

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.14.001

• 基础研究 •

两种基因编码的探针特异性检测小鼠脑 5-HT 信号的比较 *

张 坤^{1#} 王建刚^{2#} 王静怡¹ 罗 静¹ 范 蕾¹ 程傲冰^{3Δ} 韩燕飞^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院 药理学与化学生物学系 上海 200025;

2 新乡医学院 生理学病理生理学系 河南 新乡 453003; 3 广州市第一人民医院麻醉科 广东 广州 510180)

摘要 目的: 5-羟色胺(5-HT)对中枢神经系统发挥着重要的调控作用,其功能失调与许多精神类疾病密切相关,因此开发能实时灵敏检测 5-HT 的工具对研究此类疾病及研发靶向药物至关重要。最近新开发的 iSeroSnFR 和 GRAB_{5-HT1.0} 两类 5-HT 荧光探针,具有细胞特异性、反应灵敏以及高时空分辨率等显著优势,已经成为深入探究 5-HT 作用机制的有力工具。本研究旨在探究荧光探针 iSeroSnFR 和 GRAB_{5-HT1.0} 哪种能更有效地检测 5-HT 递质释放及动态变化,从而为后续优化 5-HT 荧光探针和利用这一有力工具解析神经疾病中的递质异常提供新思路。**方法:** 将 iSeroSnFR 或 GRAB_{5-HT1.0} 探针的基因序列插入到 Sindbis 病毒表达载体,然后把病毒分别转染到培养的小鼠离体脑片的海马 CA1 区,比较两种探针在神经元中的表达差异;并检测其对外源性 5-HT 药物诱导产生的荧光反应。另外,将上述病毒转染到急性小鼠脑片中缝核(DRN)区,给与电刺激检测两种探针响应内源 5-HT 释放的荧光信号差异。**结果:** 在转染 iSeroSnFR 的海马 CA1 区神经元中均有荧光表达,但细胞边界不清晰;而转染了 GRAB_{5-HT1.0} 的神经元细胞膜上表达有强烈的绿色荧光信号。用 1 μM 5-HT 处理培养的小鼠脑片海马 CA1 神经元时,iSeroSnFR 探针没有明显的荧光强度变化;而 GRAB_{5-HT1.0} 探针产生的荧光强度显著增强;用 1 mM 5-HT 处理时,iSeroSnFR 探针产生一定强度的荧光反应,但响应幅度弱于 GRAB_{5-HT1.0} 探针。另外,利用上述病毒转染急性小鼠脑片 DRN 区,通过电刺激诱导内源性 5-HT 释放,发现仅在表达 GRAB_{5-HT1.0} 探针的 DRN 神经元中观察到显著增强的荧光反应;而 iSeroSnFR 探针几乎未产生明显荧光变化。**结论:** 在小鼠脑中,GRAB_{5-HT1.0} 荧光探针对外源性 & 内源性的 5-HT 的亲和力更高、灵敏度更强。

关键词: 基因编码探针;GPCR;PBPs;5-HT**中图分类号:** Q-33;Q189;Q593.2;Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)14-2601-06Comparison of Two Genetically Encoded Fluorescent Sensors
to Detect 5-HT in Mouse Brain*ZHANG Kun^{1#}, WANG Jian-gang^{2#}, WANG Jing-yi¹, LUO Jing¹, FAN Lei¹, CHENG Ao-bing^{3Δ}, HAN Yan-fei^{1Δ}

(1 Department of Pharmacology and Chemical Biology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 Department of physiology and pathophysiology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, 453003, China;

3 Department of Anesthesiology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong, 510180, China)

ABSTRACT Objective: 5-HT (5-hydroxytryptamine) is a monoamine neurotransmitter in the brain, playing a critical role in a broad range of biological processes. 5-HT dysregulation has been involved in mental disorders, including anxiety and depression. Despite the importance of 5-HT, our understanding of cell-specific 5-HT signaling is flawed, partly due to the inability to measure 5-HT with a high spatiotemporal resolution. Recently developed iSeroSnFR and GRAB_{5-HT1.0}, two genetically encoded 5-HT sensors, have attractive features because of their cell specificity, sensitivity, and excellent spatiotemporal resolution to probe 5-HT dynamics. Our study aims to compare the different properties of iSeroSnFR and GRAB_{5-HT1.0} in response to 5-HT in the mouse brain. It can provide new insights into the optimization of 5-HT sensors and the development of other genetically encoded fluorescent neurotransmitter sensors. It can also help us choose the appropriate sensor based on different scientific issues and explore molecular and cellular mechanisms of neurological diseases. **Methods:** The iSeroSnFR sensor or GRAB_{5-HT1.0} sensor was expressed in the CA1 neurons of cultured hippocampal slices or DRN of acute mouse brain slices using the Sindbis viral expression system. Then the fluorescence intensity and the fluorescent changes of iSeroSnFR and GRAB_{5-HT1.0} in response to 5-HT drug puff on cultured mouse hippocampal slices or electrical stimuli evoked 5-HT

