

特约来稿

神经递质检测方法的研究进展

万金霞^{1,2} 李毓龙^{*1,2,3,4}¹(北京大学生命科学学院膜生物学国家重点实验室, 北京 100871)²(北京大学麦戈文脑科学研究所, 北京 100871)³(北大-清华生命科学联合中心, 北京 100871)⁴(北京脑科学与类脑研究中心, 北京 100871)

摘要 人的大脑中存在数以亿计的神经元,而神经元之间的信息传递主要依赖于通过化学突触发挥作用的神经递质。精确研究神经递质的动态变化对于理解神经系统的功能和研究神经系统疾病的发病机理等均具有重要意义。本文从技术原理、应用以及局限性等方面总结了近年来发展的一系列检测神经递质的方法,着重介绍了基于 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)激活原理构建的可遗传编码荧光探针,此系列探针在特异性、灵敏度及时空分辨率方面均有优异的表现,同时,在活体动物实验中也表现出良好的信噪比。此外,此类探针的构建原理具有普适性,可用于开发检测不同神经递质的荧光探针。

关键词 神经递质; 荧光成像; G 蛋白偶联受体; 评述

1 引言

在人类的大脑中存在数以亿计的神经元,后者通过数万亿的突触组成复杂的神经网络。不同种类的神经元通过近端或远程投射控制着一系列重要的生理活动,包括运动、感知、意识、情绪、学习和记忆等^[1]。神经元之间的交流主要依赖于化学突触,突触前神经元发放动作电位,位于突触前膜上电压依赖型的钙离子通道打开,并引起钙离子的内流,后者进一步导致突触小泡与突触前膜融合,并将小泡内的神经递质释放到突触间隙,神经递质与位于突触后膜的受体结合,引起下游神经元兴奋性的改变,最终实现神经元之间信号的转导^[2]。

神经递质的正常释放对于维持机体正常的生理功能发挥着重要作用,同时,神经递质的释放与调节出现异常时也与一系列的病理过程相关,如抑郁症(Depression)、成瘾(Addiction)、帕金森氏症(Parkinson's disease, PD)和阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)等^[3-6]。因此,在分子、细胞、环路等层面精确地分析检测神经递质是如何参与并调节上述生理和病理过程,能够更深入地了解疾病的发病机制,并为临床药物的开发奠定基础。人类的大脑中存在上百种神经递质,包括氨基酸类神经递质(如谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA))、单胺类神经递质(如多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)、5-羟色胺(5-HT))、胆碱类神经递质(如乙酰胆碱(ACh))、多肽类神经递质(如阿片肽、催产素)等。其中,大脑主要的兴奋性神经递质谷氨酸以及抑制性神经递质 γ -氨基丁酸在突触前膜释放后,可快速地与位于突触后膜的离子型受体结合,并引起神经元兴奋性的改变^[7]。但对于多巴胺、催产素这类神经递质而言,其受体主要是代谢型受体,即 GPCR,这类受体介导的信号转导相较于离子型受体时程更长、空间更广^[8]。不同种类的神经递质释放模式的复杂性、时间空间的差异、受体种类以及分布的不同,使得精确检测神经递质释放的难度大大增加,传统的电生理检测方法很难实现此目标^[9-11]。近年来,为了实现神经递质释放的精确检测,已开发了包括生物化学和电化学等一系列检测方法。同时,随着成像技术的高速发展,可遗传编码的荧光探针也逐步发展起来。本文对近年发展的可检测神经递质释放的新方法进行了评述。

2019-09-11 收稿; 2019-12-10 接受

本文系北京市科委生命科学前沿创新培育项目(No. Z181100001318002)、国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(No. 2015CB856402)和国家自然科学基金项目(Nos. 31671118, 31371442)资助

* E-mail: yulongli@pku.edu.cn

2 神经递质的检测方法

2.1 微透析法

微透析法 (Microdialysis) 是一种对待测组织损伤相对较小、灵敏度较高的方法,被广泛用于检测大脑中的各种生物分子,包括神经递质、激素以及其它化学小分子的分布和动态变化过程。微透析系统含有一个微透析探头,探头前端被半透的中空纤维膜覆盖,两端与人工脑脊液 (Artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 的入口管和出口管相连。使用该系统检测大脑中神经递质的动态变化,首先要将微透析探头插入待研究的脑区,并对该系统灌流 ACSF,使其以 $0.5 \sim 2.0 \mu\text{L}/\text{min}$ 的速度持续不断地通过微透析探头前端的半透膜,与大脑中的脑脊液进行物质交换,在此过程中,细胞外液中的神经递质通过被动扩散作用穿过半透膜进入 ACSF,之后回收透析液,利用高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 或气相色谱 (Gas chromatography, GC) 将不同的神经递质分离出来,通过质谱 (Mass spectroscopy, MS) 分析脑脊液中每种神经递质的含量,最终实现对神经递质的检测^[12,13] (图 1A)。由于此系统持续地对微透析探头灌流 ACSF,因此在样品采集位置很难建立神经递质的化学梯度平衡,导致透析液中的神经递质浓度低于采样位置的实际浓度。为了提高对采样位置神经递质浓度测量的准确度,可通过降低 ACSF 的灌流速度使其尽量建立平衡;同时,为保证样品中神经递质的含量足够在后续系统中被检测出来,只能在一定程度上降低该系统的采样频率,导致该系统的时间分辨率较低。尽管微透析法可在复杂的神经系统中实现对各种神经递质相对精确、灵敏、长时程的检测,但由于其时间分辨率比较低,单次采样时间通常约 10 min,因此很难实时地检测大脑中快速变化的神经递质^[14]。

