

## 第十一章 食品中化学物质的神经和神经行为毒理学

近二十年来,随着分子生物学、免疫学、神经科学等学科不断发展,以及许多先进技术手段的不断产生及其应用,尤其是对神经系统及各种神经活性物质、受体等的研究,促进了人们对神经科学及大脑的认识,也促进了毒理学一个新的分支——神经和神经行为毒理学的发展,使神经及行为毒理学的方法不仅应用在药理学、药物依赖性、药物毒性的评价中,而且也成为化学物质安全性评价中不可缺少的组成部分。今天,神经与行为毒理学,不仅在理论和方法学上有所创新和发展,而且在实际中被越来越多的学科所应用。

### 第一节 神经毒理学

神经毒性是指由于接触物理、化学或生物因素而引起神经系统的结构或功能改变,从毒理学角度来讲,是指对正常的神经系统结构和功能带来的损害性改变。神经毒理学(Neurotoxicology)是毒理学的一门分支学科,与神经科学有着密切的联系。神经毒理学不仅研究接触毒物导致的神经系统疾病,而且已成为神经生物学研究领域的热点。神经毒理学主要研究环境中存在的毒物对人的神经系统毒性效应,包括神经毒物的代谢、毒物的损伤效应及特性,并研究生化及分子生物学机理,以及神经细胞学及分子生物学机理。

神经毒理学的特点:①是研究低剂量慢性神经毒性的方法;②敏感;③能定量;④可早期检出亚临床表现,获得早期预防及治疗的机会,可防止不可逆的神经损伤;⑤是监护职业人群健康的重要措施的补充。

#### 一、神经毒性的损伤类型及机理

##### (一) 血-脑及血-神经屏障与神经毒性损伤

血脑屏障系基于脑的微血管周围的特异的内皮细胞及胶质细胞的相互作用。神经系统内皮细胞的特点为相互联结很紧密,外源性分子必须能通过内皮细胞的细胞膜,而不是通过内皮细胞之间的间隙。因此某些毒物分子是否能进入脑组织,取决于其脂溶性及能否通过内皮细胞的浆膜。而脑室周围的器官由于不具备紧密联结的特异的内皮细胞,因此血脑屏障功能薄弱。血液与脑、脊髓及周围神经之间均由连续紧密的特异细胞被盖,在脑及脊髓由脑膜及脊髓膜在表面被盖,而周围神经则在每根神经纤维均由神经周围细胞包围。胶质细胞如星形细胞、雪旺(Schwann)细胞等在血脑屏障中的作用研究近年有新的发展。

脑组织中 50%的容积为非兴奋性细胞,即神经胶质细胞,其中最多的为星形细胞,其作用主要是支持神经元,已明确寡树突胶质细胞为髓鞘细胞。星形细胞在谷氨酸代谢中占有重要位置,谷氨酸是一种兴奋性神经递质,在脑缺血或其他病理情况时,主要由于谷氨酸不适当地释放,过度激活兴奋性氨基酸受体,导致某些神经元死亡。另外星形细胞可摄取谷氨酸并通过谷氨酰胺合成酶转化为谷氨酰胺,在氨(NH<sub>4</sub>)存在的条件下可控制细胞外谷氨酸的浓度,因此对神经元有保护作用。曾有学者用脑皮质培养比较对谷氨酸的敏感度,即脑皮质与不同浓度的谷氨酸共同培养 18~24 小时,结果在缺乏星形细胞的环境中神经元死亡较严重,在缺乏星形细胞的培养液中谷氨酸EC<sub>50</sub>为 1.9±0.6 μmol/L,而在富于星形细胞的培养液中则为 194±43 μmol/L,即谷氨酸毒性在星形细胞缺乏的条件较富于星形细胞者高 100 倍。其机理可能是星形细胞的保护作用,即树突膜NMDA(N-methyl-D-aspartate)一受体的星

形细胞的物理性的防护作用。此类受体可能对谷氨酸毒性更敏感,是由于树突对巨大而强的NMDA—受体激发的钙内流有一种特殊的机理。还有一种解释,即星形细胞有一种对谷氨酸的摄取系统,可减少细胞外的谷氨酸的浓度。而事实上如在缺氧、低血糖、肝性脑病、代谢性毒物,使星形细胞功能改变时,则可因谷氨酸毒性导致神经元损伤或致死。重金属导致的神经毒时,在星形细胞内聚集甲基汞、铅。成人不易发生铅脑病,主要由于星形细胞可摄取铅。探讨较多者,如星形细胞与甲基汞、三甲基锡的神经毒的关系。观察甲基汞、三甲基锡对星形细胞的 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶活性及离子通透性的影响,证实二者的浓度低至 $10^{-5}\text{mol/L}$ ,即可改变 $\text{K}^+$ 的流入及流出, $\text{K}^+$ 流入受抑主要由于 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP酶受抑。另外如1-甲基-4-酚基四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydro pyridine)MPTP导致的神经毒见于人的黑质纹状体的多巴胺能神经元,已证实在MPTP导致的神经毒性中基因表达与星形细胞代谢有关。

星形细胞在中枢神经系统及免疫系统间的作用:星形细胞参与自身免疫异常的多发性硬化症。新生小鼠的脑培养加入脂多糖后,发现星形细胞可分泌白细胞介素-1(IL-1),IL-1可激活脑内的T细胞,因IL-1可促使产生IL-2及在T细胞的IL-2表达的受体,据此说明在中枢神经系统的星形细胞介入免疫过程。此外星形细胞尚分泌IL-3样因子及颗粒-巨噬细胞刺激因子,这些因子也参与免疫过程。

总之,评价化学物导致的细胞毒性在动物整体探索很困难,因涉及很多因素如神经、体液及体内血液动力学。因此可利用星形细胞与脑实质共同培养来探索星形细胞在神经变性类的疾患中的作用及机理。

### (二) 神经元损伤(Neuronopathies)

某些毒物对一些神经元或某种神经元呈特异损伤,若严重时可使神经元死亡。一个神经元丢失不但不可修复,而且使树突及轴和轴的髓鞘均出现变性,这些改变可见于周围神经及中枢神经系统。神经元开始出现损伤,继之发生坏死,最终导致永久性丢失。毒物作用呈选择性地损伤一种神经元,也可选择不同神经元的亚群,表现为弥漫性脑病,但症状根据神经毒的选择性毒性往往仅表现一种特殊的功能障碍,如甲基汞(methyl mercury)污染的食物,可引起居民中毒,临床表现根据接触毒物的程度及年龄的不同表现不一致,在成人最严重的损伤为视皮层的神经元及小脑皮层的小的内颗粒细胞神经元出现大量的变性传导性明显的运动失调。儿童可见广泛的神经元丢失,严重时可导致智力迟钝及麻痹。对损伤机理已进行了大量研究,并对各种细胞功能如糖分解、核酸生物合成、有氧呼吸、蛋白合成及递质释放等的障碍进行了探索,但致细胞死亡的机理尚不明确。另外,如三甲基锡(trimethyltin)多用于增塑剂、抗真菌药或其他农药。三甲基锡中毒在人可表现为严重不可修复的边缘—脑综合征(Limbic, cerebellar syndrome)。在灵长类可表现为相似的行为变化。主要病变为弥漫性神经元病,损伤的机理未定。损伤的表现开始呈神经系统的神经元聚积包含高尔基体(Colgi)样结构的细胞浆体,继之出现细胞肿胀及坏死。在此损伤过程中海马受损严重。关于三甲基锡神经毒的机理,存在某些假说,如能量的丧失及兴奋性毒性的损伤。此外,在三甲基锡敏感性的神经元中存在一种蛋白即stannin,其作用尚待研究确定。

### (三) 轴病(Axonopathies)

神经毒性原发部位在轴即称为轴病。轴及包围轴的髓鞘均发生变性,但神经元的胞体完好无损。过去(Caranogh, 1964)将“返死轴病”称为轴病,认为毒性作用部位包括神经元细

胞体及远端轴从突触返向细胞体发生进行性变性。现代通过大量研究,轴病可由不同的病因引起,沿轴长的某些点从轴的远端发生“化学性横断”样变性,与胞体以生物学方式分离。由于毒性损伤的靶点长轴较短轴多,所以长轴易受毒物损伤出现轴病。中枢神经系统长轴损伤如后索的上行性感觉轴或下行性运动轴,沿长的周围神经系统的感觉及运动轴上行及下行,毒性轴病易发生于远端轴,因此称为“中枢周围的远端轴病”。但中枢神经系统的轴变性与周围神经系统的轴变性完全不同,在同样的损伤条件下后者可部分修复,轻症时可完全修复,但前者则否。

致轴病的神经毒物很多,许多工业化学毒物、农药、某些食物添加剂、治疗用药物、重金属均为神经毒物。

常见的轴病如有机磷三磷甲苯磷酸酯(TOCP, Tri-o-cmsyl phoshate)引起的中枢周围远端轴病,此种轴病并非胆碱能中毒。在美国曾发生饮料的 TOCP 污染、橄榄油掺入 TOCP 等,人误用后,出现麻痹。

疏水性的有机磷化合物易进入神经系统,其作用机理为有机磷化合物使生物大分子烷化或磷酸化,可致人或动物的迟发性神经毒。有机磷酯在神经系统存在多种靶,目前对导致迟发性神经毒的靶尚未清楚。其他的酯酶活性或“神经靶酯酶”(NTE)可被神经毒性有机磷酯抑制。有机磷酯对轴毒性的效能及其抑制 NTE 的效能,在体内或培养系统中呈相关关系。并非所有的有机磷酯均可导致迟发性神经毒。

