸酯神经毒性细胞机制的敏感实验模型^[31]。

神经干细胞具备自我更新能力,可分化为CNS的3种主要组成细胞,能够直接充当毒理学工具评估发育神经毒性^[32]。在药物临床前的安全性评价以及毒性机制研究方面,神经干细胞模型极具潜力,有望替代动物实验^[33]。应用神经干细胞分化的神经元模型评价抗肿瘤药物的神经毒性,当顺铂浓度>1 μmol·L⁻¹时,可抑制神经干细胞分化神经元的轴突生长,且抑制程度高于大鼠原代神经元;长春新碱可引起神经干细胞分化神经细胞死亡及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-3/7表达增加^[34-35]。

在培养方式上,3D培养技术(如神经球、支架培养)通过模拟细胞间的三维空间互作,能更真实地反映体内微环境,对神经网络功能影响药物(如抗癫痫药)具有更高的检测敏感性。体外模型各有优势和局限性,研究人员可根据实际的需求选择合适的模型进行毒性评价。神经毒性评价中常用体外模型对比情况见表3。

表3 神经毒性评价中常用体外模型对比

Table 3 Comparison of common *in vitro* models in neurotoxicity evaluation

模型类型	代表性体系	主要优势	主要局限性	在神经毒性评价中的适用性
原代细胞培养	原代皮层神经元	最接近体内生理状态	获取困难、成本高;批次间变异大;寿命短	适用于短期、深入的毒性通路研究
永生化细胞系	SH-SY5Y、PC12、C6	易于培养、扩增;成本低;重复性好	基因组不稳定;表型可能偏离原代细胞	高通量初筛的理想选择,适用于已知或可以毒性机制的快速筛选
神经干细胞	人或鼠源神经干细胞	具有多向分化潜能;特别适用于发育神经毒性研究	定向分化流程复杂;可能形成异质性细胞群	研究毒性对神经发育过程影响的独特模型,有替代动物胚胎试验的潜力
3D培养模型	神经球、3D支架培养	提供3D细胞互作环境;更模拟体内微环境;敏感性可能更高	技术复杂;分析难度大(如深度成像);成本较高	用于评估复杂网络功能毒性;适用于需要细胞空间结构的研究

4.2 类器官

脑类器官来源于多能干细胞,可以概括脑细胞的组成和功能,虽然没有任何模型可以完全复制人类大脑的复杂性,但基于类器官和类组装体的方法为研究外源性物质对大脑发育和功能的毒理效应提供了强有力的工具^[36-37]。

在神经毒性评价中,类器官展现出显著优势。其与人体组织具有高度生理相似性,且具有长期培养、来源广泛、建模时间短等特点^[36]。一方面,传统动物模型与人类存在显著的种属差异,尤其对于物种特异性强的生物技术药物,非人灵长类虽更为

接近但仍不理想^[38],另一方面,要遵循3R原则,符合动物伦理考量。并且传统的二维模型缺乏细胞的多样性,不能很好地模拟大脑复杂的结构。因此,类器官是更好的选择。

通过将多能干细胞在细胞外基质或悬浮培养中形成的3D聚集体,经过定向诱导分化生成具有特定脑区(如前脑、下丘脑)特征的类器官^[39-40]。更进一步,可将不同脑区特性的类器官进行组合,以模拟脑区之间的复杂作用。此外,通过共培养内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞构建的体外血脑屏障模型,为研究药物的中枢渗透性提供了重要工具。

类器官用于神经毒性评价的评价指标包括但不限于神经元细胞死亡, Caspase-3 活性作为细胞凋亡的一个指标^[41]; 线粒体功能和形态的改变^[42]; 基因表达变化, 特别是核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2) 通路相关基因的表达, 以及 tau 蛋白磷酸化^[43]。利用 hiPSC 衍生的脑类器官, 研究人员能够系统评估毒性物质对神经元分化、迁移、突触形成以及电活动模式的干扰, 从而揭示药物诱导神经毒性的分子和细胞机制^[37]。

类器官智能 (OI) 作为新兴交叉领域, 将脑类器官与计算科学相结合, 探索其潜在的信息处理与学习记忆能力。通过开环和闭环实验, OI 可量化外源性物质对神经可塑性的影响, 为 DNT 测试提供新的视角^[40]。脑类器官技术、机器学习和组学数据的结合使大规模筛选神经毒物的平台成为可能^[44]。

