

朱铭钰,崔利利,陈欢,等. 活体脑部神经递质检测技术的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(11): 1485–1497.

Zhu MY, Cui LL, Chen H, et al. Research progress of neurotransmitter detection technology in live brains [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(11): 1485–1497.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.011.013

活体脑部神经递质检测技术的研究进展

朱铭钰^{1,2}, 崔利利¹, 陈欢¹, 侯宏卫^{1*}, 胡清源^{1*}

(1. 国家烟草质量监督检验中心,烟草生物学效应重点实验室,郑州 450000;
2. 青岛大学,山东 青岛 266071)

【摘要】 神经递质作为一种内源性化学物质,在维持人正常生命活动等方面发挥着至关重要的作用。神经递质水平异常会导致人身体、精神不佳以及一些神经退行性疾病的发生。然而,神经递质超低的浓度、复杂的化学性质以及释放模式,使准确检测其体内浓度面临巨大挑战。为了精确监测大脑神经递质,准确了解神经递质释放动力学,对近五年来常用的活体检测神经递质的方法及其研究进展进行综述。详细介绍微透析法、电化学传感器以及荧光传感器的基本原理及其适用性。

【关键词】 神经递质;疾病;检测;活体

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 11-1485-13

Research progress of neurotransmitter detection technology in live brains

ZHU Mingyu^{1,2}, CUI Lili¹, CHEN Huan¹, HOU Hongwei^{1*}, HU Qingyuan^{1*}

(1. China National Tobacco Quality Supervision and Test Center, Key Laboratory of Tobacco Biological Effects, Zhengzhou 450000, China. 2. Qingdao University, Qingdao 266071)

Corresponding author: HOU Hongwei. E-mail: qsfctc@163.com; HU Qingyuan. E-mail: huqy1965@163.com

【Abstract】 As endogenous chemical substances, neurotransmitters play a vital role in maintaining normal life activities. Abnormal levels of neurotransmitters can lead to physical, mental, and some neurodegenerative diseases. However, the ultralow concentration, complex chemical properties, and release modes of neurotransmitters make their accurate detection *in vivo* a great challenge. To accurately monitor neurotransmitters in the brain and accurately understand the release kinetics of neurotransmitters, we reviewed several method commonly used in the past five years to detect neurotransmitters *in vivo* and their research progress. The basic principle and applicability of microdialysis, electrochemical sensors, and fluorescence sensors are introduced in detail.

【Keywords】 neurotransmitter; disease; detection; live body

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

神经递质主要是指实现神经化学传递信号转导,促使机体完成特定生物反应的化学物质^[1]。神经递质的新陈代谢和信号传递与维持大脑的结构和功能有关,例如在大脑神经元之间传递神经信

【基金项目】 中国烟草总公司科技重大专项 (110202101018 (XX-04)), 中国烟草总公司重点研发项目 (110202102014)。
Funded by China National Tobacco Corporation Science and Technology Major Project (110202101018 (XX-04)), China National Tobacco Corporation Key Research and Development Project (110202102014).

【作者简介】 朱铭钰 (1998—), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 神经递质和烟碱代谢物检测。Email: zmy06052021@163.com

【通信作者】 胡清源 (1965—), 博士, 博士生导师, 研究方向: 烟草化学及分析化学的科研与烟草质量监督。
Email: huqy1965@163.com;
侯宏卫 (1975—), 博士, 研究员, 研究方向: 烟草化学、吸烟与健康及生物标志物。Email: qsfctc@163.com。
* 共同通信作者

号,维持神经系统功能以及促进神经细胞的生长和修复等。神经递质的失调会引起人体内一系列疾病的发生,如精神分裂症、帕金森氏症、阿尔茨海默症、癫痫和注意力缺陷多动障碍等^[2]。自 1921 年诺贝尔生理学 and 医学奖获得者奥托·洛伊发现了第一个神经递质——乙酰胆碱后,截至目前,已经确定了 100 多种神经递质^[3-4]。根据其化学性质,可将脑内神经递质分为四大类:第一类为胆碱类,例如乙酰胆碱(ACh)等;第二类为单胺类,例如多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)和 5-羟色胺(5-HT)等;第三类为氨基酸类,例如谷氨酸(Glu)、 γ -氨基丁酸(GABA)等;第四类为神经肽类,例如谷胱甘肽、阿片肽等。其中,多巴胺作为最受关注的神经递质,在人体的生命活动中发挥着重要的作用,与帕金森症和阿尔茨海默症密切相关。乙酰胆碱和 5-羟色胺等神经递质也在学习、记忆和情绪中起到重要

作用。

神经递质之间存在着复杂的相互作用,协同调控人类神经性疾病。然而,由于内源性成分的干扰以及神经递质含量不断更新变化和代谢,导致一些传统的微透析法、电化学和荧光成像等检测方法很难实现神经递质释放的精准检测,神经递质高时空分辨率的可视化检测也成为神经递质检测分析的难点^[5]。近年来,研究者们为了精确检测神经递质的释放,不断地对微透析、电化学和荧光成像等方法进行改进,开发出了一系列快速、灵敏、高效、同时检测多种神经递质的检测方法,以期了解神经递质在上述疾病中的作用机理,为新药物的开发提供技术支撑^[6]。如图 1 所示,本文对微透析法、电化学法以及荧光成像这三类常用的神经递质检测技术进行详细的介绍,方便研究者根据需求选择合适的研究方法。