在急性有机磷酯接触后,并非立即出现轴变性,一般在急性高剂量接触及临床出现轴病之间间隔 7~10 天。周围神经系统的轴病可逐步修复,但若反复接触可导致顽固性脊髓的轴变性,且进行性发展为类似于多发性硬化症的病变。

#### (四) 微管相关的神经毒——周围神经病(neuropathy)

关于微管在轴的转运及保留轴的功能方面尚待阐明。在从植物提取某些生物碱后,对研究这方面工作创造了条件。长春花碱及秋水仙素可结合微管蛋白以阻止这种蛋白的亚基缔合而形成微管。长春新碱为长春花生物碱的一种,临床利用此生物碱对微管的直接作用——抗有丝分裂活性治疗白血病。秋水仙素在临床用于治疗痛风。此两种微管抑制物在临床成为周围神经病的原因。

近年从植物提取紫杉醇(taxd),与微管呈明显不同的相互作用。当微管堆集及稳定于微管的聚集型时,紫杉醇与微管结合,在低温或钙存在时微管可正常地解离为微管蛋白的亚基。紫杉醇已用于临床治疗某些癌。但已发现大量使用这种化合物的患者出现感觉运动轴病或植物神经病。

已证实秋水仙素及长春花生物碱可致微管的去极化,而紫杉醇使微管稳定导致轴病。已证明微管在体外呈动态平衡,微管呈平衡状态的同时,解离亚基。在体内此过程发生时微管蛋白移入轴。因此微管经常地缔合及解离。在动态平衡的状态时,紫杉醇及长春花生物碱发挥其毒性作用阻止微管蛋白的两个池的交换(即阻止缔合及解离的交换)。形态学上此两种情况不同,在用秋水仙素时,轴呈萎缩状态,轴内微管较少。相反,接触紫杉醇时,在轴内微管很多聚积为排列的微管。此两种情况干扰了轴的快速转运,但紫杉醇接触后的情况尚未非常肯定。总之,此两种情况均可导致周围神经病。

#### (五) 髓鞘病(myelinopathies)

毒物可导致髓鞘板分离称为髓鞘内水肿,选择性的髓鞘丢失称之为脱髓鞘。髓鞘内水肿

可由于髓鞘基础蛋白 mRNA 转录水平改变, 在发展的早期可修复。但在开始期可发展为节段性脱髓鞘, 髓鞘从轴脱失。节段性脱髓鞘也可由于对髓鞘细胞直接毒作用。在节段性脱髓鞘后, 在周围神经系统常见由雪旺细胞将裸露的结间(intemode)再髓鞘化, 在中枢神经系统仅见有限的范围进行再髓鞘化。在周围神经节段性脱髓鞘后再髓鞘化涉及多数雪旺细胞, 结果结间长度[即朗飞结(Ranvier node)间的距离]较正常明显减短, 而且为脱髓鞘的永久的改变。

导致脱髓鞘的化合物有的在人体已有接触, 且已明确其导致脱髓鞘的过程及再修复的过程。一般脱髓鞘的功能上的改变与脱髓鞘的范围可局限于中枢神经系统或周围神经系统, 或其效应更弥漫。这些中毒性脱髓鞘病, 其髓鞘破坏若呈弥漫性, 可发生严重的神经病, 如限于周围神经系统, 则仅表现周围神经病的症状。

**铅(lead):** 动物接触铅可导致周围神经病, 并出现显著的节段性脱髓鞘改变。铅对人的神经毒性较大鼠变异大, 在其他器官的铅的毒性也不同。数个世纪以来已重视铅的神经毒性。现代成人职业接触铅污染机会增多, 有些地区环境中含铅水平较高, 致居民血中铅水平较高。儿童尤其小于 5 岁的儿童在同样环境中血铅水平比成人高, 此多由于经口接触铅, 如接触含铅的颜料碎屑等所致。

年幼的儿童急性接触大量铅污染而导致严重的脑水肿, 或损伤内皮细胞。铅性脑病儿童较成人明显。

成人慢性铅中毒易导致周围神经病, 且伴随神经系统以外的病, 如胃炎、腹部绞痛、贫血, 及铅在特殊解剖部位沉着, 如在齿龈的沿线及在长骨骨髓的铅线。对人体周围神经的铅效应不完全清楚, 通过电生理的观察证实神经传导减慢, 在动物实验见到节段性脱髓鞘。在人患有铅导致的神经病可见到典型的轴病, 而且主要侵犯运动轴的病人患有运动性神经病。虽然急性及慢性铅接触的表现早已明确, 在近年才注意到接触很低水平的铅的儿童虽无症状, 但实际存在智能方面的有害效应。开始的报告提示儿童的血铅轻度升高与其在学校的行为相关; 最近注意到儿童脱落的牙齿中铅的水平升高及行为测试用词能力、注意力和非适应性行为相关。关于此问题存在某些争议, 如认为儿童有较高水平的血铅, 可能与其他某些环境因素, 如社会经济状态、双亲的教育水平等有关。但虽然人的情况较复杂, 而铅的接触对儿童智力有有害影响, 动物实验模型证实接触铅及脑功能障碍二者是伴随的。

#### (六) 神经传递与神经毒性

1. 多数神经毒物可损伤神经系统细胞结构, 并有解剖学根据。在某些情况下, 神经系统的功能障碍并未见细胞结构的改变, 但在行为功能测试时神经毒的表现行为改变或行为障碍。事实上神经毒物导致的有解剖学根据的细胞损伤, 首先通过测试神经病学的功能障碍, 而证实是由于神经毒所致的细胞损伤。

这些毒物的分子生物学机理尚不清楚, 但这些化合物的化学作用的基础是明确的。这些化合物主要使神经传递过程发生障碍。根据神经药理学提出有时神经传导中断对个体是有利的。但过度或不适合的接触化学物所出现的神经传导改变可能系神经毒理学的特点。

此类化合物如尼古丁(nicotine)、可卡因(cocaine)、兴奋性氨基酸(excitatory amino acids)等可中断冲动的传导, 阻滞或加强突触的传递或干扰第二信号系统。这些化合物的急性效应直接与在作用部位的即刻浓度有关, 即直接与药物在血中浓度有关。许多结构类似的化学物

的作用也相似。如某些药物的作用与交感神经系统的神经传导过程相似,即称为拟交感神经化学物。由于这些药物的靶分布全身,其副作用持续时间短,易修复,也可用其拮抗物得到修复,如长时间使用则可导致不可修复。如吩噻嗪(phenothiazines)长期治疗精神分裂症,可出现迟发性运动困难,且永久在面部遗留怪相。

## 2. 神经毒性影响神经传递的机理

神经传递参与主要环节有神经元的突触、神经递质、第二信号系统,离子通道等。

神经毒物作用于突触可影响递质合成、储存及释放,并干扰递质的灭活和清除,递质与受体的作用,或毒物与受体结合,改变膜的离子泵和离子通道。

神经毒物作用于神经递质的代谢,可影响递质中间代谢、合成及降解。

3. 神经毒性影响神经细胞的第二信号系统,受体的特异激动剂肌醇磷酸酯及其分解产物IP<sub>3</sub>等的研究可了解毒物对受体的特异激动剂的影响。

钙在第二信号系统中有重要作用,如神经毒物可使细胞内Ca<sup>2+</sup>增高,胞内游离钙升高又可通过钙调素CaM依赖性早反应基因如c-fos和c-myc快速短时间表达。观察Ca<sup>2+</sup>、CaM及c-fos及c-myc均可提示神经毒物对第二信号系统的影响。

近年的研究发现一氧化氮(NO)的神经毒性,尤其是兴奋性神经毒性:已证实NO介入谷氨酸的神经毒性。

4. 离子通道与神经毒性;钙通道及钠通道均系电压门控离子通道。钙通道对神经递质和激素释放、动作电位生成和兴奋收缩等均很重要,是神经毒素及神经毒物的靶。钙通道分为4型,即T、L、N、P型。神经毒性可阻断不同型的钙通道,发挥不同的作用。可通过膜片钳方法研究某些毒物或药物与受体钙通道复合体的相互作用。杀虫剂、重金属、某些药物均可干扰钠通道,多为阻断钠通道的作用,如拟除虫菊酯主要使神经元钠通道关闭延迟,神经元持续去极化,导致神经系统过度兴奋,出现惊厥抽搐、震颤、易激惹、舞蹈、运动失调综合征。局部麻醉药如普鲁卡因等的作用为阻断钠及钾通道,达到局部麻醉的作用。其他如抗精神病药物可以通过阻断神经元及心肌细胞的钠及钙通道达到治疗作用。

## 二、迟发性神经毒性

迟发性神经毒性(delayed toxicity),于1930年已有报道,见于人及动物,多见于有机磷农药中毒后,此类农药为胆碱酯酶抑制剂,但并非所有这种抑制剂均有迟发性神经毒性作用。迟发性神经毒性是指中毒症状发生之后约8~14天,再出现较持久的神经中毒症状,主要表现为弛缓性麻痹或轻瘫,而后出现脊髓损伤体征,如共济失调或强直等。神经细胞损伤的特点是轴突变性,引起继发性髓鞘变化。