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82101284 81701070);河南省科技攻关项目(212102310824)

作者简介:张坤(1994-),男,硕士,主要研究方向:神经生物学,E-mail: zhang_kun@sjtu.edu.cn

王建刚(1978-),男,硕士,副教授,主要研究方向:神经生物学,E-mail: wjg2006@hotmail.com

为共同第一作者

Δ 通讯作者:程傲冰(1977-),男,副主任医师,主要研究方向:神经生物学,E-mail: eychengaobing@scut.edu.cn,电话:18028669220

韩燕飞(1980-),女,助理研究员,主要研究方向:神经生物学,E-mail: yanfeihan2008@sjtu.edu.cn,电话:15121036800

(收稿日期:2021-12-23 接受日期:2022-01-17)

release on acute mouse DRN slices were compared. **Results:** We found many fluorescence signals in iSeroSnFR-expressing hippocampal CA1 neurons, but the cell boundary was unclear. In comparison, there was a robust green fluorescence signal in GRAB_{5-HT1.0}-expressing hippocampal CA1 neurons. Subsequently, when the CA1 region of mouse hippocampal cultured slices was exposed to 1 μ M 5-HT application, the iSeroSnFR sensor almost had no detectable fluorescence changes. However, GRAB_{5-HT1.0} sensor produced robust fluorescence responses. Meanwhile the fluorescence response of the iSeroSnFR is weaker than that of the GRAB_{5-HT1.0} in response to puffed 1 mM 5-HT. In addition, we made Sindbis viral expression of iSeroSnFR or GRAB_{5-HT1.0} sensor and applied electrical stimuli to evoke 5-HT release in the DRN region of acute mouse brain slices. It provoked robust increases in fluorescence in DRN slices expressing GRAB_{5-HT1.0} sensor. On the contrary, the same electrical stimuli almost have no effect in DRN slices expressing the iSeroSnFR sensor. **Conclusion:** The GRAB_{5-HT1.0} sensor can measure the exogenous 5-HT drug and endogenous 5-HT release with higher affinity and sensitivity in the mouse brain.

Key words: Genetically encoded sensor; GPCR; PBPs; 5-HT

Chinese Library Classification(CLC): Q-33; Q189; Q593.2; Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)14-2601-06

前言

五-羟色胺 (5-Hydroxytryptamine, 5-HT), 又名血清素 (Serotonin), 是生物体内一种非常重要的单胺类活性物质, 广泛存在于外周组织和中枢神经系统^[1]。在中枢神经系统中, 5-HT 主要由位于脑干的背侧中缝核 (Dorsal raphe nucleus, DRN) 的 5-HT 能神经元合成释放, 这群神经元通过广泛投射到多个脑区^[2,3], 参与调控进食、睡眠、学习记忆、情绪、社交等多种生理功能^[4-7]。5-HT 递质系统的功能失调则与多种精神障碍类疾病相关, 包括抑郁症、焦虑症和精神分裂症等^[8]。当前, 治疗抑郁症的常用药物如选择性 5-HT 再摄取抑制剂 (Selective serotonin reuptake inhibitors, SSRIs) 和单胺氧化酶抑制剂 (Monoamine oxidase inhibitor, MAOIs), 其作用机理就是通过提高突触间隙的 5-HT 浓度来治疗抑郁症^[9], 但也存在引发 5-HT 综合症的风险。另外, 长期服用此类药物, 其药效会逐渐减弱甚至导致病情恶化^[10]。由此可见, 对体内 5-HT 的生理和病理功能及其作用机制的精确认识是药物研发的基石, 而检测 5-HT 的工具对解决这些重要科学问题就显得极为重要。