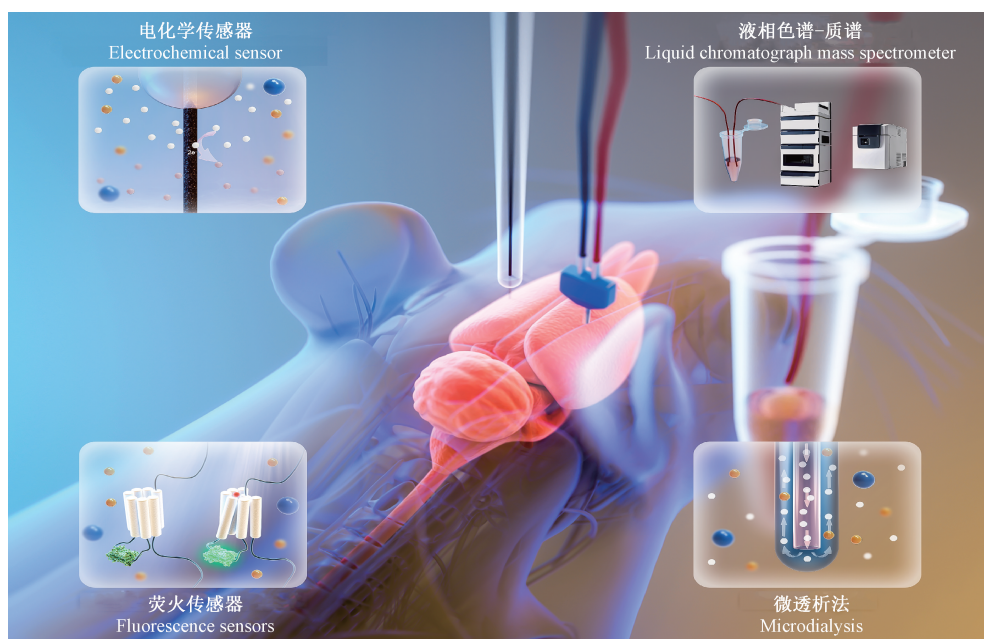


图 1 三种神经递质检测技术的汇总图

Figure 1 Summary diagram of three neurotransmitter detection techniques

1 微透析法

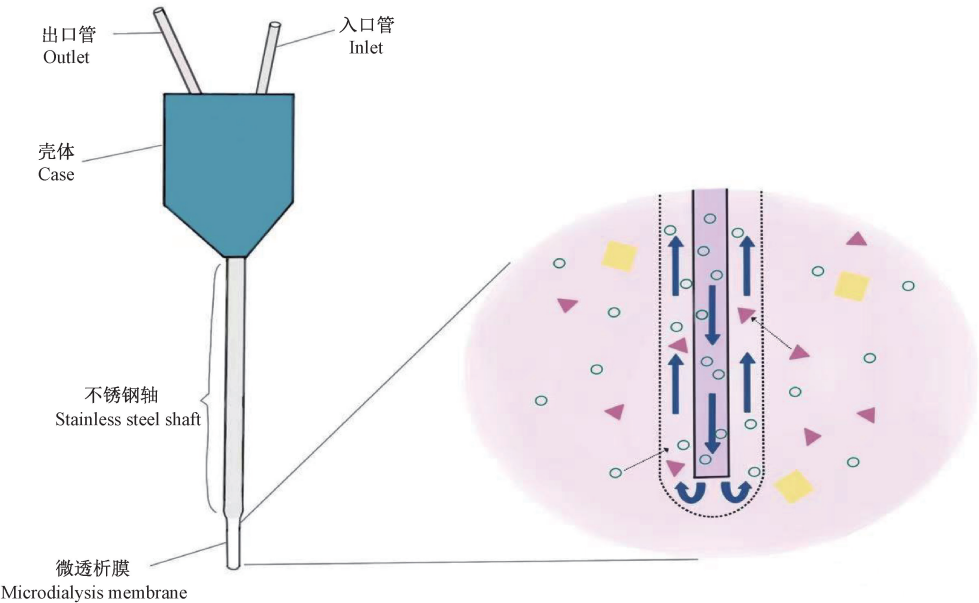
微透析法(Microdialysis)是目前应用最广泛的采集体内神经化学物质的方法之一,常与高效液相色谱-质谱仪等设备联用^[7]。微透析法作为一种侵入性的采样技术,其对测试组织的损伤相对较小,可以在不过度干扰研究环境的情况下对脑脊液样品进行收集。早在 1966 年,Bito 等^[8]就首次提出了通过透析从大脑间质液体中收集分析物的概念。目

前,微透析法已经应用于大脑疾病的研究中,对于诊断脑类疾病的潜在原因以及治疗具有很大的意义。

微透析针被设计为穿过组织的“毛细血管”,由轴、壳体、入口管和出口管四部分组成。入口管与灌注系统相连,通过探头输送灌注液(通常是人工脑脊液或林格氏溶液),以匹配脑间质液的电解质浓度^[9]。微透析过程中一般采用较低的流速收集透析液,以减少溶质的非特异性消耗,并维持较高的相对回收率^[10]。但这也使得微透析时间分辨率

降低,不利于将神经递质浓度的改变与动物特定行为联系起来^[11]。细胞外流体中的溶液和小分子通过半透膜扩散到内部透析液中,然后被收集,如图 2

所示。微透析膜可以将组织结构和灌流相关的流体动力隔离开来,因此微透析探针植入后对组织损伤或流体动力学破坏相对较少^[12]。



注:当微透析针放置到待测组织后,通过注射泵以一定的流速将人工脑脊液通过入口管泵入内部管道,在存在浓度差的条件下,组织中的待测物通过微透析前端的半透膜进入探针内,并被连续流动的人工脑脊液不断带出,实现人工脑脊液与大脑中的脑脊液交换;绿色透明圆形代表 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 以及 Mg^{2+} 等;粉色三角形代表氨基酸、单胺类神经递质等;黄色圆形代表蛋白质、多肽等。

图 2 微透析针结构及微透析膜工作原理

Note. After the microdialysis needle is placed in the tissue to be tested, the artificial cerebrospinal fluid is pumped into the internal pipeline through the inlet tube at a certain flow rate through the syringe pump. The semi-permeable membrane enters the probe and is continuously brought out by the continuous flow of artificial cerebrospinal fluid to realize the exchange of artificial cerebrospinal fluid and cerebrospinal fluid in the brain. Green transparent circles represent Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} , etc.. Pink triangles represent amino acids, monoamine neurotransmitters, etc. Yellow circles represent proteins, polypeptides, etc.

Figure 2 Microdialysis needle structure and microdialysis membrane working principle

透析针的大小、膜的表面积、分析物扩散系数以及透析液收集的速度都会使得微透析技术受到时间和空间分辨低的限制^[13]。为了提高微透析采样技术在时间和空间上的分辨率,Ngernsutivorakul 等^[14]将微制造的推拉式采样针和微流控芯片相结合,通过直接进样到质谱分析所得液滴,同时测定了谷氨酰胺、谷氨酸、 γ -氨基丁酸和乙酰胆碱,在 100 nL/min 灌注速率下产生 6 s 时间分辨率。这种推拉式采样针提供的空间分辨率约是普通微透析探针的 1000 倍。

1.1 微透析法与检测器联用

现如今有多种分析技术可定量微透析样本中的神经递质含量。如前所述,在监测脑介质中神经递质的浓度时,时间分辨率至关重要。微透析收集完样本后可以通过液体旋转器和注射阀与高效液相色谱仪进行在线连接将不同的神经递质分离出

来,然后通过质谱仪、荧光检测器或电化学检测器等对脑脊液中神经递质的含量进行分析。透析样品也可以冷冻存储,然后在不同的时间点通过高效液相色谱仪或气相色谱仪等进行“离线”分析^[15]。在线微透析虽然能最大限度地降低离线微透析过程中发生的样本丢失或降解的可能性,但是在线微透析的时间分辨率不仅受样品采集所需时间的限制,还受化学分析所需时间的限制^[16]。

1.1.1 微透析法与液相色谱-质谱法联用

液相色谱-质谱法是现在应用较为广泛的定量分析方法,液相色谱-质谱联用技术不仅克服了液相色谱本身定性能力差的问题,也克服了质谱法分离效率差的问题,极大地提高了分析的灵敏度。液相色谱-质谱法与其他检测方法相比检测物质种类的范围更广,该技术以其优异的灵敏度、选择性和准确性在神经递质的检测中占据着重要地位。但是

一些神经递质对质谱的响应信号较弱,且生物透析液中基质复杂,这就需要对样品进行复杂的前处理(如衍生化等)。Wong 等^[17]将微透析法与高效液相色谱-串联质谱法相结合,利用苯甲酰氯对包括儿茶酚胺、吲哚胺以及氨基酸等在内的 70 种神经相关化合物进行标记,在 33 min 内完成了对 70 种化合物的分离。大多数分析化合物的检测极限低于 10 nmol/L,检出限在 0.02 ~ 8.00 nmol/L 的范围内,相对标准偏差小于 10%。该方法在分析大鼠脑脊液、人脑脊液和血清等微透析液时能稳定地进行监测,证明了该方法在多种生理环境和模型系统中具有广泛的实用性。Meng 等^[18]将液相色谱-串联质谱法和化学衍生化法相结合,对大鼠血清中包括神经递质、氨基酸以及生物胺等在内的 42 种极性神经化学物质进行了检测,在 15 min 内完成了对 42 种神经化学物质的分离。该方法的检测限在 0.05 ~ 11.63 nmol/L,定量下限为 0.09 ~ 46.50 nmol/L。

随着近几年色谱柱的不断发展,使人们在一定程度上避免了繁琐的样品前处理过程。Fu 等^[19]将体内微透析和液相色谱-串联质谱法相结合,同时测定干细胞因子中木脂素和内源性神经递质等 19 种物质,定量限为 0.5 ~ 20.0 ng/mL。该方法观察和比较木脂素在正常大鼠和阿尔茨海默氏症大鼠体内的药代动力学差异以及对神经递质的影响。Becker 等^[20]通过液相色谱-串联质谱法灵敏地同时定量小鼠微透析液中多巴胺、乙酰胆碱以及 5-羟色胺在内的 16 种神经递质,该方法检出限为 0.005 ~ 17.100 ng/mL,定量限为 0.015 ~ 50.000 ng/mL。潘凌云等^[21]利用超高效液相色谱-串联质谱法同时测定大鼠脑微透析样品中 11 种神经递质(如乙酰胆碱、谷氨酸、甘氨酸和去甲肾上腺素等),该方法在 5 min 内对 11 种神经递质进行测量,检出限为 0.05 ~ 2.50 nmol/L,定量限为 0.125 ~ 12.500 nmol/L。为研究健康和疾病动物模型中神经递质的变化提供了高效的检测方法。Helmschrodt 等^[22]利用液相色谱-串联质谱法对小鼠脑透析液中 5 种神经递质(多巴胺、5-羟色胺、去甲肾上腺素、乙酰胆碱和 γ -氨基丁酸)及其代谢物共 11 种物质进行定量,该方法的检出限在 0.005 ~ 0.750 ng/mL,定量限在 0.025 ~ 2.000 ng/mL,该方法首次能够在一个样品中同时定量胆碱、乙酰胆碱和 γ -氨基丁酸,以及多巴胺和 5-羟色胺代谢的代谢物。