### (一) 迟发性神经毒性的表现及神经组织学所见

迟发性神经毒性的种属差异较明显,人最敏感。动物以成年母鸡最敏感,猫次之,大、小鼠敏感性低。人及敏感性高的动物表现较严重,敏感性差的动物表现轻。

人的临床表现为坐骨神经麻痹,轻症者多呈弛缓性麻痹,一般经2年可恢复。严重者呈痉挛性麻痹,可持续多年,有的甚至持续至死亡。

动物的表现开始呈全身无力状态,下肢衰弱。后出现步态异常或运动共济失调,逐步发展为站立困难,甚至下肢活动受限,下肢弛缓性麻痹或轻瘫,一般从下肢远端开始,后扩展至下肢近端即大腿部,最后可见脊髓损伤表现,如运动共济失调和痉挛。

神经组织学所见,最多见的病理学改变为轴突的肿胀,此可见于坐骨神经及脊髓的切片,

继之发展为轴突的退行性变性,可见空泡化、凝聚及碎片化,最后可见髓鞘降解或消失。严重的病变可见脊髓组织结构的部分消失。根据组织病理学所见,提示神经组织损伤的严重性及损伤程度与染毒剂量有关,呈剂量-反应关系。

电镜所见:临床症状出现第一天,脊髓的白质已出现异常结构变化。在开始期轴浆的滑面内质网,出现空泡扩张,正常的囊胞结构呈管样伸长,并伴随空泡结构增殖形成致密的堆积,同时出现正常的神经细丝轴的亚结构减少,而且有一部分形成颗粒样碎片。在退行变末期髓鞘破碎成为罗纹状或卵圆形。轴浆改变在灰质的突触前的终端较脊髓白质者明显增多。有些神经终端明显增大,而且最多的结构异常为增殖的囊胞成分的聚积及凝集。扭曲的神经细丝结构也可在突触前终端见到,较多的见于致密的亚细胞结构。

(二)影响迟发性神经毒性作用的因素 ①有机磷化合物的结构及剂量大小,接触频率和持续的时间。②染毒方式(经口或经皮)。③有机磷化合物生物转化及代谢动力学的不同,不同的物种对同一化合物敏感性不同主要由于此化合物在不同的物种体内的代谢动力学不同。如对溴磷,大鼠及小鼠对其不很敏感,主要由于在大鼠及小鼠体内代谢转化快,且代谢产物迅速经尿排出,而母鸡及猫体内代谢转化及排出体外的速度仅为小鼠的1/31,所以母鸡及猫比较敏感。在体内代谢和排泄相对较慢,且中等度急性毒性的有机磷化合物才能在体内靶部位蓄积达到迟发性神经毒性作用的阈剂量。

(三)迟发性神经毒性的作用机理 以前,对迟发性神经毒性作用的机理仅基于成年鸡的试验所见到的有机磷化合物引起的神经麻痹与人的神经毒靶酯酶的抑制相符,提出迟发性神经毒性作用的机理为神经毒酯酶(NTE)持久的抑制。近年发现有机磷酸酯与神经系统中非靶蛋白(丁酰胆碱酯酶和神经毒酯酶)亲和力较强,与有机磷酸酯类结合,并暂时贮存,使动物避免受到有机磷化合物的急性毒性损害。此后非靶蛋白结合的有机磷酸酯类逐步被释放,通过蛋白转运过程到达神经毒靶组织,并逐渐蓄积,当达到中毒作用阈剂量时,即出现中毒症状。动物试验结果提示有机磷化合物一次剂量或多次剂量与非靶蛋白的特异性结合,均可达到阈剂量,且其释放与蓄积达到阈剂量的时间即相当于染毒一次剂量后到出现运动共济失调的时间间隔。神经细胞变性及溶酶体膜受损与迟发性神经毒性作用也有关,同时可见血浆中酸性磷酸酶活性增加。另外,有机磷化合物对神经细胞中快速轴浆运转过程有干扰作用,致使快速轴浆运转发生障碍,对迟发性神经毒性的出现有一定的作用。

(四)具有迟发性神经毒性作用的有机磷化合物 三磷甲苯磷酸酯(TOCP)、丙胺氟磷、丙氯磷(DFP),对溴磷(即溴苯磷),三硫磷,苯硫磷(EPN)、脱叶磷(DEF),皮蝇磷,壤虫磷,草特磷(DMPA),敌敌畏和敌百虫等。

1975年WHO(世界卫生组织)已将迟发性神经毒性试验列入有机磷农药毒性试验的观察项目。

#### (五)迟发性神经毒性试验

迟发性神经毒性试验的要点如下。

选用遗传背景明确、健康、步态正常的母鸡(莱亨鸡),鸡龄8~14个月,体重1.5~2kg。

每剂量组母鸡数量应保证在观察结束时存活至少有6只。一般设高、中、低三个剂量组,一个阳性对照组和一个阴性对照组。高剂量一般采用LD<sub>50</sub>剂量,观察期结束时可引起试验动物胆碱酯酶活性下降,以及部分动物死亡。低剂量,可能引起或不引起迟发性神经毒症状,其剂量一般为高剂量的1/5至1/10左右。在高低之间,设中剂量组。阳性对照组为500mg

/ kgTOCP。

通常采用经口途径。隔夜禁食，经口给药前 10min 内，所有试验鸡均肌肉注射 10mg/kg 硫酸阿托品作保护处理。

急性试验观察期一般为 21 天。如未见异常反应或有可疑反应时，须再次给药，继续观察 21 天。到期处死做组织病理学检查。如特殊需要，部分动物可延长 2~4 周或更长时间观察恢复情况。亚慢性试验是连续给药 13 周并观察，停药后再观察一周。

每天观察记录试验鸡的外观体征，行为活动，特别是鸡的站立和运动姿势及运动失调程度。迟发性神经毒性体征的分级标准为：I. 步态稍异常；II. 步态严重异常；III. 能以跼站立；IV. 不能站立。一般迟发性神经毒性反应在第 7~10 天开始出现并逐渐加重。每周称体重一次。

对死亡动物和到期处死的动物检查延髓 / 桥脑、大脑皮质、小脑皮质、脊髓并做组织切片。坐骨神经切片要作髓鞘和轴索的特殊染色。光镜观察，必要时可作电镜观察检查。

评定试验农药能否引起迟发性神经毒性及其反应，应结合所观察到的神经毒性效应和神经病理组织学检查结果综合考虑。

一般认为，对有机磷酸酯毒性的基本资料应包括 NTE 试验。在安全性评价中，脑乙酰胆碱酯酶的资料比红细胞乙酰胆碱酯酶更有价值。而血浆胆碱酯酶(丁酰胆碱酯酶)抑制不是毒理学的有害作用。

### 三、神经毒性的研究方法

#### (一) 人体的研究

人体的研究与动物试验方法不同，有的研究方法，如组织病理学检查中枢神经系统及周围神经系统的变化，仅能在死后进行。另外，神经毒性化学物不可能在人体进行观察其毒性效应等，因此人体的研究仅能在人体接触毒物后，在临床观察神经系统某些功能的改变，如感觉功能、运动功能、心理功能、神经病学临床检查，如腱反射包括病理反射。电生理检查如 EEG(脑电图)、EMG(肌电图)、ENG(神经电图)等。利用 CT 核磁共振、PET 等观察脑定位的损伤等。

此外，近代提出某些指标可提示神经毒性化学物的接触水平，利用检测人的外周血，尿、便进行分析。

#### (二) 动物模型研究

建立模拟人体神经系统神经毒性损伤模型，即动物模型，进行各种研究。

1. 形态学方法 组织病理学观察，包括中枢及周围神经系统的光镜及电镜的观察，神经细胞的数目及结构的变化、神经细胞轴及髓鞘的变化等。

2. 各种神经递质，第二信使的 cAMP、cGMP、NO、磷酸肌醇酯、IP<sub>3</sub> 等的测定。

3. 膜的各种离子通道的测定方法如膜片钳法。

4. 全脑、神经细胞培养等体外试验可观察神经毒性化学物的靶部位、及其他上述指标。

5. 分子生物学技术 检测神经细胞特异性基因表达的变化，可早期检出神经毒性的早期微细效应。建立表达特异性神经细胞的标志物的杂交细胞系，通过体外试验，研究体外毒理学筛选方法。

## 第二节 神经行为毒理学

## 一、神经行为毒理学的概念

行为毒性是指各种各样的化学物质对行为方面所产生的有害影响。通常是指感觉、学习和记忆、运动等中枢神经系统的功能障碍。神经行为毒理学(nearobehavioral toxicology)是一门边缘科学,是应用心理学的一个分支,是神经毒理学的研究方法之一。神经行为毒理学主要研究外源化学物特别是低剂量慢性接触对人的神经行为,即人的心理功能的毒性效应。近代已成为筛选神经毒性化学物及药物的重要方法之一,是评价化学物神经毒性的重要方法。随着行为毒理学方法学的逐步完善,一方面促进了实验心理学的一个分支——行为分析学的发展,另一方面,也在化学物质的安全性评价方法中,越来越多地应用行为毒理学的方法。

发展神经行为毒理学的必要性:①环境污染,神经毒性化学物分布较广;②生态平衡破坏,危害人的健康;③高剂量神经毒性化学物的重大中毒事件已逐渐减少,而低剂量神经毒性化学物对人的危害逐渐被人重视。神经行为毒理学的研究方法特点之一,是在临床症状出现前即可检出神经行为的变化即亚临床表现。

行为毒性的发生机制,与其他一般毒性的发生机制是不同的。通常一般毒性是器质性的损伤而引起明显的功能性变化。而仅仅停留在功能性改变,并未明显地出现器质性障碍的情况下,可以依靠行为检测方法来进行评价(如图 11-1)。