目前, 传统的检测 5-HT 的方法有微透析法^[11]、荧光分光光度法^[12]和快速扫描循环伏安法 (FSCV)^[13]等, 然而这些方法具有时空分辨率较低、亲和力小、灵敏度弱等问题^[14,15], 极大的制约了对 5-HT 传递机制的认识^[16]。近年来, 新开发的可遗传编码的 5-HT 荧光探针有效的解决了这些难题。一种是加州大学 Lin Tian 和霍华德·休斯研究所 Loren L. Looger 实验室基于细菌周质结合蛋白 (Bacterial periplasmic binding proteins, PBPs) 合作开发的 iSeroSnFR 探针^[17]; 另外一种是北京大学李毓龙团队基于 G-蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR) 开发的 GRAB_{5-HT1.0} 探针^[1]。这类探针构建的基本原理是: 将循环重排的绿色荧光蛋白 (Circularly permuted green fluorescent protein, cpGFP) 与改造后的 PBPs 或 GPCR 结合^[17], 当 5-HT 与 PBPs 或 GPCR 结合后会诱导后者构象改变, 进而导致循环重排的荧光蛋白构象改变, 由此引起荧光信号强度的变化^[18,19]。借助高分辨显微成像检测荧光信号的变化来反映 5-HT 的浓度变化及动态活动^[20], 并以此开展对动物行为的生理研究^[21]。这两种荧光探针都可遗传编码, 能快速地在细胞、组织及动物体内表达, 并具有很强的分子特异性、亲和力、灵敏度、光稳定性以及时空分辨率

等优势。但两种探针各自的优势及应用限制, 科研人员如何有效选择探针为不同的科学问题服务, 国内外却鲜有报道。因此, 本研究旨在通过在培养的小鼠离体脑片和急性小鼠脑片中比较 iSeroSnFR 和 GRAB_{5-HT1.0} 两种荧光探针的表达差异, 并检测其响应外源性或内源性 5-HT 的荧光信号差异, 试图探究哪种荧光探针在小鼠脑片中可更有效地检测 5-HT 递质释放及动态变化, 从而为科研人员根据课题需要针对性地选择不同的荧光探针提供参考, 也为后续深入优化 5-HT 荧光探针和利用这一工具解析神经疾病中的递质异常提供新思路^[22]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 本文选用的是出生后第 5-7 天和第 6-8 周龄的 C57BL/6 小鼠, 分别用于离体脑片培养和急性脑切片实验。小鼠从上海斯莱克动物公司购买, 在上海交通大学医学院动物科学实验中心 (SPF 级) 饲养, 环境温度为 24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 12-12 h 光暗循环, 湿度控制在 55%, 并可自由进食和饮水。所有动物实验操作均已获得上海交通大学医学院实验动物管理委员会的许可, 完全符合《实验动物管理和使用指南》的要求。

1.1.2 荧光探针 iSeroSnFR 和 GRAB_{5-HT1.0} 两种基因编码的荧光探针和 Sindbis 病毒载体由美国弗吉尼亚大学 J. Julius Zhu 教授实验室提供, 在上海交通大学医学院完成病毒包装。

1.1.3 主要试剂及仪器 试剂: mMESSAGE mMACHINE SP6 KIT (Thermo Fisher Scientific)、HEPES (Sigma)、MEM (Sigma)、马血清 (Gibco)、Millicell-CM 膜 (Millipore); 仪器: 双光子共聚焦显微镜 FV1000 (Olympus)、PCR 仪 (BIO-RAD)、VT1200 振荡切片仪 (Leica)、皮升注射泵 (WPI)、DIGIDATA150B (AXON)、双极刺激电极 (FHC)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠离体脑片培养制备 在无菌且预冷的 HEPES-buffered Hank's 缓冲液 (pH 7.35) 中, 将 P5-P7 的小鼠海马组织剥离并切成 400 μ m 的组织片, 然后将组织片转移到 Millicell-CM 膜 (0.4 μ m 孔径) 嵌入式培养皿中, 培养皿事先置于 750 μ L MEM 培养基中 (包含 30 mM HEPES、20% 热灭活的马血清、1.4 mM 谷氨酰胺、16.25 mM D-葡萄糖、5 mM NaHCO₃、1 mM CaCl₂、2 mM MgSO₄、1 mg/mL 胰岛素和 0.012% 抗坏血

酸, pH 7.28)。培养的切片置于 35℃ 培养箱中(5% CO₂/95 O₂) , 培养 8-14 天可用于实验。

1.2.2 急性小鼠脑片制备 本研究均使用 Sindbis 病毒表达系统。将携带有 iSeroSnFR 或 GRAB_{5-HT_{1L}0} 探针基因序列的 Sindbis 病毒通过脑立体定位仪定向转染至小鼠 DRN 脑区 (AP: 4.3 mm, ML: 1.1 mm, DV: 2.9 mm)。小鼠注射病毒后 18 小时, 5% 水合氯醛按 0.1 mL/g 经腹腔注射麻醉小鼠, 然后心脏灌注 10 mL 含氧切片缓冲液(包含 110 mM 氯化胆碱、2.5 mM KCl、1 mM NaH₂PO₄、25 mM NaHCO₃、7 mM MgCl₂、25 mM 葡萄糖和 0.5 mM CaCl₂) ; 待小鼠肝脏变白后快速断头剥离全脑, 并置于预冷的(0℃-4℃) 含氧切片缓冲液中。采用 VT1200 振荡切片机制备 300 μm 厚度的冠状切片, 然后将脑片转置在 34℃ 的氧饱和缓冲液中恢复约 30-60 分钟(包括 125 mM NaCl、2.5 mM KCl、1 mM NaH₂PO₄、25 mM NaHCO₃、1.3 mM MgCl₂、25 mM 葡萄糖和 2 mM CaCl₂) , 再进行电刺激记录实验。