2.2 电化学法

除了利用微透析的方法检测神经递质浓度的变化,基于氧化还原反应原理的电化学检测方法近年也逐步发展起来。安培法 (Amperometry) 被用于检测可被氧化还原的神经递质的动态变化^[15]。利用此方法检测神经递质释放时,需要将电极放置在被记录细胞表面附近,给予电极一个固定的电压,并保持该电压高于被检测神经递质的氧化还原电位。当神经递质从细胞释放并扩散至电极表面,会被氧化,进而发生电子的转移,通过电极记录到的电流指示神经递质的释放^[16]。最初,由于电极的直径过大,很难检测单个细胞的分泌反应,通过改进电极的尺寸、材料和记录方法,使得该方法可检测神经递质从单个突触小泡的释放^[17]。由于氧化还原反应非常迅速,该方法能够以毫秒级别的时间分辨率检测神经递质的动态变化。然而,安培法是基于氧化还原的原理开发的,因此只能用于检测易于被氧化还原的物质,而对于乙酰胆碱等难以被氧化还原的神经递质则比较困难。此外,这种检测方法缺乏特异性,不能区分不同的神经递质,凡是可被特定电位氧化还原的物质均能产生电子,并被电极记录,因此,这种方法通常与 HPLC 联用,实现神经递质的特异性检测^[18]。目前,此方法已被应用于检测肾上腺嗜铬细胞去甲肾上腺素的释放、肥大细胞五羟色胺的释放、活体大鼠伏隔核 (Nucleus accumbens, NAc) 内源多巴胺的释放^[19,20] 等。

快速扫描循环伏安法 (Fast scan cyclic voltammetry, FSCV) 是基于氧化还原反应原理的方法,被广泛用于检测可被氧化还原的神经递质的释放^[21]。FSCV 与 Amperometry 的区别在于 FSCV 给予电极的是呈特定波形并不断变化的电压,而不是恒定的电压,不同的神经递质在不同的电压下发生氧化还原反应,并产生相对应的电流,因此,该方法相比于安培法的优势是可在一定程度上区分不同的神经递质,已被广泛用于小鼠脑片以及活体小鼠研究单胺类神经递质的释放。如 Marcinkiewicz 等^[22] 使用该方法在小鼠脑片上记录到大脑中缝背核 (Dorsal raphe nucleus, DRN) 五羟色胺能神经元释放的五羟色胺 (图 1B); Saylor 等^[23] 也成功地在活动小鼠的海马 (Hippocampus) 中记录到不同发情周期内五羟色胺的释放。虽然 FSCV 具有较高的时间分辨率和一定的神经递质分子的特异性,但难以实现对多个区域的同时检测。此外,虽然碳纤电极的直径可达到微米级别,但是依然难以精确定位到特定突触,很难实现亚细胞特异性检测。

2.3 荧光成像法

2.3.1 检测下游报告基因的 Tango-assay 随着荧光共聚焦显微镜 (Confocal microscopy)、双光子显微

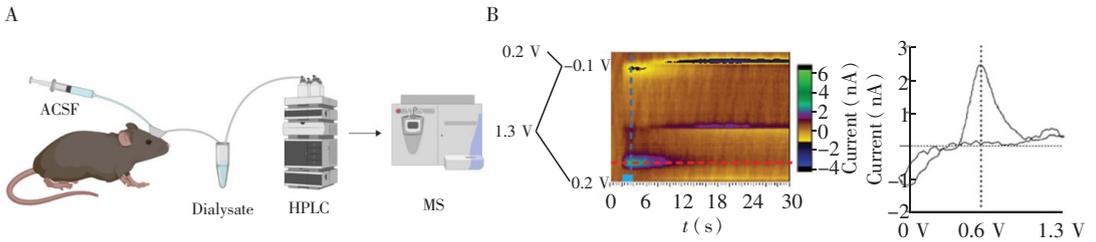


图1 (A)利用微透析方法检测小鼠大脑中神经递质释放的原理示意图;(B)利用FSCV在小鼠脑片上检测五羟色胺的释放,左图是不同电压下对应的五羟色胺氧化电流的伪彩图,右图是对应电流-电压曲线图^[22]

Fig. 1 (A) Schematic diagram of detection of neurotransmitter release in mouse brain *in vivo* by microdialysis system; (B) Fast scan cyclic voltammetry detection of serotonin release in mouse brain slices with color plot (left) and cyclic voltammograms trace (right)^[22]

镜(Two-photon excitation microscopy)、受激发射损耗显微镜(Stimulated emission depletion microscopy)等新型显微镜技术的发展,光学成像方法在各个领域得到广泛应用。应用光学成像的方法解决生物学问题具有很多优势,如将其与荧光蛋白联合使用可观察特定生物分子在细胞内的定位、基因的表达、蛋白和蛋白之间的相互作用等过程。在神经递质的检测方面,光学成像方法因其灵敏性高、对样品损伤小、可实时观测等特点而得到了极快的发展。

2008年,Barnea等^[24]开发了一种通过两种融合蛋白之间的相互作用启动下游报告基因表达检测神经递质释放的方法,并命名为Tango assay。这种检测方法的原理是将一种细胞膜定位的受体(如GPCR)与一种转录因子(如tTA)融合在一起,并在这两种蛋白之间插入一段可被特异性蛋白酶识别的酶切位点(如烟草花叶病毒TEV蛋白酶识别的酶切位点),同时,将一种在膜受体激活后可与之发生相互作用的蛋白(如 β -arrestin2)与相对应的蛋白酶相融合。当神经递质激活GPCR后, β -arrestin2会被招募到GPCR附近,并与之发生相互作用,此时TEV蛋白酶会对GPCR与tTA之间的酶切位点进行识别与切割,继而tTA被释放,并进入细胞核,启动下游报告基因荧光素酶的表达,最终通过荧光素酶催化的荧光反应实现对神经递质的检测(图2A)。基于此方法开发的Tango-mapping系统已被成功地用于检测活体果蝇内源多巴胺的释放及其参与的神经环路^[25]。Tango assay具有两方面的优势:一方面,基于神经递质的内源受体开发,具有较高的分子特异性;另一方面,通过转录因子启动报告基因的表达对信号产生放大作用,使得该系统具有较高的灵敏性。由于技术层面的限制,该检测系统背景信号较高,信噪比较低,且配体结合引起下游报告基因的表达是不可逆的,不能被特异的受体拮抗剂阻断,这些因素都限制了该系统在活体动物中的应用。