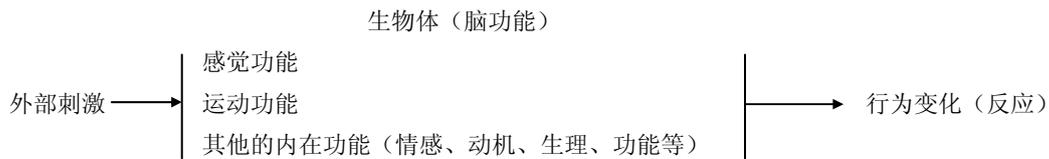


图 11-1 行为的发生顺序

近十几年来,神经生化学、神经生理学等学科的日新月异发展,促进了行为异常发生机制的探讨和研究。在环境和食品中存在的许多具有潜在的神经毒性的化学物质,在低剂量,无明显形态学改变的条件下,对其毒性的评价成为可能。

## 二、行为毒理学的方法

行为毒理学试验方法可以分为一般行为毒理学和行为致畸学两大类。一般行为毒理学主要包括①一般行为;②学习能力;③感觉功能;④活动能力;⑤药理学反应性;⑥神经运动能力等六个方面。

人和动物的行为致畸学主要包括生长、发育过程中,尤其是胚胎发育期间接触某些化学物质所引起的行为和发育异常。

### (一) 化学物质行为毒性研究问题的提出

第二次世界大战之前,评价一种化学物质是否具有毒性是以半数致死量(LD<sub>50</sub>)为指标,这是人类对化学物质安全性毒理学评价的最初阶段;自第二次世界大战到本世纪六十年代末期,人们开始将亚急性和慢性毒理学试验用于评价化学物质的毒性;五十年代末期,震惊世界的“反应停”(thalidomide)事件,对毒理学发展起到一个巨大的推动作用,使人们认识到对化学物质安全性评价仅用急性、亚急性、慢性毒理学试验是不够全面的,还需要做相应的致畸试验。与此同时,Heuper和Case等研究者关于“苯胺和苯胺染料致癌作用的流行病学

调查及研究”的报导，引起了人们对化学物质潜在致癌性的重视。六十年代以后，人们对化学物质的致畸性、致突变性和致癌性进行了广泛深入的研究，建立了相应的评价方法，并逐渐被各国政府列入到化学物质安全性评价的法规中，这是化学物质安全性评价发展的第三个阶段；1973年，Jones和Smith报导了胎儿酒精综合征（fetal alcohol syndrome, FAS），即母亲在妊娠期间长期饮用酒精性饮料引起的胎儿异常综合征，包括特殊的面部畸形，出生前后功能发育障碍和中枢神经系统功能障碍。七十年代，Harada等首次报道了“胎儿水俣病”（fetal minamata），即母亲在妊娠期间接触甲基汞，影响胎儿的神经系统发育，导致胎儿出生后智力和运动功能发育障碍。日本也先后发现了水俣病人（即慢性甲基汞中毒的病人）。这些发现使人们认识到在化学物质安全性评价中，仅仅从形态学的改变来评价是不够的，而应对后代行为和功能的改变给予足够的重视。因此，自七十年代后期以来，行为毒理学尤其是方法学的研究得到了迅速的发展。大量研究表明许多具有潜在的神经毒性化学物质，例如农药、食品添加剂、酒精、多氯联苯（polychlorinated biphenyl, PCB）、重金属等，在不引起明显的形态学改变的情况下，却可以引起行为功能的障碍。继七十年代后期，日本、英国相继在药品鉴定指南中明确指出，必须对后代进行行为方面如运动、学习、视觉等方面的检查，欧洲经济共同体（EEC）也要求其成员国在化学物质安全性评价中，应做“无临床症状生殖和生长发育方面的毒性试验”。八十年代，美国先后在新生产化学物质的安全性毒性评价试验方法指南中，增加了“行为功能观察指标测试试验组（FOB）和活动量”等行为测试方法，把行为毒理学方法作为一种敏感的化学物质安全性评价手段，逐渐列入化学物质安全性评价法规中。最近，美国环境保护局制定和颁布的实验指南中，明确指出了发育神经毒性评价的重要性，并规定对准备登记、注册的杀虫剂、杀菌剂等农药必须进行啮齿类动物行为毒理学实验，包括运动、惊厥反应、学习记忆等方面。这样，行为毒理学由产生到发展至今天，经历了二十年左右的发展历程，同时也构成了化学物质安全性毒理学评价的第四个阶段。

我国自1984年试行“食品安全毒理学评价程度”以来，使食品安全性评价工作逐步纳入法律监督的轨道上来。尤其是九十年代，通过对国外有关化学物质行为毒理学评价方法的研究，结合我国国内具体的实验条件和对行为毒理学方法学的一系列探讨，提出了一套食品安全性行为毒理学评价方法，为今天我国食品安全性毒理学评价，特别是为保健食品和食品新资源开发等鉴定，提供了敏感、简单、易行、可靠的方法，使我国行为毒理学方法学的研究正逐步与世界水平接轨。

## （二）国外研究的最新动态

1998年3月30日至4月1日，召开了国际OECD神经行为毒性的研讨会。会上着重讨论了神经毒性的评价原则及其试验方法，为化学物质和农药的安全性评价提供了统一的、标准的，国际上认可的方法。

在1995年至1996年期间，以美国和加拿大两国为中心，并且有欧洲化学物质生态和毒理学中心（ECETOC）及美国工业卫生署（AIHC）协同参与下，成立了化学物质的安全性评价组织（OECD），于1996年撰写出有关进行神经毒性试验方法指南的初稿。在本次会议上，重新确定了有关的试验方法，尤其是强调应该重视神经系统从发生到成熟这个期间的安全性评价，应该进行多世代的试验，至少要了解妊娠期和哺乳期接触化学物质所产生的影响，而器官形成期的暴露试验则作为参考。会议还明确了发育神经毒性试验（developmental neurotoxicity study）是从神经发生开始到更广义上的神经发育过程中的毒性试验。追加试验

方法说明包括神经行为、神经病理以及神经生理+神经生化三个部分。这说明行为毒理学已经正式应用于化学物质安全性评价中。Hugh Tilson 和 William Sette 两位化学物质安全评价的权威人也出席了会议。会议上对神经毒性的评价方法、有效性、筛选试验及今后方向的研究等方面进行了认真的讨论，并对有关化学物质安全性评价方面即 OECD 指南（guidance document）的出版达成意向性的建议。

### （三）行为毒理学的评价原则

行为毒理学的一般评价原则主要是对那些在环境中存在的可能具有神经毒性，或者可疑具有神经毒性的化学物质以及可能具有潜在神经毒性的物质，可通过各种途径与人类可能接触或进入人体的，原则上都应该进行行为毒性的评价。

### （四）行为毒理学的评价方法

1. 实验动物选择 原则上是选择生理学和动物学上的分类与人类更接近的，同时也要注意容易获得，又经济的动物，如狗、兔、鼠等。目前国际上最通用的动物是大鼠和小鼠。但也要注意，动物对化学物质敏感性问题，例如有的动物，只对某种化学物质产生特异反应，如杀虫剂（diisopropylfluorophosphate,DFP）用啮齿类动物不能检测出其毒性，但给小鸡投予后，经过一段时间，可以发现其神经毒性。所以，对行为毒性实验来说，化学物质的吸收、代谢和排泄等方面与特定动物神经系统易感性的选择应予以足够的重视和充分的考虑。

2. 投予的方式与投予的时间、剂量 对实验动物的化学物质投予方式，一般为静脉、皮下、腹腔内、经口等方式，方法通常与药理学、毒理学实验相同。可以一次，也可以连续多次，投予的时间及其时间的长短，取决于实验的目的。动物年龄的选择，针对不同的化学物质来选择。有的神经毒性物质如铅对幼小动物毒性大、敏感，而有的有机溶剂对老龄的动物产生毒性反应更敏感，尤其是在行为致畸实验中，化学物质对神经系统发育的各个阶段产生影响，如妊娠期尤其器官形成期和哺乳期等。此外，化学物质投予的剂量与实验动物后代行为异常有着一定的关系。

3. 一般行为毒理学方法 行为是在神经系统中所产生的一种包括所有感觉、运动、认知过程的净产物（net product）。行为反应既可以是反应性的（elicited）或操作性的（emitted）也可以是学习得到的（条件性的）或者是非学习得到的（非条件性的）。随着行为毒理学发展，所应用的试验方法也越来越多，但反映的行为类型却比较固定。根据不同的行为类型，行为毒理学试验方法可以大致分为以下六大类，以下的方法主要用于评价啮齿类动物的，以大鼠或小鼠为例，逐一介绍。

（1）一般行为检查：①动物的外观：主要是毛发、眼睑、四肢、呼吸、尾部的位置等状态及分泌物、排泄物的颜色和量。②姿势和运动的观察：运动的种类、姿势、步态。是否有角弓反张，探索行为过多等不安定的状态。③对刺激的反应：主要是对光、声及空气吹浮的反应。④触摸后观察：全身状态（震颤、僵硬）、皮肤颜色、感觉过敏等。⑤反应和生理状况：接近反应、触摸反应、翻正反射、挟尾反应、前后肢抓力及体温、心率、呼吸等。

一般的行为观察见表 11-1，为一般化学物质和药物进行行为毒性试验提供最基本的，必要的试验方法。

表 11-1 行为观察表

动物： 性别： 体重： 受试物名称： 剂量： 给予途径：

化学 物质 投予 后经 过 时 间	姿势	眼 睑	运动性痉挛				反 射			自律症状			
	腹 侧 位 卧 位	下 垂	运 动 量	蹒 跚 步 态	扭 曲 挣 扎	间 歇 性	强 直 性	反 正 反 射	疼 痛 反 射	声 音 反 射	流 涎	呼 吸	排 尿