1.1.2 微透析法与液相色谱-荧光检测器联用

液相色谱-荧光检测法在一定程度上解决了液相色谱-电化学检测法的一些缺点,因其具有更高的稳定性、更高的可靠性和易操作性。但对于一些单胺类的神经递质,不具有吸收强荧光的官能团。因此,通常需要在柱前或柱后进行额外的衍生化步骤,来提高检测的灵敏度。Şanlı 等^[23]将微透析和液相色谱-荧光检测法相结合,通过利用 3-(4-羧基苯甲酰基)-2-喹啉甲醛对大小鼠脊髓组织中的 4 种神经递质(谷氨酸、甘氨酸、牛磺酸以及 γ -氨基丁酸)进行衍生化,开发出了一种快速、灵敏的神经递质检测方法。该方法样品制备步骤简单,在最佳条件下,4 种分析物在 0.50 ~ 50.00 μ mol/L 的浓度范围内呈线性,检测限和定量限的范围分别为 0.03 ~ 0.06 μ mol/L 和 0.095 ~ 0.179 μ mol/L。邓祖跃等^[24]开发了一种分离度高且稳定性好的液相色谱-荧光检测法,对大鼠不同的 6 个脑区中的去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺及其代谢物共 7 种物质进行定量。该方法在 0.9 ~ 400.0 μ g/L 的浓度范围内线性范围良好,检测限的范围为 0.3 ~ 8.0 μ g/L,证实了脑内单胺类神经递质在不同脑区分布的差异。咎富文等^[25]通过高效液相色谱-荧光检测法研究小鼠随百草枯中毒时间变化脑组织中 8 种神经递质(多巴胺、左旋多巴、高香草酸、肾上腺素、去甲肾上腺素、二羟基苯乙酸、5-羟色胺和 5-羟吲哚乙酸)的含量变化。该方法的灵敏度高、选择性好、操作简便,检出限的范围为 0.34 ~ 5.26 μ g/L。

1.1.3 微透析法与液相色谱-电化学检测器联用

液相色谱-电化学检测法与液相色谱-质谱法相比,具有较高的灵敏度和选择性,操作相对比较简单。且大多数神经递质是电活性化合物,液相色谱-电化学检测法在检测具有电活性的神经递质时不需要进行衍生化处理,这也避免了液相色谱-质谱法和液相色谱-荧光检测法在样品检测前复杂的前处理过程。液相色谱-电化学检测法虽然具有较高的灵敏度和选择性,但与液相色谱-质谱法和液相色谱-荧光检测法相比神经递质的检测种类相对较少,加上电极变质等局限性,导致液相色谱-电化学检测法在重现性上相对较差。van Schoors 等^[26]开发了一种快速灵敏的微孔超高效液相色谱法,通过与电化学检测相结合同时测定大鼠脑微透析样品中的多巴胺、去甲肾上腺素和 5-羟色胺。该方法测得去甲肾上腺素的定量下限为 100 pmol/L,多巴胺和

5-羟色胺的定量下限为 150 pmol/L。徐妍等^[27]将微透析技术与高效液相色谱-电化学检测技术相结合对大鼠纹状体部位脑脊液中所含的多巴胺、3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸、5-羟色胺以及 5-羟吲哚乙酸的含量进行测量。该方法的线性范围为 0.2 ~ 500.0 ng/mL, 日内和日间精密度(1 d)均不大于 9.7%, 检出限为 0.1 ~ 0.2 ng/mL。该方法具有较高的灵敏度和良好的选择性, 对于在线、动态监测药物作用下活体动物脑脊液中神经递质变化具有重要意义。刘斌等^[28]采用微透析和高效液相色谱-电化学检测器联用的方法, 测定了大鼠右侧下丘脑腹外侧视前区中 5-羟色胺, 多巴胺以及去甲肾上腺素在 1 d 内的变化趋势, 实时评价朱砂安神丸引起的单胺神经递质的变化效应以及对睡眠的影响。该方法线性范围为 3.125 ~ 50.000 pg/mL, 日内和日间精密度均小于 3.6%。结果表明, 朱砂安神丸抑制下丘脑腹外侧视前区接受 5-羟色胺和去甲肾

上腺素, 从而起到安神助眠的作用。

1.1.4 微透析法与气相色谱-质谱法联用

另一种和微透析相结合用于测定神经递质的技术是气相色谱-质谱联用法(GC-MS)。尽管在对神经递质的检测方面, 通常首选微透析与液相色谱-质谱法相结合, 但是气相色谱-质谱法在对一些神经递质的检测方面具有出色的特异性和选择性。Farthing 等^[29]建立了一种快速、选择性的气相色谱-串联质谱法同时测定小鼠脑组织中 γ -氨基丁酸和谷氨酸。由于 GC 需要挥发性化合物, 因此在加热的 GC 进样口在线对 γ -氨基丁酸和谷氨酸进行衍生化, 以获得挥发性更强、反应活性更低的化合物^[30]。该方法在 0.5 ~ 100.0 μ g/mL 的范围内呈线性, γ -氨基丁酸和谷氨酸的检出限分别为 250 ng/mL 和 100 ng/mL。因此, 根据所使用的神经递质分离技术和检测器的不同, 微透析具有不同的灵敏度和选择性, 如表 1 所示。

表 1 与微透析联用的不同检测器之间的比较
Table 1 Comparison between different detectors for use with microdialysis

方法 Method	分析物种类 Analyte type	检出限 (ng/mL) LOD (ng/mL)	文献 Reference
液相色谱-质谱法 Liquid chromatography-mass spectrometry	衍生化 Derivatization 包括儿茶酚胺、吲哚胺、氨基酸、多胺、痕量胺、抗氧化剂、能量化合物及其代谢产物等 70 种化学物质 Including 70 chemical substances such as catecholamines, indoleamines, amino acids, polyamines, trace amines, antioxidants, energy compounds and their metabolites	0.009 ~ 28.830	[17]
	未衍生化 Underderivatization 5-羟色胺、5-羟吲哚乙酸、褪黑素、多巴胺、3-甲氧基酪胺、高香草酸、乙酰胆碱、脱氧肉碱、胆碱、 γ -氨基丁酸、腺苷、谷氨酰胺以及谷氨酸 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid, melatonin, dopamine, 3-methoxytyramine, homovanillic acid, acetylcholine, deoxycarnitine, choline, GABA, adenosine, glutamine and glutamate	0.005 ~ 17.100	[20]
液相色谱-荧光检测器法 Liquid chromatography-fluorescence detector	多巴胺、左旋多巴、高香草酸、肾上腺素、去甲肾上腺素、二羟基苯乙酸、5-羟色胺、5-羟吲哚乙酸 Dopamine, levodopa, homovanillic acid, epinephrine, norepinephrine, dihydroxyphenylacetic acid, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid	0.340 ~ 5.260	[25]
液相色谱-电化学检测器法 Liquid chromatography-electrochemical detector	多巴胺、3,4-二羟基苯乙酸、高香草酸、5-羟色胺、5-羟吲哚乙酸 Dopamine, 3, 4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, 5-hydroxytryptamine, 5-hydroxyindoleacetic acid	0.100 ~ 0.200	[27]
气相色谱-质谱法 Gas chromatography-mass spectrometry	γ -氨基丁酸和谷氨酸 GABA and glutamic acid	250.000, 100.000	[29]