2017年, Lee等^[26]对Tango assay进行改造,并将新的系统命名为iTango(图2B)。iTango是一个包含3组件开关的控制系统,该系统由两种融合的蛋白质组件以及一个带有四环素反应元件(Tetracycline response element, TRE)的单个报告基因载体组成。第一个组件是由一个膜神经递质受体融合表达一系列其它的蛋白元件构成,包括一个截短的与隐花色素相互作用的元件(Cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix, CIBN)、一个截短的对蓝光敏感的元件(Light-sensitive LOV2 domain of Avena Sativa phototropin 1, AsLOV2)和一个受四环素调控的转录因子tTA相融合,AsLOV2和tTA之间有一个TEV蛋白酶识别位点^[27,28]。第二个组件是将 β -arrestin2和TEV蛋白酶的N端部分融合;最后一个组件是将介导光反应的植物隐花色素光裂合酶的同源区域(Photolyase homology region of the CRY2 protein from Arabidopsis thaliana, CRY2PHR)与TEV蛋白酶的C端部分融合。为了降低TEV蛋白酶自发的酶切活性,该系统用TEV识别位点代替与PAS序列紧密结合的蓝光敏感元件的J α 螺旋的C端。在膜受体被相应配体激活的情况下, β -arrestin2被招募与膜受体结合发生相互作用,使得TEV蛋白酶的N端靠近受体;同时给予蓝光照射,CRY2PHR与CIBN也发生相互作用,使得TEV蛋白酶的C端部分也靠近受体,

和 N 端部分相互靠近, 形成有功能的 TEV 蛋白酶并切割其识别位点, 释放 iTA 进入细胞核, 与 TRE 结合, 启动下游报告基因的表达。随后, 该研究组对该系统进一步优化, 将 CRY2PHR-CIBN 这对光开关去除, 并将新系统命名为 iTango2 (图 2C), 该系统已被成功用来标记以及操纵小鼠大脑中接收多巴胺的神经元。相比于最初的 Tango assay, iTango2 具有背景信号低、信噪比高的优点, 但由于转录因子启动下游报告基因的表达需要数分钟至数小时, 时间分辨率相对较低, 在瞬息万变的神经网络里, 依然很难检测到神经递质的动态变化。

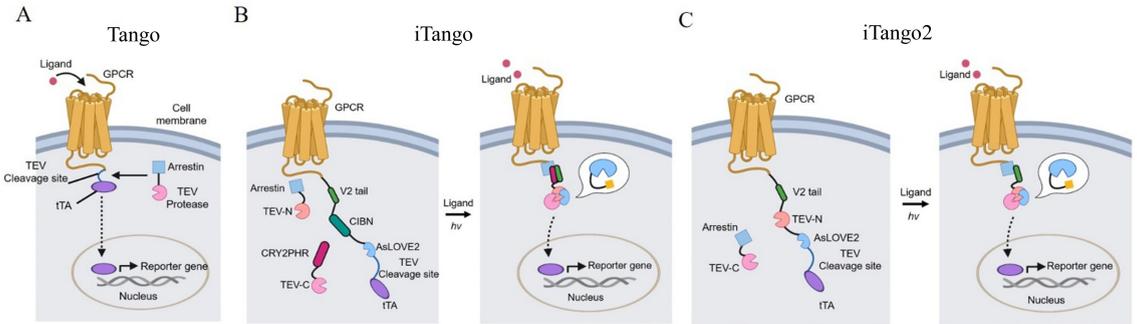


图 2 (A) Tango assay 通过下游报告基因检测配体与受体结合原理示意图; 基于 iTango assay (B) 与 iTango2 assay (C) 原理构建的检测多巴胺释放的试验体系示意图

Fig. 2 (A) Schematic diagram of detecting binding between ligand and corresponding G protein coupled receptor by Tango assay through downstream reporter gene; Schematic diagram of detecting dopamine release by iTango assay (B) and iTango2 assays (C)

2.3.2 基于细胞系构建的神经递质探针 基于细胞系构建的神经递质探针 M1-CNIFERs (Cell-based neurotransmitter fluorescent engineered reporters) 是 Nguyen 等^[29] 于 2010 年为检测内源乙酰胆碱的释放而开发的。他们将一个代谢型的乙酰胆碱受体 (M1) 与基于荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 原理构建的钙离子探针 TN-XXL 表达在人胚胎肾细胞系 HEK293T 中, M1 与乙酰胆碱结合会招募下游 G_q 蛋白, 通过三磷酸肌醇 (IP₃) 信号通路引起细胞中钙离子浓度的升高, 钙离子探针检测到钙离子浓度的变化, 并通过改变荧光信号的强度最终反应乙酰胆碱浓度的变化 (图 3A)。由于此探针是基于内源乙酰胆碱受体与乙酰胆碱的结合引发下游信号通路的原理构建的, 因此保留了受体与配体结合的特异性与亲和力, 而且通过下游信号通路的放大作用增强了探针的灵敏度。通过将表达 M1-CNIFERs 的细胞系种植在小鼠的大脑皮层, 可检测到电刺激基底核 (Nucleus basalis of meynert, NBM) 乙酰胆碱能神经元远程投射到皮层释放的乙酰胆碱。此外, 他们还构建了多巴胺探针 (D2-CNIFERs) 和去甲肾上腺素探针 (α_1A -CNIFERs) 的细胞系, 并成功用于检测活体小鼠内源神经递质的释