注：各症状的有无 增强— +2, +1 正常（对照）—0 减少— -1, -2

○人工性的反射刺激记载在备注栏中

(2) 学习能力的测试：目前啮齿类动物学习能力测试的方法种类很多，根据试验原理，大致可以分为如下三类：①适应性测试试验；②经典条件反射性试验；③操作性条件反射试验。

1) 适应性测试试验：适应是指非感觉性适应或非肌肉疲劳所引起的机体对连续外界刺激产生的反应。它是一种原始的学习过程。在这一过程中，动物学会对一些重复的，无任何意义的外界刺激不做出反应。

动物适应性测试是精神药理学研究中的一种传统方法，但对行为毒理学来讲却是一个新的领域。

听觉惊吓适应试验：是一种简单的学习过程。该试验用一个测试箱，箱内有一固定的背景噪音。试验前让动物熟悉箱内环境，试验时，间隔的给动物一固定频率和强度的声音刺激，根据试验的目的不同，声音刺激强度通常为 80—120dB，频率 1—10KHz。记录动物对每次声音刺激的所反应出幅度的变化，用来评价动物的适应性。其影响因素有：i 测试箱内的背景；ii 外环境的背景噪音；iii 声音刺激的强度；iv 刺激的时间间隔等。

探孔适应试验：本试验装置是一个 40cm×40cm 的木板，固定在距底部 30 厘米的水平高度，木板上均匀的打有 16 个孔。试验时把大鼠放在有孔板的中间位置，每天进行一次，每次 2 分钟，连续观察 3 天，记录每次试验期间大鼠伸头探孔的次数。正常动物，在连续三天的试验中，第三天探孔次数明显减少。通常用于评价动物的探索及学习行为。

2) 经典条件反射试验：经典条件反射或巴甫洛夫条件反射，是指当给动物一个中性刺激，同时伴随着一个能引起特定反应的刺激，经过一段时间后，单独给予中性刺激即可引起特定反应。

巴甫洛夫在描述经典条件反射时，引用了下列几个概念：①非条件刺激（UCS 或 US）—指不需任何条件即可引出一些特殊反应的刺激（如食物、电击等）；②条件刺激（CS）—指有条件反射伴随出现的中性刺激（如声、光等）；③非条件反应（反射）（UCR）—指非条件刺激引起的“自动反应”（如分泌唾液或防御反应）；④条件反射（CR）—由非条件伴随一段时间后，单独条件刺激引出的“自动”反应。

条件反射形成取决于下列因素，①非条件刺激伴随条件刺激的次数；②非条件刺激种类；③条件刺激和非条件刺激的时间间隔；④条件刺激的强度和持续时间；⑤条件刺激的可辩程度。

经典条件学习的评价指标是非条件刺激取消后，条件反射持续的时间。在行为毒理学研究中，经典条件反射的试验有消极（被动）—回避学习，味觉厌恶学习和嗅觉厌恶学习三种

试验。现简单介绍一下消极—回避学习实验。

这种学习试验是根据大鼠或小鼠喜欢黑暗和趋向于由高处向低处跳的习性而设计的。该装置是由两个室组成，暗室底板由电极构成。试验时将大鼠或小鼠放在亮室，记录其进入暗室的潜伏期。当动物进入暗室后，即给予一个短暂的电击（非条件刺激），引起一个厌恶反应，为了逃避这个厌恶反应，动物回到了亮室。这样反复多次，动物形成了记忆。这类试验主要用于获得记忆后，投予化学物质是否导致记忆的减退或丧失，目前用于抗健忘作用如抗痴呆药药效评价的第一阶段即临床前试验阶段和评价保健食品功能是否具有改善记忆作用的一种测试方法。

3) 操作性条件反射试验：是指动物在特定的环境下引起的能动行为。也就是说，动物为了自己生存，积极地去适应环境条件，或者避开不利的环境所形成的学习行为。这种行为反复多次，动物在同一环境条件下，随时保持着再现这种学习行为。目前常用的操作性条件反射试验尽管其装置不同，但原理是相同。基本的操作性条件反射试验有以下几类：

I. 主动（积极）回避学习

单向回避；

双向回避；

Simden 型。

II. 迷宫学习

简单迷宫：a. Y 型迷宫；

b. T 型迷宫。

水 迷 宫：a. E 型或 M 型水迷宫；

b. Biel 水迷宫。

食物强化的迷津试验：

a. Olton 空间迷宫；

b. Hebb-williams 迷宫；

c. 多重迷宫。

III. 操作性条件反射

主动（积极）操作性条件反射 例：Skimmer 箱

被动（消极）操作性条件反射

下面以主动操作性条件反射 Skinner 箱为例。简单予以说明。

传统的操作性条件反射的实验装置是 Skinner BF 为测定动物学习能力，而设计的一种特殊的装置 Skinner 箱。在这种装置中，动物的操作性反应是压杆，得到的强化是一粒食饵或一滴水。实验前控制动物的饮食或者饮水，使其具有饥饿感或口渴感，易于训练，试验时，通过不同的强化程序来控制动物的操作反应率。如通过改变强化的类型、强度和时间的长短，来观察动物为了获得报酬（食饵、水等）而进行的积极学习行为，以反应率和强化率来衡量。

在操作性条件反射性实验中，常用的强化程序有：

I 主动（积极）强化程序

i 连续强化（CRF）

ii 间歇性强化

a 时间间隔 定时间隔（F1）

## 变时间间隔 (VI)

b 比率 定率 (FR)

变率 (VR)

c 低频率差别强化

d 条件抑制

II 被动 (消极) 强化程序

i 连续回避 (Sidman 型)

ii 非连续回避 (辨别型)

其操作性反射的习得率受反应和强化之间的时间间隔, 强化物的性质, 如大小, 浓度, 易消化程度等因素的影响。

(3) 感觉功能的测试: 到目前为止, 在行为毒理学领域中, 用于测试动物感觉功能的方法多数还是定性的方法, 而不是敏感性的定量方法。目前常用的试验方法有: ①嗅觉定向试验; ②视觉定位试验; ③辨别学习; ④听觉惊吓反应; ⑤悬崖回避试验; ⑥味觉定向试验。其中一些方法如视觉定位试验、悬崖回避试验常常应用在行为致畸学方面的研究, 以评价幼鼠的神经系统发育状况。

(4) 活动量的测试: 测试大鼠、小鼠活动量的方法很多, 主要有: ①短时间活动量 (几分钟) a. 旷场试验; b. 有孔板试验; c. 运动解析装置。②长时间活动量 (几小时)。③昼夜自主活动量。

目前在日本用于活动量测试的装置, 大多与计算机相连, 即可以测定几分钟, 又可以连续测定几天的活动量, 数据全部使用计算机自动分析, 常见的装置有短期活动量的测试系统和长期活动量的测试系统以及转轮活动笼等。

这类试验主要通过动物活动类型及活动量多少分析, 来评价化学物质如一些药物和农药是否对运动功能产生损害。

(5) 药理学反应性测试: 主要用于行为致畸学的研究。请参考行为致畸学部分。

(6) 神经运动能力测试: 该测试主要用来评价一些特异性反射的发育如平面翻正反射, 负趋地性和运动协调能力。这些方法, 不仅在一般的行为毒理学评价方法中应用, 而且更多是在行为致畸性研究中应用, 主要是对反射形成和运动发育状况进行评价。其具体方法, 我们将在行为致畸学方法学中做一介绍。

4. 行为致畸学方法 越来越多的资料表明, 许多化学物质如药物可以影响动物的生长发育, 尤其是在妊娠期间接触如酒精、甲基汞、农药等化学物质, 能够引起后代发育迟缓, 学习记忆能力减退, 运动能力下降等。

(1) 引起人和动物畸形的因素有遗传、染色体畸变、环境因素如离子辐射、感染、代谢障碍和药物以及其他化学物质、几种因素联合作用和不明因素。

(2) 能引起人类畸形的药物和化学物质: 这些药物和化学物质至少在一种实验动物身上被发现和证实可以导致发育异常或畸形, 这些药物和化学物质归纳为表 11-2。

(3) 胚胎组织对致畸原的易感性: 在妊娠过程中, 胚胎组织对化学物质的易感性, 随着妊娠时间的推移而有所变化。在着床期和器官形成期, 胚胎对致畸作用的化学物质最敏感。

(4) 致畸性化学物质的作用机制: 致畸性化学物质作用于生物有机体引起畸形, 可以通过不同的方式, 有的是作用于细胞、亚细胞水平, 也有的是改变化学物质化学结构, 还有的

是作用于分子水平如 DNA 等。这种作用机制有的很复杂，因为它不仅仅以某一种单一方式作用于胚胎组织。例如羟基脲，是一种抗肿瘤药，它不仅诱发胚胎细胞产生自由基反应（free radical reactions），而且还抑制胚胎 DNA 的合成。

表 11-2 能引起人类畸形的药物和化学物质

药物、化学物质	胎儿选择性可逆作用
酒精	智力发育迟缓、面部畸形等
烷基化物	生长迟缓，腭裂等
抗代谢物	生长迟缓，眼、耳发育畸形
酰胺咪嗪（抗惊厥和镇痛药）	增加神经管缺损的危险性
一氧化碳	智力发育迟缓，小头
铅	发育能力减退
甲基汞	智力发育障碍
多氯联苯	死产、兴奋、生后的发育延迟
三甲双酮	发育迟缓、心脏发育异常
反应停（thalidomide）	胎儿畸形、心脏缺损