1.2.3 小鼠脑片电刺激诱导 5-HT 释放和荧光成像同步实验 取孵育恢复活性后的小鼠脑切片转移到记录槽中, 并将双极电极放置在切片中 iSeroSnFR 或 GRAB_{5-HT_{1L}0} 表达阳性的细胞附近, 刺激电压为 5-30 V, 每次刺激的持续时间设置为 1 ms。同

时使用 Hamamatsu ORCA-Flash4.0 相机进行荧光成像, 激发光为 460 nm, 帧率为 10 Hz。为了将图像捕获与电刺激同步, 相机设置为外部触发模式。

1.3 统计学方法

本研究使用 Image J 软件进行图像数据处理和 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。对两组样本之间的比较采用 Two-tailed Student's unpaired t-test。所有统计数据均用均值±标准误(Mean ± SEM)表示, $P < 0.05$ 认为存在显著性差异。

2 结果

2.1 GRAB_{5-HT_{1L}0} 与 iSeroSnFR 探针在培养的小鼠离体海马脑片中的荧光表达

首先我们将 iSeroSnFR 探针或 GRAB_{5-HT_{1L}0} 探针的基因序列插入到 Sindbis 病毒表达载体(图 1 A), 并把病毒通过玻璃微电极转染到海马 CA1 区, 然后进行荧光成像观察两种探针在 CA1 神经元的表达差异(图 1 B)。结果显示, 在转染 iSeroSnFR 的海马 CA1 区神经元中均有荧光表达, 但细胞轮廓模糊, 边界不清晰; 而转染了 GRAB_{5-HT_{1L}0} 的神经元细胞膜上表达有强烈的绿色荧光信号(图 1 C 和 D)。