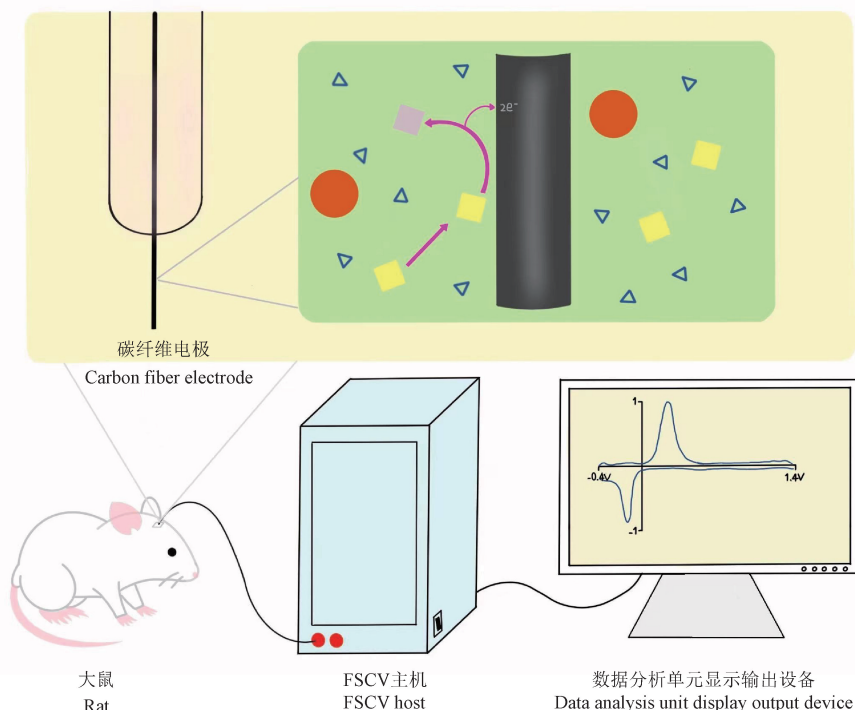
2 电化学传感器法

除了微透析法外, 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, 如图 3 所示。自 1973 年 Kissinger 等^[31]首次使用伏安法后, 伏安法已经发展成为以亚秒精度进行体内神经化学监

测的唯一可行技术。目前, 包括循环伏安法(CV)、差示脉冲伏安法(DPV)和快速扫描循环伏安法(FSCV)在内的许多伏安技术已被应用到神经化学物质的测量中^[32-33]。然而 CV 仅限于体外应用和检测高浓度的神经递质, 且时间分辨率较低。DPV 虽然可以用单个探针同时检测多个分析物, 但仍不足

以捕捉神经递质的亚秒变化。而 FSCV 能够以高时间分辨率在体内外快速检测神经递质^[34]。接下来,

本文详细综述了 FSCV 的基本原理、发展以及该方法在神经传递研究中的应用进展。



注:上下扫描一定范围的电位会导致吸附在电极表面的分析物的氧化和还原产生电流。神经递质的浓度可以用峰电流值来定量,随着神经递质浓度的升高,氧化峰的幅度也随之增大。所以既可以通过电流峰的电位位置得到定性信息,又可以通过峰的电流强度得出定量信息。

图 3 快速扫描循环伏安法电化学传感器的一般设置及工作原理

Note. Sweeping up and down a range of potentials results in the oxidation and reduction of analytes adsorbed on the electrode surface to generate currents. The concentration of neurotransmitter can be quantified by peak current value, and the amplitude of the oxidation peak increases with the increase of neurotransmitter concentration. Therefore, qualitative information can be obtained through the potential position of the current peak, and quantitative information can be obtained through the current intensity of the peak.

Figure 3 General setup and working principle of a fast-scan cyclic voltammetry electrochemical sensor

FSCV 常被用来测量清醒和有行为的动物大脑中的多巴胺,解决生物医学中神经递质局部浓度低、测量难的问题^[35]。FSCV 以高扫描速度将三角形波形应用于微电极,进而快速氧化和还原电极表面的电活性物质,微电极的小尺寸(直径 5 ~ 20 μm)使其比微透析探针更能接近要检测的释放部位^[36]。近几年随着人们对电极的不断开发,FSCV 可以与多电极阵列联用实现各种神经递质的检测。Castagnola 等^[37]利用玻碳微电极阵列对大鼠纹状体中多巴胺和 5-羟色胺进行定量。该方法具有良好的稳定性和可重复性,多巴胺和 5-羟色胺的检测范围为 10 ~ 200 nmol/L。然而 FSCV 所使用的传统的三角形波形在检测 DA 和 NE 时会产生类似的伏安图,难以区分这两种分析物的变化,分子特异性较差^[38]。

FSCV 主要通过对电极进行修饰或改变电流波

形来提高其化学选择性。在电极方面,电极涂层可以防止具有相似氧化还原曲线的分析物吸附到电极表面,避免电极对非特异性分子的吸附,从而提高化学选择性^[39]。例如,NaFion 涂层电极已成功用于 5-羟吲哚乙酸(5-HIAA)的检测且防止碳纤维电极结垢,解决了 5-羟色胺干扰降低记录特异性和保真度等问题^[40]。Taylor 等^[41]在 3,4-乙烯二氧噻吩的基础上开发出一种纳米复合涂层,使得碳纤维电极检测多巴胺的灵敏度提高了大约 422 倍,检测范围为 191 ~ 223 nmol/L。Puthongkham 等^[42]将纳米金刚石悬浮液滴铸到碳纤维微电极上,发现纳米金刚石能够显著提高 FSCV 对神经递质检测的灵敏度,同时还能够降低碳纤维电极在电化学和生物上的污损程度。该方法在检测多巴胺时表现尤为明显,灵敏度提高了 1.9 ~ 2.3 倍,检出限提高至 2 ~ 4 nmol/L。而 Bennet 等^[43]首次将钻石电极记录应

用于人类,开发出了掺硼钻石电极。该电极的灵敏度与碳纤维电极相当,但物理强度要比碳纤维电极高出 200 倍左右,在体外的使用寿命更长。在电流波形方面,通过改变波形的电势极限、扫描速率和应用频率来提高 FSCV 对神经递质检测的灵敏度、选择性和时间分辨率等各种性能,该方法性价比高、操作简单^[44]。FSCV 的标准波形是类似 CV 的三角形,若使用其他形状的定制波形,可以实现特定化合物的检测^[45]。Jo 等^[46]将三角形波形和矩形波形相结合,利用 0.1、0.2 和 0.3 V 正常脉冲伏安法和 FSCV 交替进行对大鼠纹状体中的多巴胺和去甲肾上腺素进行区分,在 0.1 V 时去甲肾上腺素和多巴胺这种区分最为明显。Ross 等^[47]开发了一种类似梯形的波形,能够选择性地检测腺苷、过氧化氢和 ATP。该波形与传统波形相比有着更低的检测限,并且能够提高在高扫描速率下电极的稳定性。Park 等^[48]将循环方波伏安法和背景减除相结合开发出快速循环方波伏安法(FCSWV),该方法极大地提高了对 DA 检测的灵敏度。当 DA 浓度为 0.5 ~ 2 $\mu\text{mol/L}$ 时,FCSWV 的检测极限为 5 ~ 9 nmol/L,而相同情况下 FSCV 检测极限为 11 ~ 37 nmol/L。除灵敏度增加外,与常规 FSCV 比,FCSWV 能更好地区分大鼠纹状体中多巴胺与其他神经递质。随着交替波形开发(传统三角形波形之外)以及专用探针的不断进步,FSCV 可实现同时、多重检测不同的神经化学物质^[49]。随着对 FSCV 不断地了解和开发,相信定能解决现代神经递质研究中所面临的一系列问题。

3 荧光传感器法

荧光检测是一种高特异性、高时空分辨率和良好的生物相容性的蛋白质动力学实时检测技术。该技术需引入荧光素基团对神经递质进行标记,通过检测和分析荧光信号的强度,完成对神经递质浓度的监测。根据此原理,本文详细综述两类较为成熟的实时可视化监测神经递质的荧光传感器^[50]。