胚胎的发育是一个复杂的过程，它涉及到许多的过程，尤其有一些是在妊娠过程中所特有的，如细胞分裂过程中，需要产生细胞结构蛋白，受体分子及细胞间物质等。还有一些也是维持发育过程所必不可少的，即来自于环境刺激的信息，促使机体产生诱导（剂）分子和信号分子等。所以，胚胎期易受环境中各种各样的化学物质的干扰。

（5）行为致畸学的剂量—反应关系：功能性的缺陷，通常在断乳后才表现出来的。一般来说，在许多评价发育水平试验中，常用胎儿死亡、畸形、生长迟缓等指标。因为在不同的胚胎组织中，其遗传结构及对化学物质的易感性不同，并不是所有胚胎组织对同一化学物质的同一剂量发生反应。但是实验的结果表明在剂量和毒性反应之间有明显的剂量—反应关系，即随着剂量增加，出现毒性反应的频率和严重程度也增加。其中阈值（threshold）是表明接触某些化学物质的最大安全剂量。这一点与遗传致癌物质的作用是不同的。遗传致癌物质剂量—效应曲线在最初就是交叉的，即表明在任何剂量条件下，都有引起致癌的可能性。

（6）目前各种神经毒性物质的分类：环境中的各种神经毒性物质如杀虫剂（根据化学结构）：有机氯（氯丹、DDT 等）、有机磷化合物（马拉硫磷、对硫磷、溴硫磷等）、氨基甲酸酯类（西维因、残杀威、福美双、代森锌等）、拟除虫菊酯类（丙烯菊酯、溴氯菊酯、杀灭菊酯等）、汽油生产中的添加剂（TOCP）、有机溶剂（苯、苯乙烯、甲醇等）、天然药物（兴奋性或者惊厥药）、海中的毒物（如河豚毒素）和重金属（铝、铅、汞等）。这些物质即可以直接作用于神经组织，又可以影响到其他的器官和组织。其作用机制，不尽相同，有的缺乏特异性。这就给检测方法带来一定的困难。

#### （7）神经毒性物质作用部位

研究表明，神经毒性物质能够作用于突触前，影响神经递质的合成，贮存、释放、再吸收和代谢等过程。同时，它们也可以作用于突触后的部位，干扰神经递质的受体、降解及信号传递。由于神经组织的复杂性、有时很难明确神经毒性物质作用的确切部位。这些神经毒性物质引起的神经毒性即可以是直接的也可以是间接的。尽管血脑屏障只允许如一些营

养素,氨基酸、激素、脂肪酸、肽及碳水化合物等某些小分子的物质,通过主动输送系统进入脑组织中,来保护中枢神经系统,但是,在某些区域却缺乏这种保护作用。表 11-3 简略地归纳了神经毒性物质作用于神经系统的可能部位。

表 11-3 神经毒性物质的作用部位

神经系统部位	影响过程
中枢神经系统 (CNS) 和末梢神经系统 (PNS)	
神经元 (细胞体, 轴索, 神经末和树突)	与离子有关的电子传递 泵 通路 通过突触传递的化学过程 (神经递质) 突触前: 传递、合成、贮存、释放、再吸收、代谢 突触后: 受体、代谢、第二信使、信号传递
神经胶质 (星形胶质细胞、少突神经胶质细胞和小神经胶质细胞)	再吸收、代谢
其他的与神经细胞和神经胶质细胞功能相关的非神经性过程	碳水化合物 脂类和脂肪酸 核酸、蛋白质的合成和分解
血脑屏障	调节进入脑组织的各种物质

#### (8) 行为致畸的评价方法

1) 药理学反应性测试: 在行为致畸研究中, 生后动物药理学反应性评价包括三个方面的内容: ①用在妊娠期接触过化学物质的动物所生的胎仔情况, 来评价其对该物质反应的敏感性。②用与妊娠期接触过化学物质所作用的靶器官相同的化学物质投予动物, 评价其对新接触的化学物质反应的敏感性。③为了排除机体代偿性作用对轻微性损害的掩盖, 用一些公认的紧张性刺激药品处理动物, 使动物处于药理学“激发”状态, 然后再对其进行行为功能的评价。

药理学激发试验不仅可用于行为致畸性研究, 而且也可以用于亚急性和慢性行为毒理学试验研究。

2) 行为致畸学方法神经运动能力的测试: 平面翻正反射 (surface righting) 试验: 以生后 3 天的幼鼠为对象, 测试时, 将幼鼠仰放于试验台的一个平面上, 观察其身体至四肢复位接触台面所需要的时间。所有试验的幼鼠均在 2 秒内翻正所需天数。

负趋地性 (negative geotaxis) 试验: 试验装置是一个坡度为 25° 的粗糙斜面, 测试时将幼鼠头朝下放在斜面上, 记录它转身 180° 所需的时间。大多数 Sprague-Dawley 大鼠在生后 7 天可完成转身动作, 在生后 9—10 天, 转身能在很短时间内完成。

旋转试验 (pivoting activity): 生后 4—5 天幼鼠, 其前肢功能比后肢功能发育好, 所以幼鼠早期在平面上的运动是以后肢为支点在原地转圈, 这种运动称之为旋转运动。随着年龄增长, 这种运动逐渐加快, 直至消失, 生后 12 天仔鼠即出现走动。通常用旋转运动来评价动物的运动发育状况。评价指标是在观察期间内, 幼鼠旋转所占的时间或旋转的度数。

空中翻正试验: 测试时将动物从 60 厘米高度仰卧位丢向一个有垫的平面, 观察动物着

地的姿势。空中翻正反射包括转头，前肢旋转，后肢旋转第一系列顺序运动。Wistar 大鼠生后 12~17 天这种反射发育完全。评价指标为三次测试正常落地所占的比例。

**游泳能力 (swimming development) 测试:** 1970 年 Schapiro Sales 等对大鼠游泳能力的发育进行了研究。他们根据大鼠游泳时身体姿势及四肢利用情况对其游泳能力的发育进行评价。试验时将幼鼠放在水温为  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  的容器内，根据动物游泳的姿势，四肢利用情况及游泳方向，给予评分，根据得分的高低，评价其游泳能力发育状况。大鼠在生后 6~25 天进行这方面的评价。

**前肢抓力:** 测试时，将幼鼠的前肢放在一根细金属棒上，等其抓住后松手，记录其握杆的时间。这个试验用于评价脑内黑质纹状体系统多巴胺神经功能的低下，尤其是帕金森氏病等与锥体外路症状相关的行为改变。

**握力试验:** 主要是用来评价运动功能障碍，尤其是可以对骨骼肌的骨力做定量评价。但是，骨骼肌的运动是与复杂的神经回路相联系的，对其运动障碍的研究，有时也需要借助于电生理学的方法。

**转棒运动试验:** 该试验主要用于测试动物的协调运动能力。测试装置由转棒、电机和自动计时器三部分组成，转棒的直径根据试验动物的不同而不同。成年小鼠的转棒直径为 2.5 厘米，成年大鼠的转棒直为 7.5 厘米，棒的转速可以调节。试验时将鼠放在棒上，调节转速、记录它在上停留的时间及一定时间内落下的次数。

### 3) 行为致畸学方法—感觉功能的测试

**嗅觉定向试验:** 嗅觉定向试验用于测试幼鼠寻窝能力和嗅觉发育状况。大鼠在生后 8 天就具有辨别原窝气味的能力。测试时将幼鼠放在一个长方形的装置中间，在装置的两端分别放上原窝的窝料和新窝料，记录幼鼠在试验期间移动的方向和移动的距离。因该试验以嗅觉为线索，在测试时要控制好测试室的气味，同时也应排除同窝小鼠叫声的干扰。

**视觉定位试验:** 该试验用于评价幼鼠视力发育状况。测试时，抓住动物尾巴，头向下，使之面部和前腿朝向一个平面的边缘，距离充分缩小，但触须不可触及边缘。如果在触须触及边缘之前幼鼠用前爪抓住了边缘，证明视觉发育正常，否则视为尚未达到正常水平。

**听觉惊吓反应:** 听觉惊吓反应是行为致畸性研究的一种常用方法，它用于评价动物的听觉发育情况。测试时给动物一个固定频率和强度的声音刺激，记录惊吓反应是否出现。大鼠在生后 12 天即可出现听觉惊恐反应。年龄大一点的动物，听觉惊吓反应通常作为听觉惊吓适应观察的内容之一。

**悬崖反射和回避试验:** 这个试验用于评价幼鼠触觉的发育状况，试验时将幼鼠放置于一个平台边缘，鼻和前趾或一侧肢体越过边缘，记录其离边缘所需的时间。

综上所述，目前无论国内还是国外，化学物质安全性毒理学评价都包括急性毒性、亚慢性毒性、慢性毒性和致畸、致突变、致癌试验几部分内容。化学物质行为毒性的安全性评价和常规毒理学评价相类似，包括急性行为毒性、亚慢性行为毒性、慢性行为毒性和行为致畸性试验几部分。

行为是具有动物各系统功能相互配合的一种综合表现，它包括感觉、运动、学习、记忆、情绪和性功能等多方面。因此，很难用一般行为毒理学和行为致畸学方法中的某一种或单个试验来评价化学物质对动物或人行为的影响。目前国际上常用的而且推荐使用的是用一组试验即反映行为各个方面的指标综合起来来评价化学物质的行为毒性，已经被许多国家所采