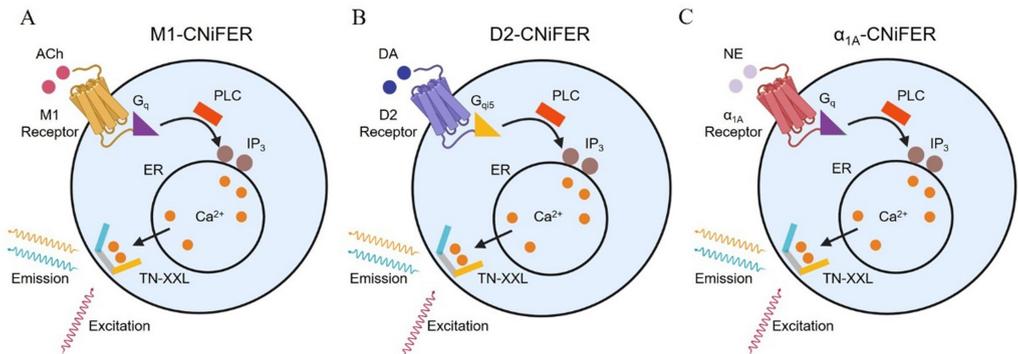


图 3 基于 CNIFER 原理构建的分别可以检测 (A) 乙酰胆碱、(B) 多巴胺以及 (C) 去甲肾上腺素的探针原理示意图

Fig. 3 Schematic diagram of cell-based neurotransmitter fluorescent engineered reporters strategy for detection of (A) acetylcholine, (B) dopamine and (C) norepinephrine

放^[30,31](图 3B 和 3C)。此方法具有一定的时间和空间分辨率、对神经递质具有高度的特异性、灵敏度和亲和力,但将外源细胞系植入动物大脑中存在一定的困难,包括细胞移植的操作要求较高、受体动物的免疫排斥反应等。

2.3.3 化学遗传探针 Snifits Snifits 探针通过一个荧光蛋白与一个发色基团或者两个发色基团之间的能量共振转移检测神经递质浓度的变化^[32]。Snifits 是基于 SNAP-tag 以及 CLIP-tag 标记的探针,其中 SNAP-tag 可特异地与活细胞中的苄基鸟嘌呤(Benzyl guanine, BG)衍生物形成共价键。这类探针通常包含一个 SNAP-tag、一个荧光蛋白或者 CLIP-tag、一个可与神经递质结合的蛋白(Binding protein, BP)、一个合成的可与 BP 结合的带发色团的配体分子(图 4A 和 4B)。合成的配体通过相应的 BG 衍生物偶联到 SNAP-tag 上,在分子内与 BP 结合。神经递质不存在时,探针处于关闭的状态;神经递质出现时,与合成的配体分子竞争,后者从 BP 上解离下来,探针切换到开放的状态,两个发色团之间的位置发生改变,影响二者之间 FRET 的效率。此方法已被用于开发 γ -氨基丁酸的探针,此探针以一个代谢型的 GABA_B受体作为 BP,与 SNAP-tag、CLIP-tag 蛋白融合表达,同时,SNAP-tag 和 CLIP-tag 分别连接一个发色团,作为 FRET 的供体和配体^[33]。除此之外,此方法还被用于开发谷氨酸和乙酰胆碱的探针,但此类探针尚未用于活体动物中检测内源神经递质的释放^[34,35]。此类探针具有较高的灵敏度和特异性,但需要将外源合成的发色团偶联到 SNAP-tag,导致较高的背景,限制了其在活体动物体内的应用。

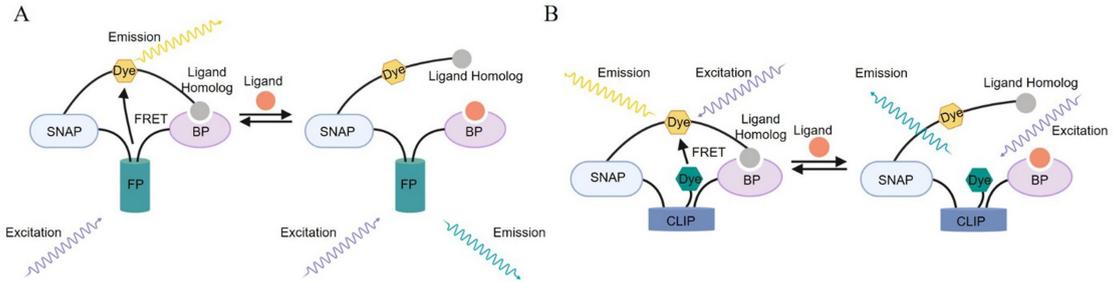


图 4 (A) 带有荧光蛋白的 Snifits 类探针和(B)带有 CLIP-tag 的 Snifits 类探针构建的原理示意图

Fig. 4 Schematic diagram of Snifits sensors with a fluorescent protein (A) and with a CLIP-tag (B)