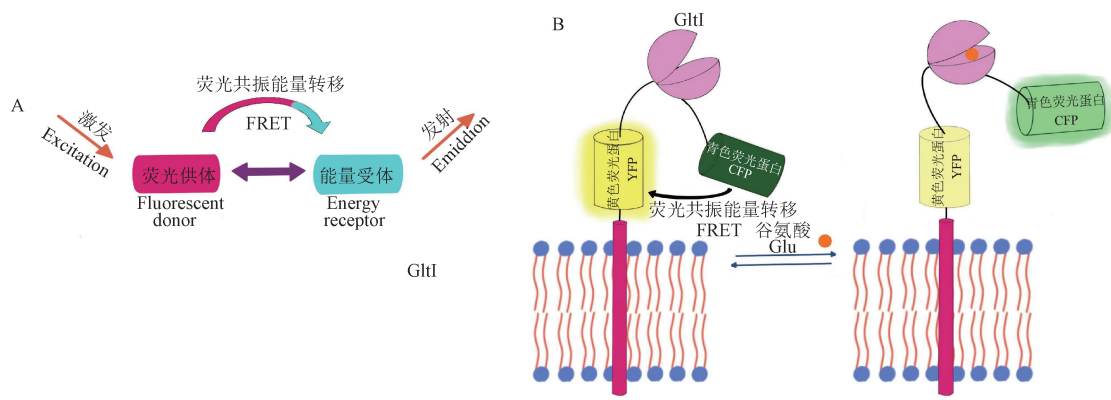
3.1 基于 FRET 的蛋白质传感器

荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)是激发态的供体荧光团通过偶极间的相互作用将其激发能以非辐射方式传递给受体荧光团,从而导致受体荧光团发光的技术,如图 4A^[51]。自 1948 年发现以来,FRET 已经发展成为检测分子之间,尤其是蛋白质之间相互作用的

强大工具,为生物医学研究的广泛领域开辟了新的可能性^[52]。Okumoto 等^[53]利用能够与神经递质结合的细菌周质结合蛋白(PBPs)作为传感器支架,将来自大肠杆菌的谷氨酸/天冬氨酸结合蛋白 ybeJ(也称 GltI)与绿色荧光蛋白的两个变体融合,研发出初代 Glu 荧光指示蛋白(FLIPE),对谷氨酸的亲合力约为 600 nmol/L,时间分辨率约为 1 ms,如图 4B。Masharina 等^[54]基于 FRET 技术,将 SNAP-tag、CLIP-tag 和目标分析物的受体蛋白(RP)组成融合蛋白,研发出半合成荧光传感器蛋白(Snifit)。该传感器以高特异性和高时间分辨率在哺乳动物活细胞表面检测 γ -氨基丁酸, γ -氨基丁酸的检测浓度在微摩尔至毫摩尔的范围内,时间分辨率在 1 ~ 10 s 的范围内,在研究生物系统中 γ -氨基丁酸的作用发挥着重要的价值。

由于多巴胺和去甲肾上腺素结构上的相似性,在电化学传感器等检测方法中这两种神经递质的检测信号也较为相近。而之后开发的一系列基于细胞的神经递质荧光工程报告程序(CNiFERs),不仅能分别通过 D2 受体、 $\alpha 1A$ 受体和 M1 受体,完成对多巴胺、去甲肾上腺素以及乙酰胆碱的选择性检测,而且能精确定位所检测的位置和时间,时间分辨率在 1 ~ 10 s 的范围内^[55-56]。与 FLIPE 和 Snifit 系统相比,CNiFER 系统已经在体内得到了广泛的表征。Muller 等^[57]将 CNiFERs 注射到小鼠的前额叶皮质,使用双光子显微镜测量条件反射过程中神经递质的释放。在该方法中,D2 CNiFER 对多巴胺表现出纳摩尔级别的灵敏度,而去甲肾上腺素的灵敏度比多巴胺低了 30 倍左右,多巴胺的检测浓度为 2.4 ~ 2.6 nmol/L,而去甲肾上腺素的检测浓度为 73 ~ 89 nmol/L。同样, $\alpha 1A$ CNiFER 对去甲肾上腺素表现出纳摩尔级别的灵敏度,去甲肾上腺素的检测浓度为 18 ~ 20 nmol/L,而多巴胺的检测浓度为 1.3 ~ 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 。虽然 CNiFER 不能分辨单个突触的神经传递,但仍然是体内监测神经递质最有特色的方法之一。

Marvin 等^[58]将循环重排绿色荧光蛋白(circularly permuted enhanced green fluorescent protein, cpEGFP)插入到 GltI 中开发出了 iGluSnFR,增强了与 Glu 结合时的荧光信号,并在神经元、视网膜、蠕虫、斑马鱼以及小鼠中都能长期稳定的成像。与 CNiFERs 相比,iGluSnFR 可以快速直接进入突触间隙,有着更适合于体内成像的信噪比和动力学,其



注:A:FRET 基本原理:激发态的供体荧光团通过偶极间的相互作用将其激发能以非辐射方式传递给受体荧光团,从而导致受体荧光团发光;B:基于 FRET 原理的谷氨酸传感器示意图:通过将来自大肠杆菌的 GltI 与青色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP)组成的 FRET 对融合,设计出了第一个谷氨酸传感器;GltI 为传感器的分子识别结构域,当它在与谷氨酸结合时构象发生变化,导致 YFP 和 CFP 相互远离,FRET 效率降低。

图 4 FRET 基本原理与基于 FRET 原理的谷氨酸传感器

Note. A. The basic principle of FRET. Donor fluorophore in the excited state transfers its excitation energy to the acceptor fluorophore in a non-radiative manner through the interaction between dipoles, thereby causing the acceptor fluorophore to emit light. B. Based on the principle of FRET Schematic diagram of the glutamate sensor. First glutamate sensor was designed by fusing GltI from *Escherichia coli* with a FRET pair consisting of cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP). GltI is the molecular recognition domain of the sensor. When it binds to glutamate, its conformation changes, causing YFP and CFP to move away from each other, and the FRET efficiency decreases.

Figure 4 Basic principle of FRET and glutamate sensor based on FRET principle

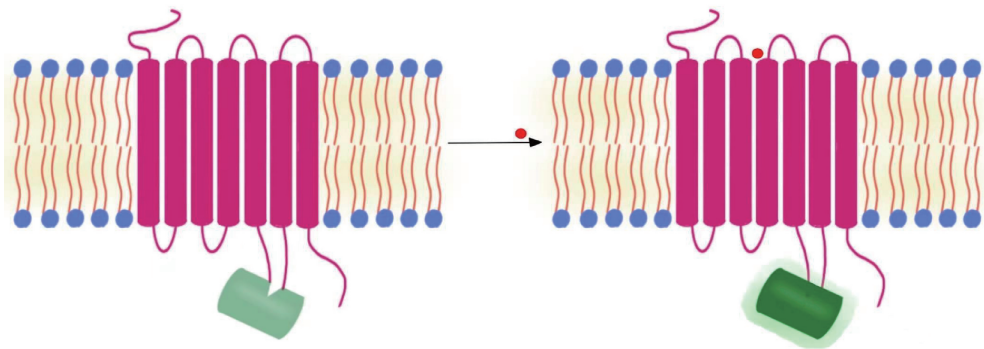
对谷氨酸的亲合力在 $98 \sim 116 \mu\text{mol/L}$ 的范围内,时间分辨率在约为 5 ms 的范围内,检测范围为 $1 \sim 10 \text{ mmol/L}$ 。Marvin 等^[59]用环重排超折叠绿色荧光蛋白(circularly permuted superfolder green fluorescent protein, cpSFGFP)取代了原来的 cpEGFP,开发出了 SF-iGluSnFR。虽然 SF-iGluSnFR 的动力学与最初的 iGluSnFR 相比要慢,但 SF-iGluSnFR 具有更高的亲和力和灵敏度,比 iGluSnFR 更适用于监测突触中谷氨酸的快速释放^[60]。Helassa 等^[61]在最初的 iGluSnFR 的基础上,设计出了 iGlu_r 和 iGlu_u 两种新的变体,其中 iGlu_u 能够在 100 Hz 的频率下直接报告大鼠海马神经元细胞中单个谷氨酸的释放,检测范围为 $0.01 \sim 10 \text{ mmol/L}$ 。虽然与 iGluSnFR 相比,iGlu_r 和 iGlu_u 的亲合力有所降低,但这两种变体在体外的构象变化速度和在突触中的动力学速度分别提高了 6 倍和 5 倍^[62]。

3.2 基于 G 蛋白偶联受体的蛋白质传感器

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是最大的膜受体家族,近年来,已开发了一系列基于 GPCR 的传感器来测量神经递质,比如 ACh 传感器(GACh)、DA 传感器(GRAB_{DA})和 NE 传感器(GRAB_{NE}),如图 5 所示,以及通过人类 DAD1 和 D4 受体进行检测的 dLight 系列探针^[63]。