用。

### (三) 神经科学的发展与行为毒理学

最近十年来,神经科学方面,特别是在脑神经活性物质以及受体的研究中,免疫组织化学,分子生物学等技术应用,逐渐阐明了神经活性物质如乙酰胆碱、多巴胺、5-羟色胺、 $\gamma$ -氨基丁酸等在脑组织及其他神经系统中的生理功能和分布。因此,这些物质的结构及动态变化,构成了行为学变化的基础,为化学物质在行为毒理学、药理学等方面的评价提供了生物化学、生理学方面的依据。

众所周知,脑组织是由几百亿个神经细胞,神经胶质细胞所组成的。正是由于这种构成在大脑组织各个部位的微妙变化,才带来了大脑功能方面的多样性和复杂性,也对脑功能的研究,成为神经科学的一个重要课题,越来越引起人们关注。

#### (一) 行为与神经生化学

1. 神经传导顺序现在和未来 构成脑细胞的基本单位是神经细胞和神经胶质细胞。神经细胞突起有树突和轴突二种。一般说明,树突是从其他神经细胞接受信息,而轴突是把信息传给下一级神经细胞。这种神经细胞间的神经传导有化学和电突触两种。在化学突触中担当神经细胞间信息传递的物质是神经递质。通过神经递质的释放及与特异受体结合而发挥作用。因此,神经传导中最重要基础是神经递质的产生部位(神经细胞的脑内分布)、释放部位(终末的脑内分布)、受体蛋白所在部位及产生部位(神经递质与神经细胞结合的部位)。

#### 2. 神经递质及神经调节物质

(1) 神经递质及神经调节物质的种类及分类:到目前为止,有数十种物质具有神经递质或神经调节的功能。哺乳动物的神经递质主要分为:①氨基酸②乙酰胆碱(acetylcholine,ACH)③生物胺(biogenic amine)④神经肽类(neuropeptide)四大类。由于神经肽类中的大部分在神经突触传递中的作用是间接的,所以也被称为神经修饰或者调节物质(neuromodulator)。哺乳动物主要的神经递质及神经调节物质如下:

##### A. 氨基酸

谷氨酸(glutamic acid,GLN)、天门冬氨酸(aspartic acid,ASP)、 $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid,GABA)、甘氨酸(glycine, GLY)、氨基乙磺酸(taurine,TAU)

##### B. 乙酰胆碱

儿茶酚胺:多巴胺(dopamine,DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine)、肾上腺素(epinephrine)

吲哚胺:5-羟色胺(5-hydroxytryptamine,5-HT)

组胺

##### D. 神经肽

P物质、 $\beta$ -内啡肽、脑啡肽、促甲状腺激素释放激素、促黄体激素释放素、醛固酮等。

##### E. 腺(嘌呤核)苷(adenosine)、前列腺素(prostaglandin)

其中乙酰胆碱,单胺类,神经氨基酸类等一般被认为是典型的神经递质。

(2) 神经递质及神经调节物质在脑内分布:对神经递质及神经调节物质在脑内的分布检测,最有效的方法是免疫组织化学为中心的形态学方法。最近应用的神经递质 mRNA 所在细胞水平的分析方法原位杂交(in situ hybridization,ISH)方法,可以用来检测微量的 mRNA 含量。许多种神经递质即可共存于同一个细胞中,也可分布有其化学的神经网络。

(3) 神经传导以外的功能: 各种神经肽、神经调节物质不仅与神经传导有关, 而且在神经细胞分裂、增殖过程中起着营养作用, 如营养(生长)因子, 参与有关 CGRP 神经再生等。

(4) 受体: 神经递质及神经调节物质受体主要是离子型和 G 蛋白型受体二种。

(5) 转运蛋白: 各种神经递质在突触前膜有特定的转运蛋白也叫膜蛋白。这种蛋白对于神经递质或神经调节物质的再吸收、利用起着重要作用。目前  $\gamma$ -氨基丁酸、多巴胺、甘氨酸、5-羟色胺、谷氨酸等物质的转运蛋白的一级结构已经清楚。同时还发现一种神经递质可能存在着多种转运蛋白, 这些转运蛋白结构或者功能的变化对药物的生理作用及行为有影响。

下面简单地介绍几种被公认神经递质、以便于对其与行为的关系有进一步了解。

### 3. 多巴胺神经系统

(1) 多巴胺的合成、分解与代谢调节。

多巴胺神经细胞合成多巴胺, 它的主要限速酶是酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH), 其代谢除了受 TH 的调节外, 还受到合成的多巴胺反馈抑制调节及突触间隙中多巴胺浓度对突触前多巴胺受体的抑制等调节。

(2) 多巴胺神经系的投射路。

(3) 多巴胺受体和转运蛋白: 多巴胺受体一般主要分为促进型  $D_1$  和抑制型  $D_2$  两大类。最近应用分子生物学(克隆)技术在黑质-纹状体及腹侧被盖部边缘系多巴胺神经通路上发现了多巴胺转运蛋白。可卡因可与此多巴胺转送蛋白相结合。

(4) 多巴胺与行为变化: 行为毒性是与多巴胺神经系统密切相关的。目前研究表明, 6-羟多巴胺 (6-hydroxydopamine) 对多巴胺神经元有破坏作用, 但对神经节细胞体的毒性是轻微的; 红藻氨酸 (kainic acid) 破坏 DA 神经节后细胞体; 鹅膏蕈氨酸 (ibotenic acid) 可损伤多巴胺神经节细胞体; 苯异丙胺 (amphetamine) 使儿茶酚胺的游离过剩; MPTP 引起黑质-纹状体系、中脑脑干的退化等可导致实验动物行为毒性。现举一例加说明。给机体投予 MPTP, 它在单胺氧化酶 (MAO) 作用下转变成 1-甲基-4-酚基-吡啶 (1-methyl-4-phenyl-pyridine, MPP<sup>+</sup>), MPP<sup>+</sup> 可以引起黑质、纹状体多巴胺神经元的损伤, 其症状与帕金森氏病 (parkinson's disease) 的症状类似。在这些行为毒性中, 如运动失调 (akinesia)、震颤 (tremor)、肌紧张 (rigidity) 等可以导致人和动物运动能力下降。因此, 对使用含 MPP<sup>+</sup> 的杀虫剂的东亚地区应该进行帕金森氏病性痴呆的流行病学研究。同时也应该对能引起 DA 神经元, DA 代谢异常的化学物质给予注意。

### 4. 5-羟色胺神经系统

(1) 5-羟色胺 (5-HT) 的合成及分布: 5-HT 是由色氨酸 (tryptophan) 经色氨酸羟化酶的作用而生成的。应用组织荧光法和放射标记法, 确定了 5-HT 在神经系统特别是在脑内的分布。

(2) 5-HT 受体: 1991 年 10 月由 serotonin club receptor nomenclature committee 提出了最新的被公认的 5-HT 受体的分类, 即 5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>3</sub> 和 5-HT<sub>4</sub> 四类。主要分布在海马 CA<sub>3</sub>、黑质、扁桃体、脑干等部位。

(3) 5-HT 的生理功能: 5-HT 对神经系统作用很广泛。大脑皮质的 5-HT 主要参与感觉及睡眠-觉醒的周期调节。视床下部和脑干自律神经核的 5-HT 参与人体内维持人体的内环境

稳定、调节神经内分泌和内脏的功能。同时它也参与中枢性痛觉功能及脑血管、脑血流量的调节。

(4) 今后研究方向：最新的克隆技术的应用，使许多受体被确定下来，但对其结构的分析，还有赖于原位杂交的方法通过 mRNA 的分布，免疫组织化学的方法，采用受体特异性抗体，来阐明脑内 5-HT 受体的结构，同时对其转运蛋白的研究也为 5-HT 对神经系统的作用，尤其是神经信息传递方面提供科学依据。

#### 5. 乙酰胆碱 (acetylcholine, ACH)

(1) 乙酰胆碱的合成、分解和代谢调节：乙酰胆碱是一种主要的末梢神经递质，由乙酰辅酶 A 和胆碱在胆碱乙酰基转移酶 (choline acetyltransferase, CHAT) 的作用下合成，在乙酰胆碱酯酶的作用下，被分解为胆碱。乙酰胆碱主要在神经细胞体内合成，当神经末端突触小泡被激活，释放到突触间隙而游离。游离的乙酰胆碱与受体结合，在乙酰胆碱酯酶的作用下，分解。产生的胆碱与突触前膜的胆碱转移蛋白结合而被重吸收、利用。

(2) 乙酰胆碱的生理功能：乙酰胆碱作为自主神经系统的神经活性物质，参与交感神经和副交感神经的调节作用。

6. 氨基酸类神经递质 氨基酸作为中枢神经递质，一般主要是依据其对中枢神经系统作用分为兴奋性神经递质，如：谷氨酸、天门冬氨酸和抑制性神经递质，如： $\gamma$ -氨基丁酸、甘氨酸和氨基乙磺酸两大类。GABA 是脑上部的主要抑制性神经递质，甘氨酸是脑干下部和脊髓的主要抑制性神经递质。