2.3.4 可遗传编码的荧光探针 (1) 基于细菌周质结合蛋白(Periplasmic binding protein, PBP)构建的可遗传编码的神经递质荧光探针。目前,已开发的可遗传编码、具有较高时空分辨率、高分子特异性以及高灵敏度检测神经递质释放的荧光探针主要分为两类,一类以细菌 PBP 为骨架,另一类以 GPCR 为骨架。细菌 PBP 种类繁多,为构建神经递质探针提供了良好的蛋白骨架。以检测谷氨酸释放的荧光探针为例,早期的谷氨酸探针 FLIP-E 以及改良版的 SuperGluSnFR 均是基于 FRET 原理构建的,融合了来自细菌中可与谷氨酸结合的蛋白 ybeJ 以及两个可发生 FRET 的荧光蛋白,但此类探针在体使用的信噪比不高^[36-38]。后期的谷氨酸探针 iGluSnFR 依然使用了 ybeJ 蛋白,但是没有 FRET 原理,而是改用经过循环重排并对构象变化敏感的绿色荧光蛋白(Circularly permuted enhanced green fluorescent protein, cpEGFP)^[39](图 5A)。iGluSnFR 相较于原来的 SuperGluSnFR 在信噪比方面有了较大的提升,更适合在体检测内源谷氨酸的释放,此外,单个荧光蛋白占用的光谱相较于原来两个荧光蛋白占用的光谱更窄,因此可与其它颜色的探针联合使用,更适用于多色成像系统^[31,40]。此后,基于单个荧光蛋白以及细菌 PBP 骨架构建的可遗传编码的神经递质探针被相继开发出来,包括可检测 γ -氨基丁酸的 iGABASnFR 及可检测 ATP 的 iATPSnFR^[41,42]。来自细菌的 PBP 虽可与神经递质结合,作为探针的骨架蛋白,但并不适用于大规模神经递质探针的开发。一方面,并非所有的神经递质都能找到可与之结合的 PBP,尤其是神经肽类;另一方面,PBP 蛋白来自于细菌,将其表达在真核细胞中,容易出现膜定位差、表达量低等问题。

(2) 基于 G 蛋白偶联受体(GPCR)构建的可遗传编码的神经递质荧光探针。GPCR 是一大类膜蛋白受体的统称,这类受体具有相对保守的七次跨膜结构,其配体包括气味分子、神经递质、激素、趋化因子等,在真核细胞中发挥重要的信号转导作用^[43]。已知的大部分神经递质都有相应的 GPCR 作为受体,因此,GPCR 作为一类可与神经递质结合的天然内源性受体是构建可遗传编码神经递质探针的首选骨架。

其优势主要有两方面:一方面, GPCR 来自于真核细胞,不存在由原核转移到真核细胞引起的蛋白表达及包装运输方面的问题;另一方面, GPCR 作为神经递质本身的内源受体,保留了二者之间的高选择性和亲和力。基于已解析的 GPCR 晶体结构,结构生物学家发现配体与 GPCR 结合后,主要引起后者的第五和第六个跨膜区构象的改变,并且此变化在不同的 GPCR 中较为保守^[44-47]。因此,通过将 cpEGFP 插入到连接第五和第六个跨膜区的第三个胞内环 (Intracellular Loop 3, ICL3) 的位置,配体与 GPCR 的结合会引起后者构象的改变,而这种变化又引起 cpEGFP 发生构象的变化,进一步影响其发色团周围的微环境,最终导致其荧光强度的改变。基于 GPCR 激活原理构建的神经递质探针被命名为 GRAB (GPCR Activation Based Sensor) 探针 (图 5B), 如 GRAB_{ACh}、GRAB_{DA}、GRAB_{NE}^[48-50]。

以 GRAB_{DA} 为例,该探针将 cpEGFP 插入到人源多巴胺受体 D2,通过对插入位点、连接肽段等一系列条件的优化,该探针在培养的 HEK293T 以及原代培养的大鼠皮层神经元中对饱和浓度多巴胺的荧光信号响应可达到 90%。通过对 D2 受体上多巴胺结合位点的突变,得到了具有不同亲和力的多巴胺探针 DA1m (EC₅₀ ~ 130 nmol/L) 和 DA1h (EC₅₀ ~ 10 nmol/L),用于检测不同浓度范围的多巴胺。GRAB_{DA} 信号的上升动力学是亚秒级别的,与内源 GPCR 配体结合的动力学速度类似,因此,该探针具有相对较好的时间分辨率,适用于检测内源多巴胺的动态变化。GRAB_{DA} 还具有较好的分子特异性,对五羟色胺、组胺、乙酰胆碱等神经递质没有响应。但是,目前 GRAB_{DA} 对一定浓度的去甲肾上腺素仍有一定的响应,这源于去甲肾上腺素和多巴胺的化学结构非常类似,二者之间区别仅为一个羟基。此外, GPCR 作为一个重要的内源信号转导分子,在使用基于 GPCR 构建的探针检测神经递质释放时,是否会影响细胞本身的信号通路是一个需要考虑的因素。通过对 GPCR 两条主要的下游信号通路的检测,即 G 蛋白和 β -arrestin 介导的信号通路,发现多巴胺探针的表达基本不与这两条信号通路偶联,其过量表达对细胞正常的生理功能没有明显影响^[50]。这可能是因为在探针构建的过程中,一方面将 D2 受体的 ICL3 截短,另一方面将空间占位的 cpEGFP 插入到 ICL3,影响了下游 G 蛋白和 β -arrestin 与胞内环的相互作用,最终导致探针与下游信号通路的去偶联。综上,此探针可在不影响细胞正常生理功能的情况下检测内源多巴胺的释放。GRAB_{DA} 不仅可在急性小鼠脑片检测由电刺激引起的伏隔核内源多巴胺的释放,而且还通过构建转基因果蝇将 GRAB_{DA} 特异地表达在果蝇蘑菇体 (Mushroom body, MB) 的单颗多巴胺神经元检测电刺激引发内源多巴胺的释放。除此之外,GRAB_{DA} 成功地在活体小鼠中检测到不同情况下内源多巴胺的释放,包括光遗传刺激、联合型学习、性行为等。基于类似的原理,来自 UC Davis 的 Tian 课题组基于多巴胺 GPCR 受体 D1 开发了可检测多巴胺的一系列探针 dLight,与 D2 受体相比, D1 受体对多巴胺的亲和力较低,但对于多巴胺和去甲肾上腺素的区分度稍高,因此 dLight 探针也保留了这些特性^[51]。GRAB 以及 dLight 系列的探针都是可遗传编码的,为活体应用提供了便利,可通过病毒注射或者构建转基因动物的方法将探针表达在目的区域,也可通过一系列遗传学手段和工具将该探针表达在特定类型的细胞中。除此之外,此系列的探针都具有较高的分子特异性、高灵敏度、高信噪比以及时空分辨率,为研究内源神经递质的释放提供了强有力的工具。