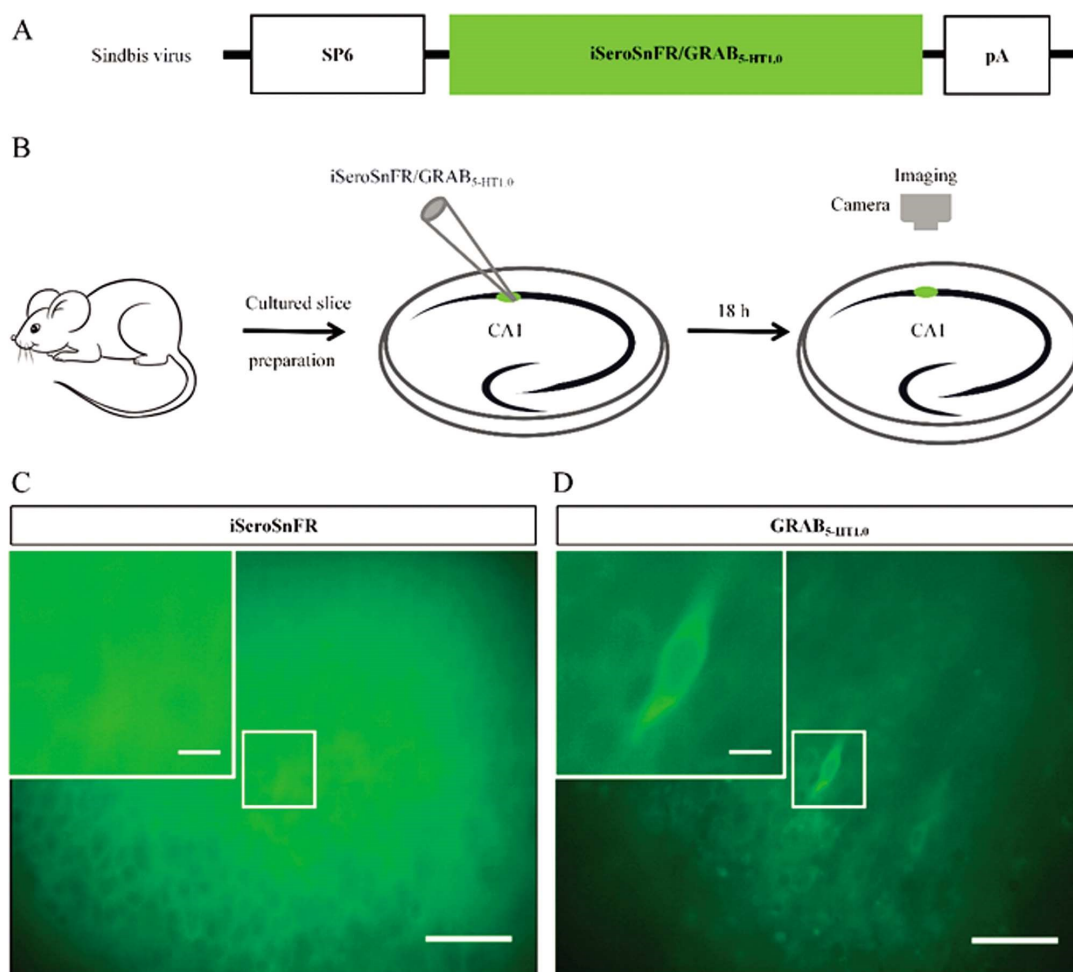


图 1 比较 iSeroSnFR 与 GRAB_{5-HT_{1L}0} 在培养的小鼠海马 CA1 神经元中的荧光表达

Fig.1 Comparing the expression levels of iSeroSnFR and GRAB_{5-HT_{1L}0} sensor in CA1 pyramidal neurons of cultured mouse hippocampal slices.

Note: (A) Schematic diagram depicting the expression of iSeroSnFR or GRAB_{5-HT_{1L}0} sensor within Sindbis viral vector; (B) Schematic drawing outlines the design of imaging experiments in CA1 pyramidal neurons in cultured mouse hippocampal slices; (C and D) Snapshots of iSeroSnFR and GRAB_{5-HT_{1L}0} expressing CA1 pyramidal neurons. Scale bar, 10 μm in C or D's upper left and lower right, respectively.

2.2 iSeroSnFR 与 GRAB_{5-HT1.0} 探针在培养的小鼠离体海马脑片 CA1 神经元中对外源性 5-HT 的荧光反应差异

接下来,为了评估两种荧光探针在培养的小鼠脑片海马 CA1 神经元中能否实时灵敏地响应外源性的 5-HT。于是,我们分别在转染了两种探针的神经元附近给与 1 μ M 或 1 mM 的 5-HT 药物处理,然后检测它们产生的荧光响应($\Delta F/F_0$) (图 2 A)。结果显示,用 1 μ M 5-HT 处理时,iSeroSnFR 探针未产生明显的荧光变化;而 GRAB_{5-HT1.0} 探针的荧光响应约为 8.42%

($\Delta F/F_0$);并且 GRAB_{5-HT1.0} 的 $\Delta F/F_0$ 几乎是 iSeroSnFR 的 13 倍(图 2 B 和 C);增加药物浓度到 1 mM 5-HT 时,iSeroSnFR 探针的响应幅度上升约 3.57%($\Delta F/F_0$),而 GRAB_{5-HT1.0} 探针的响应幅度约为 6.14%($\Delta F/F_0$),为 iSeroSnFR 探针的 1.5 倍(图 2 B 和 C)。以上结果表明,相对于 iSeroSnFR 探针,GRAB_{5-HT1.0} 探针在培养的小鼠海马脑片 CA1 神经元中能更加灵敏地响应外源性 5-HT。