在这里，主要介绍一下有代表性的兴奋性神经递质—谷氨酸和抑制性神经递质— $\gamma$ -氨基丁酸。

##### (1) 谷氨酸

合成和分解：谷氨酸是在中枢神经系统内，特别是脑组织中含有最丰富的氨基酸，大约占游离氨基酸的 30% 左右。它不仅在神经信息传递方面起作用，而且在代谢方向也起着重要的作用。由于其不能通过血脑屏障，所以，被认为只能是在中枢神经系统内合成。与神经信息传递有关的谷氨酸是由谷氨酸—谷氨酰胺回路而生成的。然后在神经末梢存在的谷氨酰胺酶作用下，释放出谷氨酸。谷氨酸在突触间隙与受体结合而发挥作用。剩余的谷氨酸被重吸收、再利用。

作用机制：五十年代起，人们就了解到脑内给予谷氨酸，可以引起痉挛性发作。现在研究表明，谷氨酸作用是通过突触后存在的谷氨酸受体而发挥的。

谷氨酸与行为的关系：随着谷氨酸受体研究的不断深入，人们发现在精神异常和精神性疾病的患者治疗过程中，使用的药物，有一些是通过与中枢神经系统的谷氨酸受体直接结合而产生作用。同时还发现精神性疾病患者的脑中谷氨酸受体结构出现异常。更引人注目的是脑中谷氨酸的过多可引起癫痫样的意识障碍和痉挛，而脑中谷氨酸的低下又可能与精神分裂症及痴呆有关。目前认为：谷氨酸这种神经递质对动物、人行为的调节是非常重要的。它的低下可引起学习、记忆障碍及行为异常。

##### (2) $\gamma$ -氨基丁酸

合成与分解： $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 是中枢神经系统中主要的抑制性神经递质。它与谷氨酸一样，不能通过血脑屏障，只能在脑组织被合成。脑组织存在  $\gamma$ -氨基丁酸几乎全部是谷氨酸脱羧而产生。它的代谢主要通过中回路和  $\gamma$ -氨基丁酸支路进行的。

$\gamma$ -氨基丁酸在神经末端,突触后及神经胶质细胞的分布和代谢:在神经末端,GAD( $\gamma$ -氨基丁酸合成酶)作用下,从谷氨酸所产生的 $\gamma$ -氨基丁酸,一部分进入突触间隙,产生抑制性神经冲动。另一部分进入神经胶质细胞并在神经末端线粒体中,在GA-GA-T(GABA分解酶)作用下,分解成丁二酸,进入三羧酸循环。

**GABA的生理作用及与行为关系:**GABA是1950年最初在神经组织中发现的。在以后的生理和药理学的实验中表明,它分布非常广泛;在无脊椎动物及脊椎动物的神经系统中,起着抑制性神经递质作用的一种氨基酸。体内的试验也表明,GABA使神经突起延长和促进突触形成的作用。应用免疫组织学方法发现,大鼠突触形成前(即胎后期14天起),就可以检测到GAD,表明GABA的增加是伴随着神经系统的分化过程。此外,GABA的生理作用还与生长因子的分泌,心血管系统及麻醉等作用相关。目前,人们认为GABA与亨廷顿舞蹈病(huntington's chorea disease)、帕金森氏病(parkinson's disease)、癫痫、精神分裂病、老年性痴呆、肝性脑病等疾病的发生可能有关,但机制尚不清楚。

### (二) 微小透析膜法

微小透析膜法(in vivo microdialysis)是七十年代开发的一种方法。直到八十年代后期九十年代初才开始在药理学、生理学、生物化学、精神神经科学和神经内科学等领域中应用。这种方法,并结合高效液相色谱电化学检测器系统(HPLC-ECD),使动物(主要是大鼠和小鼠)在无麻醉和无拘束状态下,动态监测脑特定部位的神经传递物质。

1. 微小透析膜方法的实验装置组成及原理 它主要是由样品采集及组织定位装置、灌流系统及测试部分等组成。其测定原理在自然状态下,在动物的脑组织中某一部位插入探针(probe),然后通过灌流液的流动,收集细胞外液,最后通过分析测试系统来了解细胞外液中神经递质的浓度及动态变化。

2. 脑组织定位的方法 大鼠脑组织定位主要是依据George Paxinos和Charles Watson所编写的大鼠定位解剖学图谱来对大鼠脑的任何一部位进行定位。这种方法,已经在国际上得到普遍的承认,并被许多科学家和研究者们所采用,尤其是在神经科学、神经组织化学和行为科学及心理学等方面研究中,得到广泛的应用。

3. 微小透析膜方法的应用 过去对于记忆、学习和脑疾患等脑内神经活动的研究,尽管体内神经系统活动的研究是必要的,但由于方法的局限,一般只能应用体外的方法。目前,CT、PET、MRI等大型仪器的使用,可以测定脑波和细胞外电位活动等电生理指标。由于神经系统的活动变化很快,所以,神经递质释放量的神经化学的定量的研究就显得越来越重要了。自八十年代微小透析膜方法的逐渐发展,为神经科学的研究提供了一个有效可行的方法。现在这种方法已经逐渐被许多的研究领域所应用。例如:药物动力学、神经生理学、脑生物化学和帕金森氏病等的研究。同时这种方法也正在不断地完善。

### (三) 神经毒性评价的分子生物学方法

分子生物学技术的应用促进了神经生物学的发展,产生了一门新兴的学科—分子神经毒理学。由于哺乳类大脑组织遗传的多样性,用重组DNA技术等来揭示神经系统基因的结构和功能。例如对受体的研究。通过分子克隆和基因库筛选原则,推论出的一系列受体的氨基酸排列顺序。然后这些受体在异种的细胞中被表达,并且对它们的功能进行体内研究,所以,分子生物学技术的应用将在更高的水平上有利于对人体大脑功能的了解。

1. 用分子生物学方法来测定特异性神经毒性物质的机制 现举一个例子予以说明。三

甲基锡 (trimethyltin, TMT) 是一种有机锡, 它能特异性能与啮齿类动物大脑不对称性区域的神经元结合。在对照组大鼠的海马组织中, CA<sub>1-3</sub>锥体细胞能表达一般神经元的标记物突触蛋白和海马中大量存在的一种神经元标记物SNAP-25。神经胶质细胞 (glial cells) 对于神经胶质纤维酸的一种蛋白质 (GFAP) 不发生反应。随着神经毒物的给予, 实验组的大鼠海马CA<sub>1-3</sub>神经元发生退化, 推动了对突触蛋白和SNAP-25 的免疫学反应性; 相反, 由于胶质细胞的大量增生产生了大量的GFAP, 使其反应成阳性。

2. 底物杂交技术 这种方法可以分离出在 TMT 特异细胞中被表达的 cDNA。这个 cDNA 的筛选主要用 Northern blot analysis。

综上所述, 为了更好地了解神经毒性作用的机制, 最好的方法采用行为, 神经生物化学, 组织学和分子生物学等技术方法联合应用。

#### (四) 行为毒理学在食品安全性评价方面的应用

近二三十年来, 随着经济的不断发展, 在工农业生产中, 人们使用的化学物质越来越多。估计目前人类接触的化学物质约有 5.6 万种, 其中用于食品的至少有几千种。所以, 在食品的生产、加工及供销各环节中, 通过不适当的使用食品添加剂、工农业生产中存在有害物质如农药、重金属等污染食品, 都会给人体带来危害。大量的研究表明, 有许多潜在神经毒作用的化学物质, 在不引起明显形态改变的情况下, 即可引起行为改变。还有一些化学污染物在低剂量时, 不引起实验动物的病理组织学改变, 但却能使动物功能和行为发生改变。因此, 在美国、英国、法国、日本等国家化学物质安全性评价的有关法规中, 规定了行为方面的测试内容。我国也在八十年代后期开始对农药、有机汞、酒精、铝、苯乙烯和缺铁性贫血等一系列的研究工作, 并结合我国具体的实验条件, 提出一套食品安全性行为毒理学评价方法。

##### (一) 行为毒理学评价方法的选择原则

1. 所选择的测试方法和国际上现行的有关实验指南相符合。
2. 作为一组试验, 测试内容应包括感觉、运动、学习、反应性等有关方面。
3. 测试应为无损害性, 前后行为测试不产生相互干扰作用。
4. 简便、易行、适用于毒性筛选的目的。
5. 所选用的方法应具有较高的敏感性, 可靠性和推断作用。

##### (二) 在食品安全性评价中的应用

1. 农药 农药毒性机制主要是作用于中枢和周围神经系统。它是食品中常见的污染物。许多研究表明, 有机氯、有机磷、氨基甲酸酯类及拟除虫菊酯类农药都可以引起一种或多种行为的异常。鉴于我国目前使用较多的具有神经毒性作用的农药, 重视和开展行为毒理学的研究工作, 具有一定的现实意义。

2. 金属 一些重金属除了可引起急、慢性中毒外, 还具有神经行为毒性作用, 如镉、铅、汞、砷等。表现为运动能力障碍, 学习记忆能力降低, 同时动物发育迟缓, 具有明显的行为致畸作用。所以, 这些金属对食品造成的污染, 将直接威胁人类健康。

3. 含酒精饮料对实验动物行为功能的影响 其结果表明, 含酒精饮料可以干扰胎鼠的正常发育, 同时对学习记忆也有不良的影响。建议孕妇不宜大量饮酒, 以防对胎儿产生潜在的影响。

4. 具有学习记忆作用的各种保健功能食品 以上仅仅举了一些行为毒理学在食品安全

性评价中应用的例子。随着行为毒理学方法的不断完善、不断发展，相信会有越来越多的更简便、更敏感、更有效的评价方法。这些无疑会给今后行为毒理学的研究提出新的课题，同时也会对人类健康的保护带来巨大的益处。

（史永亮 季爱玲 于 芳 曹 瑞）