3 总结与展望

神经递质作为大脑中一类重要的信息传递分子,参与了多种生理过程,神经递质的释放与调节出现异常时,可引发多种疾病。因此,精确地检测生理与病理过程中神经递质的释放与调控,可更好地理解某些疾病的发病机理,并为临床治疗奠定基础。然而,神经递质释放模式、时间空间及化学性质的复杂性,给神经递质的研究带来了重重阻力。首先,神经递质的释放模式可分为紧张型释放 (Tonic release)

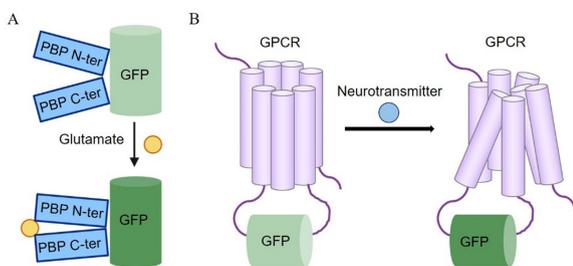


图 5 (A) 基于 PBP 蛋白构建的可以检测谷氨酸释放的荧光探针原理示意图; (B) 基于 GPCR 激活原理构建的 GRAB 系列探针的原理示意图

Fig. 5 (A) Schematic diagram of glutamate sensor based on PBP; (B) Schematic diagram of GPCR Activation Based Sensor, GRAB

和相位型释放(Phasic release),通常,紧张型释放是由神经元的自发性活动引起的,而相位型释放则与神经元动作电位的成簇发放有关^[11]。其次,某些神经递质的结构和化学性质比较类似,如单胺类的神经递质多巴胺和去甲肾上腺素,不论是电化学方法,还是可遗传编码的探针,对其区分度都有限。此外,还存在不同神经递质在同一脑区同时释放的情况。这些都增加了检测神经递质的难度^[52]。

传统的检测神经递质释放的方法包括基于生化的微透析法、基于电化学原理的安培法和快速扫描循环伏安法存在时空分辨率不够高、分子特异性比较低等问题;检测下游报告基因的Tango assay存在时间分辨率较低、背景信号较高等问题;基于细胞系的CNiFER存在免疫排斥、操作复杂等问题;化学遗传探针Snifts需要外源加入带荧光的发色基团,不适合动物的活体研究。基于PBP构建的可遗传编码的神经递质荧光探针既保证了探针与神经递质之间的分子特异性,又保证了探针与配体之间的亲和力,但此方法目前可否广泛用于神经递质探针的构建还有待研究,因为部分神经递质很难在细菌中找到可与之结合的蛋白,而原核生物的蛋白在真核生物中的表达及运输也需要大量的优化工作。目前,基于GPCR激活原理已成功构建了可检测乙酰胆碱、多巴胺和去甲肾上腺素的荧光探针,此系列探针表现出了较高的灵敏度、分子特异性和时空分辨率,可在果蝇、斑马鱼和小鼠等多种模式生物的不同行为范式中特异性地检测相应神经递质的释放。同时,基于GPCR构建的神经递质探针相较于基于PBP构建的探针存在以下优势:大多数的神经递质都有相应的GPCR受体,较容易找到探针的骨架蛋白;根据解析出来的GPCR晶体结构,其构象变化相对保守,因此该原理普适于开发神经递质的探针。此外,通过改变荧光蛋白的颜色,可进一步拓宽神经递质探针的光谱,开发红色、蓝色等不同颜色的探针,用于多色成像研究不同神经递质之间的相互调节。随着各种新型遗传工具的发展(如AAV(Adeno-associated virus)病毒和CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)技术),以及显微成像技术的发展(如大视场显微镜和三光子显微镜),可在哺乳动物(包括非人灵长类)中运用神经递质探针,实现同时多色大范围对内源神经递质释放的检测,为研究生理和病理情况下各种神经递质的释放与调控奠定基础,使得最终解释人类大脑的工作机制成为可能。