与 PBP 作为传感器支架相比,基于 GPCR 传感器在原理上可达到相似的灵敏度和响应动力学,但在检测相应的神经递质时具有更好的亲和力和选择性。

Patriarchi 等^[64]开发了一种基于遗传编码的多巴胺传感器——dLight1,该传感器能够以高时空分辨率监测小鼠纹状体中多巴胺毫秒级的变化情况,该传感器对多巴胺亲合力在 $300 \sim 360 \text{ nmol/L}$ 的范围内。研究表明 dLight1 在研究药理操作、电生理或光遗传学刺激等情况下多巴胺的动态变化时具有很强的实用性。Patriarchi 等^[65]还设计除了干扰性小和光稳定性强的 RdLight1,RdLight1 对多巴胺的亲合力为 229 nmol/L ,检测范围为 $0.01 \sim 100 \mu\text{mol/L}$,为扩展基于 GPCR 的传感器的颜色光谱提供了一个范例。Sun 等^[66]用 cpGFP 取代了多巴胺 D2 受体 GPCR 的第三细胞内环,经过广泛的优化制备出了对多巴胺具有高度特异性的 GRAB_{DA},该传感器具有亚细胞分辨率、亚秒动力学、较大的表观亲合力以及出色的分子特异性,能够实时检测活蝇、斑马鱼和小鼠等多个模型系统中内源性多巴胺的动态变化。GRAB_{DA} 对多巴胺的亲合力为 130 nmol/L ,时间分辨率不大于 100 ms 。dLight 和 GRAB_{DA} 在 HEK293 T 细胞中都具有很好的表达和



注:GPCRs 由 7 个 α 螺旋跨膜结构域 (TMs) 组成,当配体与 GPCR 结合时 TM6 的胞质末端构象变化最大。通过插入到 GPCRs 第三细胞内环结构域中的 epGFP,完成对 TM5 和 TM6 的连接,以检测 GPCRs 与配体结合时发生的构象变化。配体结合诱导 GPCR 的构象变化,从而导致荧光增强。

图 5 基于 G 蛋白偶联受体的荧光传感器

Note. GPCRs consist of seven α -helical transmembrane domains (TMs), and the conformation of the cytoplasmic end of TM6 changes the most when a ligand binds to the GPCR. Ligation of TM5 and TM6 is accomplished by epGFP inserted into the third intracellular loop domain of GPCRs to detect conformational changes that occur upon GPCR binding to ligands. Ligand binding induces a conformational change in the GPCR resulting in increased fluorescence.

Figure 5 Fluorescent sensor based on G protein-coupled receptors

良好的性能。

Jing 等^[67]开发了一系列基于 GPCR 的 GACH,能够选择性地响应外源性和内源性乙酰胆碱,并通过双光子显微镜捕捉到强烈的荧光信号,具有良好的灵敏度、配体特异性、动力学和光稳定性。该传感器在对乙酰胆碱的亲合力为 100 $\mu\text{mol/L}$,时间分辨率在毫秒级别的范围内。Feng 等^[68]利用配体结合时第五和第六跨膜域之间的构象变化来调节结

合的荧光蛋白的亮度,开发了一系列基于 GPCR 激活的 GRAB_{NE}。研究发现,GRAB_{NE}具有很高的灵敏度、特异性和光稳定性,对去甲肾上腺素的亲合力在纳摩尔至微摩尔的范围内,时间分辨率在亚秒级别的范围内,检测范围为 0.1 ~ 100.0 $\mu\text{mol/L}$ 。GRAB_{NE}能快速、特异地监测小鼠生理和病理过程中体内去甲肾上腺素的动态变化,对于了解去甲肾上腺素在复杂行为中的调节和影响具有重要的作用。

表 2 不同种类的荧光传感器在神经递质检测方面的比较

Table 2 Comparison of different kinds of fluorescence sensors for neurotransmitter detection						
传感器类型 Sensor type	类型 Type	目标分析物 Target analyte	亲和力 Affinity	时间分辨率 Temporal resolution	检测范围 Detection range	文献 Reference
FLIPE	细菌周质结合蛋白 PBP	谷氨酸 Glu	约为 600 nmol/L Approximately 600 nmol/L	约为 1 ms Approximately 1 ms	10 ~ 10 000 $\mu\text{mol/L}$	[53]
Snifit	细菌周质结合蛋白 PBP	γ -氨基丁酸 GABA	约为 400 $\mu\text{mol/L}$ Approximately 400 $\mu\text{mol/L}$	1 ~ 10 s	1 ~ 10 000 $\mu\text{mol/L}$	[54]
CNiFERs	细菌周质结合蛋白 PBP	多巴胺,去甲肾 上腺素,乙酰胆碱 DA, NE, ACh	2.4 ~ 2.6 nmol/L	1 ~ 10 s	纳摩尔级别 Nanomolar level	[57]
iGluSnFR	细菌周质结合蛋白 PBP	谷氨酸 Glu	约为 9 $\mu\text{mol/L}$ Approximately 9 $\mu\text{mol/L}$	约为 5 ms Approximately 5 ms	1 ~ 10 000 $\mu\text{mol/L}$	[58]
dLight1	G 蛋白偶联受体 GPCR	多巴胺 DA	300 ~ 360 nmol/L	10 ~ 100 ms	0.01 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$	[64]
RdLight1	G 蛋白偶联受体 GPCR	多巴胺 DA	229 nmol/L	126 ~ 320 ms	0.01 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$	[65]
GRAB _{DA}	G 蛋白偶联受体 GPCR	多巴胺 DA	130 nmol/L	$\leq$ 100 ms	0.01 ~ 1 $\mu\text{mol/L}$	[66]
GACH	G 蛋白偶联受体 GPCR	乙酰胆碱 ACh	100 $\mu\text{mol/L}$	248 ~ 312 ms, 687 ~ 837 ms	1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$	[67]
GRAB _{NE}	G 蛋白偶联受体 GPCR	去甲肾上腺素 NE	1 $\mu\text{mol/L}$	72 ~ 680 ms, 36 ~ 1 890 ms	0.1 ~ 100.0 $\mu\text{mol/L}$	[68]

表 2 为不同种类的荧光传感器在神经递质检测方面的比较。

4 总结与展望

神经递质是神经系统中重要的化学信使,在维持人体正常的生命活动中扮演着十分重要的角色。虽然已有关于神经递质检测技术的文章,但大部分文章只着重讨论某一类神经递质检测技术。本文对目前常用的能够实时监测体内神经递质的技术进行了全面的回顾。详细阐述了各个检测方法的原理及其应用,比较了这些方法的优缺点,如表 3 所示。当面临不同的情况时,可以为选择合适的技术

提供了良好的参考。

在自由活动的动物模型甚至人类中,对神经化学动力学的微侵入性监测仍然是具有挑战性的。除了上面讨论的技术外,研究者们还开发了其他基于化学和细胞的方法来监测神经化学动力学^[69]。随着材料学、生物和化学等领域中各种新技术的不断发展,大脑神经递质检测技术的研发将会被推向一个新的水平。神经科学的研究者们提出的新问题和在创造各种技术中吸取的经验教训将成为开发新的检测神经递质方法的纽带^[11]。神经递质的检测研究已经具备较好的基础,许多技术正在经历广泛的创新并显示出巨大的未来前景,未来神经递