尽管前景广阔, 类器官仍面临挑战。其成熟度尚不足以完全模拟人脑复杂的生理环境^[45]。此外, 类器官模型通常缺乏功能性的血脑屏障, 这可能影响对某些化合物神经毒性的准确评估^[46]。

5 结语与展望

综上所述, 神经毒性评价是确保化学品安全性关键环节。通过遵循一般和分层次评价原则, 综合运用多种体内评价方法, 关注鞘内注射药物特殊评价要点, 以及积极探索体外模型和类器官等新技术、新方法, 能够更全面、精准地评估化学品尤其是药物潜在神经毒性。这不仅有助于保护公众健康, 还能减少药物不良反应的发生, 推动药物研发进程的优化。但目前神经毒性评价研究仍面临一些挑战, 例如, 如何标准化 3D 模型的构建和培养条件, 如何实现高通量自动化, 以及如何更好地整合多模态数据 (如代谢组学、蛋白质组学和电生理活动测量) 以全面评估神经毒性, 是当前研究的重点。未来结合微生理系统或“器官芯片”技术, 将有望创建更复杂的体外模型, 以更准确地模拟人体生理功能和毒性响应, 进一步提高神经毒性评估的准确性和预测性。随着科学技术的不断进步, 相信神经毒性评价将更加完善, 为药物研发和临床应用提供更坚实的保障, 促进医药领域持续健康发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Llorens J, Li A A, Ceccatelli S, et al. Strategies and tools for preventing neurotoxicity: To test, to predict and how to do it [J]. Neurotoxicology, 2012, 33(4): 796-804.
- [2] OECD. Guidance Document for Neurotoxicity Testing [EB/OL]. (2004-11-26) [2025-08-19]. https://www.oecd.org/en/publications/guidance-document-for-neurotoxicity-testing_16d23a96-en.html.
- [3] FDA. Redbook 2000: IV.C.10.Neurotoxicity Studies [EB/OL]. (2000-07) [2025-08-19]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/redbook-2000-ivc10-neurotoxicity-studies>.
- [4] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects. Test no. 418: Delayed neurotoxicity of organophosphorus substances after acute exposure [EB/OL]. (1995-07-27) [2025-08-19]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-418-delayed-neurotoxicity-of-organophosphorus-substances-following-acute-exposure_9789264070905-en.html.
- [5] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects. Test no. 419: Delayed neurotoxicity of organophosphorus substances: 28-day repeated dose study [EB/OL]. (1995-07-26) [2025-08-19]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-419-delayed-neurotoxicity-of-organophosphorus-substances-28-day-repeated-dose-study_9789264070929-en.html.
- [6] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects. Test no. 424 Neurotoxicity Study in Rodents [EB/OL]. (1997-07-21) [2025-08-19]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-424-neurotoxicity-study-in-rodents_9789264071025-en.html.
- [7] OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects. Test no. 426 Developmental Neurotoxicity Study [EB/OL]. (2007-10-15) [2025-08-19]. https://www.oecd.org/en/publications/test-no-426-developmental-neurotoxicity-study_9789264067394-en.html.
- [8] ICH Harmonised Guideline: Detection of Reproductive and Developmental Toxicity for Human Pharmaceuticals S5(R3) [EB/OL]. (2020-02-18) [2025-08-19]. <https://www.ich.org/page/safety-guidelines>.
- [9] ICH Harmonised Guideline: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1) [EB/OL]. (2011-06-12) [2025-08-19]. <https://www.ich.org/page/safety-guidelines>.
- [10] ICH Harmonised Guideline: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7A [EB/OL]. (2000-11-08) [2025-08-19]. <https://www.ich.org/page/safety-guidelines>.
- [11] Blum J, Masjosthusmann S, Bartmann K, et al. Establishment of a human cell-based *in vitro* battery to assess developmental neurotoxicity hazard of chemicals