References

- 1 Zoli M, Torri C, Ferrari R, Jansson A, Zini I, Fuxe K, Agnati L F. *Brain Res. Rev.*, **1998**, 26(2-3): 136-147
- 2 Pereda A E. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2014**, 15(4): 250-263
- 3 Whitehouse P J, Martino A M, Antuono P G, Lowenstein P R, Coyle J T, Price D L, Kellar K J. *Brain Res.*, **1986**, 371(1): 146-151
- 4 Owens M J, Nemeroff C B. *Clin. Chem.*, **1994**, 40(2): 288-295
- 5 Berke J D, Hyman S E. *Neuron*, **2000**, 25(3): 515-532
- 6 Lotharius J, Brundin P. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2002**, 3(12): 932-942
- 7 Traynelis S F, Wollmuth L P, McBain C J, Menniti F S, Vance K M, Ogden K K, Hansen K B, Yuan H J, Myers S J, Dingledine R. *Pharmacol. Rev.*, **2010**, 62(3): 405-496
- 8 Beaulieu J M, Gainetdinov R R. *Pharmacol. Rev.*, **2011**, 63(1): 182-217
- 9 Li Y, Zhong W X, Wang D Q, Feng Q R, Liu Z X, Zhou J F, Jia C Y, Hu F, Zeng J W, Guo Q C, Fu L, Luo M M. *Nat. Commun.*, **2016**, 7: 10503
- 10 Raymond J R, Mukhin Y V, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys T W, Grewal J S, Garnovskaya M N. *Pharmacol. Ther.*, **2001**, 92(2-3): 179-212
- 11 Floresco S B, West A R, Ash B, Moore H, Grace A A. *Nat. Neurosci.*, **2003**, 6(9): 968-973
- 12 Wang Q Q, Zhang J, Pi Z F, Zheng Z, Xing J P, Song F R, Liu S, Liu Z Q. *Anal. Methods*, **2015**, 7(1): 45-52
- 13 Zestos A G, Kennedy R T. *AAPS J.*, **2017**, 19(5): 1284-1293
- 14 Nandi P, Lunte S M. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 651(1): 1-14
- 15 Bucher E S, Wightman R M. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2015**, 8: 239-261
- 16 Mosharov E V, Sulzer D. *Nat. Methods*, **2005**, 2(9): 651-658
- 17 Dernick G, Gong L W, Tabares L, Alvarezde Toledo G, Lindau M. *Nat. Methods*, **2005**, 2(9): 699-708
- 18 Michael D J, Wightman R M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 19(1-2): 33-46

- 19 Wightman R M, Jankowski J A, Kennedy R T, Kawagoe K T, Schroeder T J, Leszczyszyn D J, Near J A, Diliberto E J, Viveros O H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, 88(23): 10754–10758
- 20 Dugast C, Suaud-Chagny M F, Gonon F. *Neuroscience*, **1994**, 62(3): 647–654
- 21 Wightman R M. *Science*, **2006**, 311(5767): 1570–1574
- 22 Marcinkiewicz C A, Mazzone C M, D'agostino G, Halladay L R, Hardaway J A, Diberto J F, Navarro M, Burnham N, Cristiano C, Dorrier C E, Tipton G J, Ramakrishnan C, Kozicz T, Deisseroth K, Thiele T E, Mcelligott Z A, Holmes A, Heisler L K, Kash T L. *Nature*, **2016**, 537(7618): 97–101
- 23 Saylor R A, Hersey M, West A, Buchanan A M, Berger S N, Nijhout H F, Reed M C, Best J, Hashemi P. *Front. Neurosci.*, **2019**, 13: 362
- 24 Barnea G, Strapps W, Herrada G, Berman Y, Ong J, Kloss B, Axel R, Lee K J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105(1): 64–69
- 25 Inagaki H K, De-Leon S B, Wong A M, Jagadish S, Ishimoto H, Barnea G, Kitamoto T, Axel R, Anderson D J. *Cell*, **2012**, 148(3): 583–595
- 26 Lee D, Creed M, Jung K, Stefanelli T, Wendler D J, Oh W C, Mignocchi N L, Luscher C, Kwon H B. *Nat. Methods*, **2017**, 14(5): 495–503
- 27 Kennedy M J, Hughes R M, Peteya L A, Schwartz J W, Ehlers M D, Tucker C L. *Nat. Methods*, **2010**, 7(12): 973–975
- 28 Guntas G, Hallett R A, Zimmerman S P, Williams T, Yumerefendi H, Bear J E, Kuhlman B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, 112(1): 112–117
- 29 Nguyen Q T, Schroeder L F, Mank M, Muller A, Taylor P, Griesbeck O, Kleinfeld D. *Nat. Neurosci.*, **2010**, 13(1): 127–132
- 30 Muller A, Joseph V, Slesinger P A, Kleinfeld D. *Nat. Methods*, **2014**, 11(12): 1245–1252
- 31 Reimer J, Mcginley M J, Liu Y, Rodenkirch C, Wang Q, McCormick D A, Tolias A S. *Nat. Commun.*, **2016**, 7: 13289
- 32 Brun M A, Tan K T, Nakata E, Hinner M J, Johnsson K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131(16): 5873–5884
- 33 Masharina A, Reymond L, Maurel D, Umezawa K, Johnsson K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(46): 19026–19034
- 34 Brun M A, Tan K T, Griss R, Kielkowska A, Reymond L, Johnsson K. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, 134(18): 7676–7678
- 35 Schena A, Johnsson K. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **2014**, 53(5): 1302–1305
- 36 Duerst C D, Wiegert J S, Helassa N, Kerruth S, Coates C, Schulze C, Geeves M A, Torok K, Oertner T G. *Nat. Protoc.*, **2019**, 14(5): 1401–1424
- 37 Okumoto S, Looger L L, Micheva K D, Reimer R J, Smith S J, Frommer W B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, 102(24): 8740–8745
- 38 Hires S A, Zhu Y, Tsien R Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105(11): 4411–4416
- 39 Marvin J S, Borghuis B G, Tian L, Cichon J, Harnett M T, Akerboom J, Gordus A, Renninger S L, Chen T W, Bargmann C I, Orger M B, Schreiter E R, Demb J B, Gan W B, Hires S A, Looger L L. *Nat. Methods*, **2013**, 10(2): 162–170
- 40 Marvin J S, Scholl B, Wilson D E, Podgorski K, Kazemipour A, Muller J A, Schoch S, Quiroz F J U, Rebola N, Bao H, Little J P, Tkachuk A N, Cai E, Hantman A W, Wang S S, Depiero V J, Borghuis B G, Chapman E R, Dietrich D, Digregorio D A, Fitzpatrick D, Looger L L. *Nat. Methods*, **2018**, 15(11): 939
- 41 Marvin J S, Shimoda Y, Magloire V, Leite M, Kawashima T, Jensen T P, Kolb I, Knott E L, Novak O, Podgorski K, Leidenheimer N J, Rusakov D A, Ahrens M B, Kullmann D M, Looger L L. *Nat. Methods*, **2019**, 16(8): 763–770
- 42 Lobas M A, Tao R, Nagai J, Kronschlager M T, Borden P M, Marvin J S, Looger L L, Khakh B S. *Nat. Commun.*, **2019**, 10(1): 711
- 43 Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, Ghoshdastider U, Debinski A, Filipek S. *Curr. Med. Chem.*, **2012**, 19(8): 1090–1109
- 44 Cherezov V, Rosenbaum D M, Hanson M A, Rasmussen S G, Thian F S, Kobilka T S, Choi H J, Kuhn P, Weis W I, Kobilka B K, Stevens R C. *Science*, **2007**, 318(5854): 1258–1265
- 45 Wang S, Che T, Levit A, Shoichet B K, Wacker D, Roth B L. *Nature*, **2018**, 555(7695): 269–273
- 46 Yin W, Zhou X E, Yang D, De Waal P W, Wang M, Dai A, Cai X, Huang C Y, Liu P, Wang X, Yin Y, Liu B, Zhou Y, Wang J, Liu H, Caffrey M, Melcher K, Xu Y, Wang M W, Xu H E, Jiang Y. *Cell Discov.*, **2018**, 4(1): 12