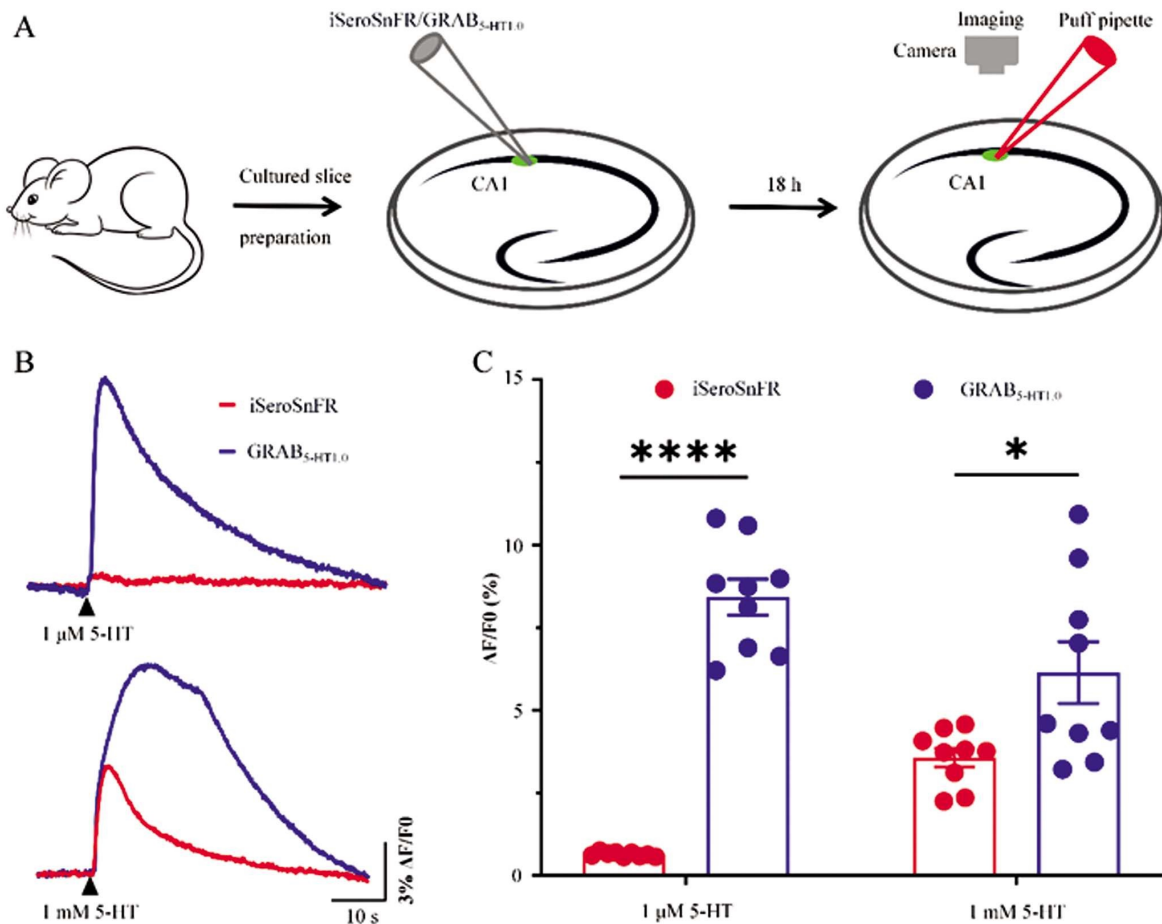


图 2 比较 iSeroSnFR 与 GRAB_{5-HT1.0} 两类探针在培养的小鼠脑片海马 CA1 神经元中响应外源性 5-HT 药物产生荧光信号的差异

Fig.2 Comparison of the fluorescence changes between iSeroSnFR and GRAB_{5-HT1.0} sensor in response to puffed 5-HT

in CA1 pyramidal neurons of cultured mouse hippocampal slices

Note: (A) Schematic drawing illustrates the design of imaging experiments in CA1 pyramidal neurons in cultured mouse hippocampal slices;

(B) Fluorescence responses of iSeroSnFR and GRAB_{5-HT1.0} expressing CA1 pyramidal neurons to a brief puff of 1 μ M and 1 mM 5-HT, respectively;

(C) Values for the fluorescence responses of iSeroSnFR(red) and GRAB_{5-HT1.0}(blue) expressing CA1 pyramidal neurons to the application of 1 μ M and 1 mM 5-HT, respectively. Data in (C) were shown as Mean $\pm$ SEM, $\Delta F/F_0$ of iSeroSnFR- and GRAB_{5-HT1.0}-expressing hippocampal CA1 pyramidal neurons to 5-HT drug application (1 μ M 5-HT-iSeroSnFR: 0.64% $\pm$ 0.02%; 1 μ M 5-HT-GRAB_{5-HT1.0}: 8.42% $\pm$ 0.55%; 1 mM 5-HT-iSeroSnFR: 3.57% $\pm$ 0.28%; 1 mM 5-HT-GRAB_{5-HT1.0}: 6.14% $\pm$ 0.94%). n = 9, ****P < 0.0001, * P = 0.0181. Two-tailed Student's unpaired t-test.