- [J]. Chemosphere, 2023, 311(Pt 2): 137035.
- [12] OECD. Initial recommendations on evaluation of data from the developmental neurotoxicity (DNT) *in-vitro* testing battery [EB/OL]. (2023-11-03) [2025-08-19]. https://www.oecd.org/en/publications/initial-recommendations-on-evaluation-of-data-from-the-developmental-neurotoxicity-dnt-in-vitro-testing-battery_91964ef3-en.html.
- [13] EPA. Guidelines for neurotoxicity risk assessment [EB/OL]. (1998-03-14) [2025-08-19]. <https://www.epa.gov/risk/guidelines-neurotoxicity-risk-assessment>.
- [14] Sobotka T J. Revisions to the FDA's Redbook guidelines for toxicity testing: Neurotoxicity [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1992, 32(2): 165-171.
- [15] Costa L G. Overview of neurotoxicology [J]. Curr Protoc Toxicol, 2017, 74: 11.1.1-11.1.11.
- [16] Brennan F R, Andrews L, Arulanandam A R, et al. Current strategies in the non-clinical safety assessment of biologics: New targets, new molecules, new challenges [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2018, 98: 98-107.
- [17] Legradi J B, Di Paolo C, Kraak M S, et al. An ecotoxicological view on neurotoxicity assessment [J]. Environ Sci Eur, 2018, 30(1): 46.
- [18] Krewski D, Andersen M E, Tyshenko M G, et al. Toxicity testing in the 21st century: Progress in the past decade and future perspectives [J]. Arch Toxicol, 2020, 94(1): 1-58.
- [19] 国家食品药品监督管理总局(现国家药品监督管理局). 药物安全药理学研究技术指导原则 [EB/OL]. (2014-05-13) [2025-08-19]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqttgg/20140513120001448.html>. China Food and Drug Administration (now National Medical Products Administration). Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals [EB/OL]. (2014-05-13) [2015-08-19]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqttgg/20140513120001448.html>.
- [20] Thomas R S, Bahadori T, Buckley T J, et al. The next generation blueprint of computational toxicology at the U.S. environmental protection agency [J]. Toxicol Sci, 2019, 169(2): 317-332.
- [21] Bal-Price A, Crofton K M, Leist M, et al. International STakeholder NETwork (ISTNET): Creating a developmental neurotoxicity (DNT) testing road map for regulatory purposes [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(2): 269-287.
- [22] Fowler M J, Cotter J D, Knight B E, et al. Intrathecal drug delivery in the era of nanomedicine [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2020, 165/166: 77-95.
- [23] 宋莹, 付新录, 兰天龙, 等. 醋酸齐考诺肽重复鞘内给药的局部刺激性研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(1): 54-58.
- [24] Song Y, Fu X L, Lan T L, et al. Local irritation study of repeated lumbar intrathecal injection of Ziconotide Acetate [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(1): 54-58.
- [25] 黄羽静, 柳璐, 雷夏凌, 等. 浅谈鞘内给药非临床安全性评价的关注点 [A] // 中国毒理学会第十次全国毒理学大会论文集[C]. 珠海: 中国毒理学会, 2023.
- [26] Huang Y J, Liu L, Lei X L, et al. Brief discussion on key considerations for non-clinical safety evaluation of intrathecal administration [A] // Proceedings of the 10th National Congress of the Chinese Society of Toxicology [C]. Zhuhai: Chinese Society of Toxicology, 2023.
- [27] Berman-Booty L D, Klein S K, Mazur C, et al. Toxicologic pathology forum: Opinion on interpretive challenges for procedure-related effects associated with direct central nervous system delivery of oligonucleotides to rodents, dogs, and nonhuman Primates [J]. Toxicol Pathol, 2023, 51(6): 375-389.
- [28] Mathon B, Nassar M, Simonnet J, et al. Increasing the effectiveness of intracerebral injections in adult and neonatal mice: A neurosurgical point of view [J]. Neurosci Bull, 2015, 31(6): 685-696.
- [29] 萧惠来. FDA发布的“改变剂型和改变给药途径药品非临床安全性评价指导原则”介绍 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 171-174.
- [30] Xiao H L. Introduction to FDA's Guidance for Industry and Review Staff: Nonclinical Safety Evaluation of Reformulated Drug Products and Products Intended for Administration by an Alternate Route [J]. Drug Eval Res, 2016, 39(2): 171-174.
- [31] National Research Council (US) Committee on Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology. Applications of Toxicogenomic Technologies to Predictive Toxicology and Risk Assessment [M]. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007: 1-20.
- [32] FDA. FDA Announces Plan to Phase Out Animal Testing Requirement for Monoclonal Antibodies and Other Drugs [EB/OL]. (2025-04-10) [2025-08-19]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-announces-plan-phase-out-animal-testing-requirement-monoclonal-antibodies-and-other-drugs>.
- [33] 田康, 黄芝瑛, 王雪, 等. 药物神经毒性评价体外模型的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(7): 1433-1438.
- [34] Tian K, Huang Z Y, Wang X, et al. Research progress on *in vitro* models for evaluating drug-induced neurotoxicity [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(7): 1433-1438.
- [35] Tang Y, Donnelly K C, Tiffany-Castiglioni E, et al.

- Neurotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and simple chemical mixtures [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2003, 66(10): 919-940.
- [32] Fritsche E, Barenys M, Klose J, et al. Current availability of stem cell-based in vitro methods for developmental neurotoxicity (DNT) testing [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 165(1): 21-30.
- [33] Tukker A M, Wijnolts F M J, de Groot A, et al. Human iPSC-derived neuronal models for in vitro neurotoxicity assessment [J]. *Neurotoxicology*, 2018, 67: 215-225.
- [34] Wheeler H E, Wing C, Delaney S M, et al. Modeling chemotherapeutic neurotoxicity with human induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0118020.
- [35] 王美婷, 张艺哲, 邢红艳, 等. 人源性干细胞分化的神经细胞在药物神经毒性评价中的应用 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(5): 611-618.
- Wang M T, Zhang Y Z, Xing H Y, et al. Application of human stem cells-derived neural cultures in drug-induced neurotoxicity evaluation [J]. *Chin J Pharm*, 2021, 52(5): 611-618.
- [36] Qian X Y, Song H J, Ming G L. Brain organoids: Advances, applications and challenges [J]. *Development*, 2019, 146(8): dev166074.
- [37] Parmentier T, LaMarre J, Lalonde J. Evaluation of neurotoxicity with human pluripotent stem cell-derived cerebral organoids [J]. *Curr Protoc*, 2023, 3(4): e744.
- [38] 秦晓菲, 袁芳, 潘晓靓, 等. 非人灵长类动物的发育神经毒性评价方法 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(5): 513-517, 532.
- Qin X F, Yuan F, Pan X L, et al. Evaluation methods for developmental neurotoxicity of nonhuman primates [J]. *Chin J New Drugs*, 2014, 23(5): 513-517, 532.
- [39] 陈书进, 颜崇淮. 类脑器官在环境毒理学中的应用 [J]. 环境与职业医学, 2024, 41(3): 342-347.
- Chen S J, Yan C H. Application of brain organoids in environmental toxicology [J]. *J Environ Occup Med*, 2024, 41(3): 342-347.
- [40] Alam El Din D M, Shin J, Lysinger A, et al. Organoid intelligence for developmental neurotoxicity testing [J]. *Front Cell Neurosci*, 2024, 18: 1480845.
- [41] Liu F K, Huang J, Liu Z X. Vincristine impairs microtubules and causes neurotoxicity in cerebral organoids [J]. *Neuroscience*, 2019, 404: 530-540.
- [42] Arzua T, Yan Y S, Jiang C S, et al. Modeling alcohol-induced neurotoxicity using human induced pluripotent stem cell-derived three-dimensional cerebral organoids [J]. *Transl Psychiatry*, 2020, 10(1): 347.
- [43] Bu Q, Huang Y, Li M, et al. Acrylamide exposure represses neuronal differentiation, induces cell apoptosis and promotes tau hyperphosphorylation in hESC-derived 3D cerebral organoids [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 144: 111643.
- [44] Fan P, Wang Y H, Xu M, et al. The application of brain organoids in assessing neural toxicity [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 799397.
- [45] Park S H, Sun W. Toxicity assessment using neural organoids: Innovative approaches and challenges [J]. *Toxicol Res*, 2025, 41(2): 91-103.
- [46] Majumder J, Murphy W L. Neural organoids as advanced tools for neurotoxicity modeling [J]. *Curr Res Toxicol*, 2025, 9: 100249.

[责任编辑 刘东博]