- 47 Hua T, Vemuri K, Pu M, Qu L, Han G W, Wu Y, Zhao S, Shui W, Li S, Korde A, Laprairie R B, Stahl E L, Ho J H, Zvonok N, Zhou H, Kufareva I, Wu B, Zhao Q, Hanson M A, Bohn L M, Makriyannis A, Stevens R C, Liu Z J. *Cell*, **2016**, 167(3): 750–762
- 48 Jing M, Zhang P, Wang G F, Feng J S, Mesik L, Zeng J Z, Jiang H Q, Wang S H, Looby J C, Guagliardo N A, Langma L W, Lu J, Zuo Y, Talmage D A, Role L W, Barrett P Q, Zhang L I, Luo M M, Song Y, Zhu J J, Li Y L. *Nat. Biotechnol.*, **2018**, 36(8): 726–737
- 49 Sun F M, Zeng J Z, Jing M, Zhou J H, Feng J S, Owen S F, Luo Y C, Li F N, Wang H, Yamaguchi T, Yong Z H, Gao Y J, Peng W L, Wang L Z, Zhang S Y, Du J L, Lin D Y, Xu M, Kreitzer A C, Cui G H, Li Y L. *Cell*, **2018**, 174(2): 481–496
- 50 Feng J, Zhang C M, Lischinsky J E, Jing M, Zhou J H, Wang H, Zhang Y J, Dong A, Wu Z F, Wu H, Chen W Y, Zhang P, Zou J, Hires S A, Zhu J J, Cui G H, Lin D Y, Du J L, Li Y L. *Neuron*, **2019**, 102(4): 745–761
- 51 Patriarchi T, Cho J R, Merten K, Howe M W, Marley A, Xiong W H, Folk R W, Broussard G J, Liang R Q, Jang M J, Zhong H N, Dombeck D, Von Zastrow M, Nimmerjahn A, Gradinaru V, Williams J T, Tian L. *Science*, **2018**, 360(6396): eaat4422
- 52 Zhou F M, Liang Y, Salas R, Zhang L, De Biasi M, Dani J A. *Neuron*, **2005**, 46(1): 65–74

Recent Advances in Detection Methods for Neurotransmitters

WAN Jin-Xia^{1,2}, LI Yu-Long^{*1,2,3,4}

¹(State Key Laboratory of Membrane Biology, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

²(PKU-IDG/McGovern Institute for Brain Research, Peking University, Beijing 100871, China)

³(Peking-Tsinghua Center for Life Sciences, Beijing 100871, China)

⁴(Chinese Institute for Brain Research, Beijing 100871, China)

Abstract The human brain consists of billions of neurons, and the communication between neurons mainly relies on various neurotransmitters which are released at chemical synapses. Therefore, it is important to monitor neurotransmitter release with high temporal and spatial resolution to understand the functions of nervous system and in turn provide insights into psychiatric disease mechanisms. In this review, we summarize different categories of methods for monitoring neurotransmitters dynamics developed in recent decades in terms of principles, applications and limitations. We focus on the G protein-coupled receptor (GPCR) activation Based sensors, GRAB, which shows high temporal-spatial resolution, high sensitivity and high molecular specificity. GRAB sensors also perform well in multiple organisms, including zebrafish, *drosophila* and mice. In addition, the principle of GRAB sensors can be applied in general to develop sensors for detecting different neurotransmitters whose receptors share the conserved conformational changes when activated by corresponding ligands. In summary, these tools are useful for deciphering the dynamic regulation of a plethora of neurotransmitters in various neural circuits, and may enhance the understanding of the complex neuromodulation in both physiological and pathological processes.

Keywords Neurotransmitters; Fluorescence imaging; G protein-coupled receptor; Review

(Received 11 September 2019; accepted 10 December 2019)

This work was supported by the Beijing Municipal Science & Technology Commission (No. Z181100001318002), the National Basic Research Program of China (No. 2015CB856402), and the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31671118, 31371442).