2.3 iSeroSnFR 与 GRAB_{5-HT1.0} 探针在急性小鼠脑片 DRN 神经元中对内源性 5-HT 的荧光反应差异

最后,为了进一步探究两种探针是否也能够灵敏地检测内源性释放的 5-HT,我们将携带有 iSeroSnFR 或 GRAB_{5-HT1.0} 的 Sindbis 病毒通过脑立体定位仪转染到小鼠五羟色胺能神经元集中的脑区 DRN(图 3 A),表达 18 h 后制备急性小鼠脑片。为了诱导内源性 5-HT 释放,我们在小鼠 DRN 脑区表达有阳性

探针的神经元附近给与 20 个频率为 64 Hz 电脉冲刺激,同时通过荧光成像观察两种探针产生的荧光反应。结果显示,仅在表达 GRAB_{5-HT1.0} 探针的 DRN 神经元中观察到显著增强的荧光反应, $\Delta F/F_0$ 约为 3.46%;而 iSeroSnFR 的 $\Delta F/F_0$ 仅约为 0.37%,几乎未产生明显的荧光变化(图 3 B 和 C)。以上结果初步表明,GRAB_{5-HT1.0} 探针能更灵敏的响应电刺激诱导的内源性 5-HT 信号变化。

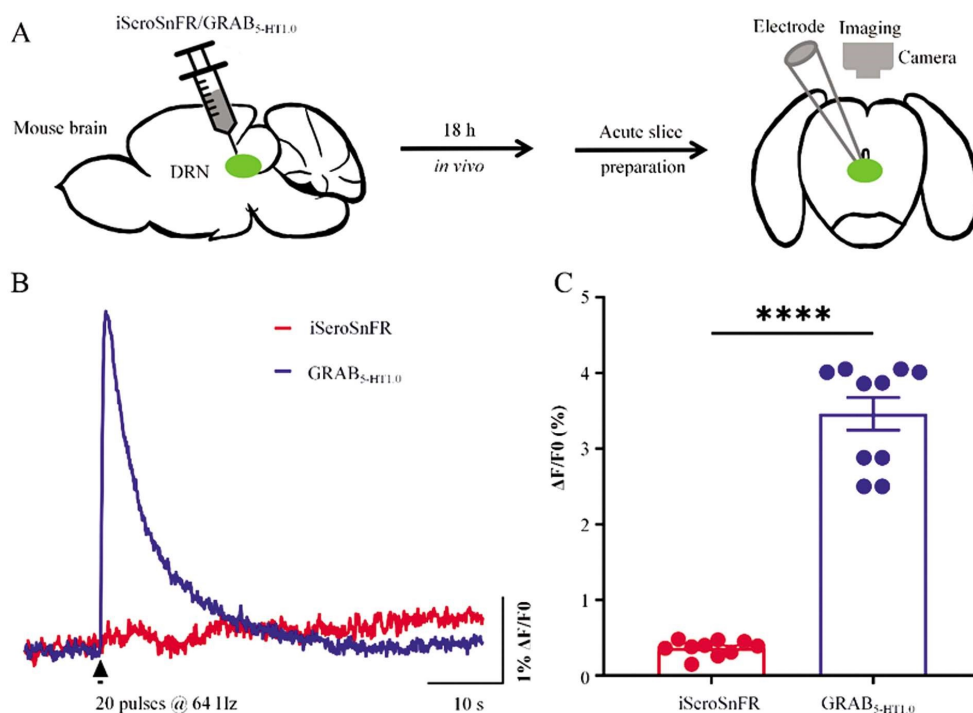


图3 比较 iSeroSnFR 与 GRAB_{5-HT1.0} 两类探针在急性小鼠脑片 DRN 神经元响应电刺激诱导内源 5-HT 释放产生荧光信号的差异
Fig.3 Comparison of the fluorescence changes between iSeroSnFR and GRAB_{5-HT1.0} sensor to electrically induced endogenous 5-HT release in the mouse DRN neurons

Note: (A) Schematic drawing shows the design of stimulation-imaging experiments using *an in vivo* viral expression and *ex vivo* acute mouse DRN slice preparation; (B) Representative traces of the changes in iSeroSnFR and GRAB_{5-HT1.0} fluorescence in response to electrical stimulation; (C) Comparing the fluorescence response in the mouse DRN neurons expressing iSeroSnFR (red) and GRAB_{5-HT1.0} (blue). Data in (C) were shown as Mean $\pm$ SEM, $\Delta F/F_0$ of iSeroSnFR- and GRAB_{5-HT1.0}-expressing DRN neurons to electrical stimuli-evoked 5-HT release (iSeroSnFR: $0.37\% \pm 0.03\%$; GRAB_{5-HT1.0}: $3.46\% \pm 0.21\%$). $n = 10$, **** $P < 0.0001$.

Two-tailed Student's unpaired t-test.