表 3 神经递质检测工具之间的比较

Table 3 Comparison between neurotransmitter detection tools

方法 Methods	原理 Principle	空间分辨率 Spatial resolution	时间分辨率 Temporal resolution	灵敏度 Sensitivity	实用性 Practicality	局限性 Limitations	模式生物 Model organisms
微透析法 Microdialysis	通过植入大脑的透析探头完成对神经递质的收集 Collection of neurotransmitters through dialysis probes implanted in the brain	低,受探头尺寸限制(≥1 mm 长,~200 μm 直径) Low, limited by probe size (≥1 mm long, ~200 μm diameter)	亚分钟到分钟 Sub-minutes to minutes	低 Low	检测范围广,允许多模式研究和神经化学物质的多路检测,可用于行为正常的动物 Broad detection range allows multimodal studies and multiplexed detection of neurochemicals in normally behaving animals	时空分辨率差,造成组织损伤 Poor spatial and temporal resolution, causing tissue damage	大小鼠、狗、兔子、猪、恒河猴 Rat, mouse, dogs, rabbits, pigs, rhesus monkeys
快速扫描循环伏安法 Fast scan cyclic voltammetry	通过微电极,利用一定的电压对具有电活性的神经递质进行监测 Using microelectrodes to monitor electrically active neurotransmitters using a certain voltage	中高,受探头尺寸限制(≥50 μm 长,5~10 μm 直径) Medium height, limited by probe size (≥50 μm long, 5~10 μm diameter)	亚秒级分辨率 Sub-second resolution	高 High	允许多模式研究,可用于急性脑切片或行为正常的动物,微电极可减少组织损伤 Allows for multimodal studies, can be used in acute brain slices or in normal behaving animals, microelectrodes reduce tissue damage	空间分辨率差,造成组织损伤 Poor spatial resolution, causing tissue damage	大小鼠、斑马鱼、猪、恒河猴、人 Rat and mouse, zebrafish, pigs, rhesus monkeys, humans
荧光传感器法 Fluorescence sensors	通过小分子或蛋白质的传感器对神经递质进行间接监测或测量 Indirect monitoring or measurement of neurotransmitters via small molecule or protein sensors	高 High	亚秒级分辨率 Sub-second resolution	中高 Medium height	特异性好,具有多种荧光指示剂和蛋白质传感器 Good specificity, with a variety of fluorescent indicators and protein sensors	荧光强度随时间推移而衰减,无法对同一个样品进行连续观察,在体内的使用有限 Fluorescence intensity decays over time, prevents continuous observation of the same sample, limited use <i>in vivo</i>	大肠杆菌、黑腹果蝇、秀丽隐杆线虫、大小鼠、斑马鱼、恒河猴 <i>Escherichia coli</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>caenorhabditis elegans</i> , rat and mouse, zebrafish, rhesus monkey

质检测技术将继续向着无创、实时可视化以及信号放大等方向发展。

参 考 文 献(References)

- [1] Chiu SY, Kriegler S. Neurotransmitter-mediated signaling between axons and glial cells [J]. *Glia*, 1994, 11(2): 191–200.
- [2] Baranwal A, Chandra P. Clinical implications and electrochemical biosensing of monoamine neurotransmitters in body fluids, *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo* models [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 121: 137–152.
- [3] Banerjee S, McCracken S, Hossain MF, et al. Electrochemical detection of neurotransmitters [J]. *Biosensors*, 2020, 10(8): 101.
- [4] Tavakolian-Ardakani Z, Hosu O, Cristea C, et al. Latest trends in electrochemical sensors for neurotransmitters: a review [J]. *Sensors*, 2019, 19(9): 2037.
- [5] Li Y, Zhong W, Wang D, et al. Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10503.
- [6] 万金霞, 李毓龙. 神经递质检测方法的研究进展 [J]. *分析化学*, 2020, 48(3): 307–315.
- Wan JX, Li YL. Recent advances in detection methods for neurotransmitters [J]. *Chin J Anal Chem*, 2020, 48(3): 307–315.
- [7] Zhu M, Liu G, Chen H, et al. Analytical strategies in neurotransmitter measurements: a mini literature review [J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(7): e5521.
- [8] Bito L, Davson H, Levin E, et al. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, *in vivo* dialysate of brain, and blood plasma of the dog [J]. *J Neurochem*, 1966, 13(11): 1057–1067.
- [9] Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. Microdialysis in rodents [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2009, 7: 72.
- [10] Lada MW, Kennedy RT. Quantitative *in vivo* monitoring of primary amines in rat caudate nucleus using microdialysis coupled by a flow-gated interface to capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Anal Chem*, 1996, 68(17): 2790–2797.
- [11] Tjahjono N, Jin Y, Hsu A, et al. Letting the little light of mind shine: advances and future directions in neurochemical detection [J]. *Neurosci Res*, 2022, 179: 65–78.
- [12] Cepeda DE, Hains L, Li D, et al. Experimental evaluation and computational modeling of tissue damage from low-flow push-pull perfusion sampling *in vivo* [J]. *J Neurosci Methods*, 2015, 242: 97–105.
- [13] Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, et al. Overview of brain microdialysis [J]. *Curr Protoc Neurosci*, 2009, 7: 71.
- [14] Ngernsutorakul T, Steyer DJ, Valenta AC, et al. *In vivo* chemical monitoring at high spatiotemporal resolution using microfabricated sampling probes and droplet-based microfluidics coupled to mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(18): 10943–10950.
- [15] Li Q, Pei J, Song P, et al. Fraction collection from capillary liquid chromatography and off-line electrospray ionization mass spectrometry using oil segmented flow [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(12): 5260–5267.
- [16] Nandi P, Lunte SM. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 651(1): 1–14.
- [17] Wong JM, Malec PA, Mabrouk OS, et al. Benzoyl chloride derivatization with liquid chromatography-mass spectrometry for targeted metabolomics of neurochemicals in biological samples [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1446: 78–90.
- [18] Meng X, Bai H, Ma Q, et al. Broad targeted analysis of neurochemicals in rat serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatization [J]. *J Sep Sci*, 2020, 43(21): 4006–4017.
- [19] Fu J, Zhang H, Liu S, et al. An integrated strategy using LC-MS/MS combined with *in vivo* microdialysis for the simultaneous determination of lignans of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. Fructus and endogenous neurotransmitters: application in pharmacokinetic and pharmacodynamic studies [J]. *Food Funct*, 2021, 12(19): 8932–8945.
- [20] Becker S, Schulz A, Kreyer S, et al. Sensitive and simultaneous quantification of 16 neurotransmitters and metabolites in murine microdialysate by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2023, 253: 123965.
- [21] 潘凌云, 王雨, 刘新华, 等. UPLC-MS/MS 同时测定大鼠脑微透析样品中 11 个神经递质含量 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(12): 3242–3250.
- Pan LY, Wang Y, Liu XH, et al. Simultaneous determination of 11 neurotransmitters in brain microdialysis samples from rats by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2022, 47(12): 3242–3250.
- [22] Helmschrodt C, Becker S, Perl S, et al. Development of a fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of neurotransmitters in murine microdialysate [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2020, 412(28): 7777–7787.
- [23] Şanlı N, Tague SE, Lunte C. Analysis of amino acid neurotransmitters from rat and mouse spinal cords by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 107: 217–222.
- [24] 邓祖跃, 许国峰, 袁钰萍, 等. HPLC-FLD 测定不同脑区 3 种单胺神经递质及其代谢产物含量 [J]. *中国现代应用药理学*, 2019, 36(5): 522–525.
- Deng ZY, Xu GF, Yuan YP, et al. Content determination of three kinds of monoamine neurotransmitters and their metabolites in rat different brain tissue by HPLC with fluorescence detection [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2019, 36(5): 522–525.
- [25] 咎富文, 解裴育, 贾昊然, 等. 高效液相色谱法测定百草枯染毒后小鼠脑组织中 8 种单胺类神经递质的含量变化 [J].

- 理化检验(化学分册), 2019, 55(10): 1126–1131.
- Zan FW, Xie PY, Jia HR, et al. HPLC determination of 8 monoamine neurotransmitters in brain tissues of mice contaminated with paraquat and their changes after contamination [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2019, 55(10): 1126–1131.
- [26] van Schoors J, Viaene J, van Wanseele Y, et al. An improved microbore UHPLC method with electrochemical detection for the simultaneous determination of low monoamine levels in *in vivo* brain microdialysis samples [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 127: 136–146.
- [27] 徐妍, 毛健, 庆宏. 微透析-HPLC-ECD 联用在线测定烟碱暴露大鼠脑内单胺神经递质的动态变化 [J]. 烟草科技, 2017, 50(1): 50–57.
- Xu Y, Mao J, Qing H. *In vivo* determination of monoamine neurotransmitters in brain striatum of rat using online microdialysis coupled with high performance liquid chromatography-electrochemical detector [J]. Tobacco Sci Technol, 2017, 50(1): 50–57.
- [28] 刘斌, 李廷利. 朱砂安神丸对大鼠 VLPO 脑区内单胺类递质的影响 [J]. 中国药物依赖性杂志, 2018, 27(6): 425–430.
- Liu B, Li TL. The effect of Zhusha Anshen Pill on monoamine neurotransmitters in rat VLPO brain region [J]. Chin J Drug Depend, 2018, 27(6): 425–430.
- [29] Farthing CA, Farthing DE, Gress RE, et al. Determination of l-glutamic acid and γ -aminobutyric acid in mouse brain tissue utilizing GC-MS/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017, 1068/1069: 64–70.
- [30] Foguet-Romero E, Samarra I, Guirro M, et al. Optimization of a GC-MS injection-port derivatization methodology to enhance metabolomics analysis throughput in biological samples [J]. J Proteome Res, 2022, 21(11): 2555–2565.
- [31] Kissinger PT, Hart JB, Adams RN. Voltammetry in brain tissue—a new neurophysiological measurement [J]. Brain Res, 1973, 55(1): 209–213.
- [32] Demuru S, Nela L, Marchack N, et al. Scalable nanostructured carbon electrode arrays for enhanced dopamine detection [J]. ACS Sens, 2018, 3(4): 799–805.
- [33] Venton BJ. Fundamentals of fast-scan cyclic voltammetry for dopamine detection [J]. Analyst, 2020, 145(4): 1158–1168.
- [34] Zhu M, Zeng C, Ye J, et al. Simultaneous *in vivo* voltammetric determination of dopamine and 5-Hydroxytryptamine in the mouse brain [J]. Appl Surf Sci, 2018, 455: 646–652.
- [35] Ganesana M, Lee ST, Wang Y, et al. Analytical techniques in neuroscience: recent advances in imaging, separation, and electrochemical methods [J]. Anal Chem, 2017, 89(1): 314–341.
- [36] Puthongkham P, Venton BJ. Recent advances in fast-scan cyclic voltammetry [J]. Analyst, 2020, 145(4): 1087–1102.
- [37] Castagnola E, Thongpang S, Hirabayashi M, et al. Glassy carbon microelectrode arrays enable voltage-peak separated simultaneous detection of dopamine and serotonin using fast scan cyclic voltammetry [J]. Analyst, 2021, 146(12): 3955–3970.
- [38] Heien ML, Phillips PE, Stuber GD, et al. Overoxidation of carbon-fiber microelectrodes enhances dopamine adsorption and increases sensitivity [J]. Analyst, 2003, 128(12): 1413–1419.
- [39] Feng T, Ji W, Tang Q, et al. Low-fouling nanoporous conductive polymer-coated microelectrode for *in vivo* monitoring of dopamine in the rat brain [J]. Anal Chem, 2019, 91(16): 10786–10791.
- [40] Hashemi P, Dankoski EC, Petrovic J, et al. Voltammetric detection of 5-hydroxytryptamine release in the rat brain [J]. Anal Chem, 2009, 81(22): 9462–9471.
- [41] Taylor IM, Patel NA, Freedman NC, et al. Direct *in vivo* electrochemical detection of resting dopamine using poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carbon nanotube functionalized microelectrodes [J]. Anal Chem, 2019, 91(20): 12917–12927.
- [42] Puthongkham P, Venton BJ. Nanodiamond coating improves the sensitivity and antifouling properties of carbon fiber microelectrodes [J]. ACS Sens, 2019, 4(9): 2403–2411.
- [43] Bennet KE, Tomshine JR, Min HK, et al. A diamond-based electrode for detection of neurochemicals in the human brain [J]. Front Hum Neurosci, 2016, 10: 102.
- [44] Rafi H, Zestos AG. Review-recent advances in FSCV detection of neurochemicals via waveform and carbon microelectrode modification [J]. J Electrochem Soc, 2021, 168(5): 057520.
- [45] Corva DM, Adams SD, Bennet KE, et al. Miniature FSCV devices: a review [J]. IEEE Sens J, 2021, 21(12): 13006–13018.
- [46] Jo T, Yoshimi K, Takahashi T, et al. Dual use of rectangular and triangular waveforms in voltammetry using a carbon fiber microelectrode to differentiate norepinephrine from dopamine [J]. J Electroanal Chem, 2017, 802: 1–7.
- [47] Ross AE, Venton BJ. Sawhorse waveform voltammetry for selective detection of adenosine, ATP, and hydrogen peroxide [J]. Anal Chem, 2014, 86(15): 7486–7493.
- [48] Park C, Oh Y, Shin H, et al. Fast cyclic square-wave voltammetry to enhance neurotransmitter selectivity and sensitivity [J]. Anal Chem, 2018, 90(22): 13348–13355.
- [49] Hersey M, Samaranayake S, Berger SN, et al. Inflammation-induced histamine impairs the capacity of escitalopram to increase hippocampal extracellular serotonin [J]. J Neurosci, 2021, 41(30): 6564–6577.
- [50] Wang W, Kim CK, Ting AY. Molecular tools for imaging and recording neuronal activity [J]. Nat Chem Biol, 2019, 15(2): 101–110.
- [51] Lim J, Petersen M, Bunz M, et al. Flow cytometry based-FRET: basics, novel developments and future perspectives [J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(4): 217.
- [52] Deal J, Pleshinger DJ, Johnson SC, et al. Milestones in the development and implementation of FRET-based sensors of intracellular signals: a biological perspective of the history of FRET [J]. Cell Signal, 2020, 75: 109769.
- [53] Okumoto S, Looger LL, Micheva KD, et al. Detection of

- glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(24): 8740–8745.
- [54] Masharina A, Reymond L, Maurel D, et al. A fluorescent sensor for GABA and synthetic GABA(B) receptor ligands [J]. J Am Chem Soc, 2012, 134(46): 19026–19034.
- [55] Beyene AG, Yang SJ, Landry MP. Review Article: tools and trends for probing brain neurochemistry [J]. J Vac Sci Technol A, 2019, 37(4): 040802.
- [56] Lacin E, Muller A, Fernando M, et al. Construction of cell-based neurotransmitter fluorescent engineered reporters (CNiFERs) for optical detection of neurotransmitters *in vivo* [J]. J Vis Exp, 2016(111): 53290.
- [57] Muller A, Joseph V, Slesinger PA, et al. Cell-based reporters reveal *in vivo* dynamics of dopamine and norepinephrine release in murine cortex [J]. Nat Methods, 2014, 11(12): 1245–1252.
- [58] Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, et al. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission [J]. Nat Methods, 2013, 10(2): 162–170.
- [59] Marvin JS, Scholl B, Wilson DE, et al. Stability, affinity, and chromatic variants of the glutamate sensor iGluSnFR [J]. Nat Methods, 2018, 15(11): 936–939.
- [60] Shen Y, Nasu Y, Shkolnikov I, et al. Engineering genetically encoded fluorescent indicators for imaging of neuronal activity: progress and prospects [J]. Neurosci Res, 2020, 152: 3–14.
- [61] Helassa N, Dürst CD, Coates C, et al. Ultrafast glutamate sensors resolve high-frequency release at Schaffer collateral synapses [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(21): 5594–5599.
- [62] 胡巧, 史雨馨, 杨晓玲, 等. 神经递质的可视化荧光检测技术研究进展 [J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1051–1059. Hu Q, Shi YX, Yang XL, et al. Progress in fluorescent visualization techniques for neurotransmitter detection [J]. Chin J Biotechnol, 2020, 36(6): 1051–1059.
- [63] Jing M, Zhang Y, Wang H, et al. G-protein-coupled receptor-based sensors for imaging neurochemicals with high sensitivity and specificity [J]. J Neurochem, 2019, 151(3): 279–288.
- [64] Patriarchi T, Cho JR, Merten K, et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors [J]. Science, 2018, 360(6396): eaat4422.
- [65] Patriarchi T, Mohebi A, Sun J, et al. An expanded palette of dopamine sensors for multiplex imaging *in vivo* [J]. Nat Methods, 2020, 17(11): 1147–1155.
- [66] Sun F, Zeng J, Jing M, et al. A genetically encoded fluorescent sensor enables rapid and specific detection of dopamine in flies, fish, and mice [J]. Cell, 2018, 174(2): 481–496.
- [67] Jing M, Zhang P, Wang G, et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(8): 726–737.
- [68] Feng J, Zhang C, Lischinsky JE, et al. A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific *InVivo* detection of norepinephrine [J]. Neuron, 2019, 102(4): 745–761.
- [69] Zhang Y, Jiang N, Yetisen AK. Brain neurochemical monitoring [J]. Biosens Bioelectron, 2021, 189: 113351.

[收稿日期] 2023-05-24