3 讨论

本研究利用携带有 iSeroSnFR 探针或 GRAB_{5-HT1.0} 探针基因的 Sindbis 病毒载体, 分别转染到培养的小鼠离体脑片的海马 CA1 区, 研究发现在表达 iSeroSnFR 探针的海马脑片 CA1 区神经元中均有荧光表达, 但细胞边界不清晰; 而转染了 GRAB_{5-HT1.0} 的神经元细胞膜上表达有清晰且强烈的绿色荧光信号。用低浓度 5-HT 处理培养的小鼠离体脑片海马 CA1 神经元, iSeroSnFR 探针没有产生明显的荧光强度变化; 而 GRAB_{5-HT1.0} 探针产生的荧光反应显著增强; 当用高浓度 5-HT 处理时, iSeroSnFR 探针可以产生一定强度的荧光反应, 但响应幅度弱于 GRAB_{5-HT1.0} 探针。另外, 我们将病毒转染到急性小鼠脑片 DRN 区, 通过电刺激诱导内源 5-HT 的释放, 结果显示仅在表达 GRAB_{5-HT1.0} 探针的 DRN 神经元中观察到显著增强的荧光反应; 而 iSeroSnFR 几乎未产生明显增强的荧光变化。

研究表明, 基于细菌 PBP 和 GPCR 为结构基础构建的神经递质荧光探针, 各有利弊。其中, iSeroSnFR 探针以细菌 PBP 作为结构基础, 而细菌 PBP 种类繁多, 可以与多种神经递质结合, 如 5-HT^[1]、乙酰胆碱^[18]、谷氨酸^[23]等。因此, 细菌 PBP 为检测神经递质探针的开发和神经类疾病精准靶向药物的研发提供了良好的先决条件。但并非所有的神经递质都有与之结合的 PBP。此外 PBP 来自细菌中, 将其应用在真核生物中, 容易出

现定位不精确, 造成特异性低和反应延迟、亲和力低甚至是异常表达。这可能解释了在本研究中, 通过小鼠离体脑片培养实验, iSeroSnFR 探针荧光表达边界不清、对外源性 5-HT 药物的响应灵敏度较弱的现象。

而 GRAB_{5-HT1.0} 探针是基于 GPCR 构建, 在检测神经递质方面具有较大的优势, 一方面它是真核生物体中天然的内源性受体^[24], 具有调控真核生物体内信号转导功能^[25]; 另一方面, 多种神经递质都有其对应的 GPCR 受体^[22, 26], 从而确保了神经递质可以高选择性、高亲和力与之结合, 不易出现蛋白异常表达或者蛋白错误修饰的问题。这可能解释了本研究中, 在培养的小鼠离体脑片及急性脑片实验中, GRAB_{5-HT1.0} 探针在神经元的表达比较特异且能够灵敏地响应外源性及内源性 5-HT。此外, GRAB_{5-HT1.0} 探针对于高浓度外源性 5-HT 的响应幅度减弱, 推测可能是由于 GRAB_{5-HT1.0} 探针达到了饱和状态^[27]。这与先前的研究报道相一致, GRAB_{5-HT1.0} 探针可以有效检测细胞中的 5-HT 释放^[1], 虽然 iSeroSnFR 探针可以检测到内源性 5-HT^[28], 然而其灵敏度较弱, 推测其原因可能是 GRAB_{5-HT1.0} 探针的动力学与内源性释放 5-HT 的动力学更相似^[29]。但也有研究表明, 在内嗅皮层上对 GCh2.0 和 iAChSnFR 两类乙酰胆碱的探针进行性能比较, 表明 iAChSnFR 探针能够更好地追踪胆碱能信号^[18, 29]。由此可见, 神经递质的作用效率也可能与神经递质的种类有关。

尽管基于 GPCR 构建的神经递质探针能够灵敏地追踪神

经递质的传递。但这些探针通常易于与抗精神疾病类药物大分子相互识别^[30],因此难以与相关药物相结合进行疾病研究。然而,最近来自加州大学 David E. Olson 和 Lin Tian 实验室基于 5-HT_{2A} 受体合作开发的 psychLight 探针;可直接检测由多种致幻剂激活 5-HT_{2A} 受体的构象变化,进而研究致幻剂的作用机制^[27]。此外,细菌 PBP 很少与宿主蛋白的相关药物结合,具有可溶性,易定位到亚细胞位置,因此,基于其设计的探针在药物筛选和神经递质传递机制研究中具有巨大优势。

综上所述,以细菌 PBP 或 GPCR 为骨架开发的探针,将会是一种精确解析神经递质生理功能及作用机制的有效工具。但是探针的骨架来源、神经递质的种类以及宿主相关蛋白药物的亲和性等因素都可能会影响探针的检测效率,这将为科研人员根据课题需要针对性地选择不同基因编码的荧光探针提供参考,同时为未来解析神经疾病中的递质异常提供新思路。

参考文献(References)

- [1] Wan J, Peng W, Li X, et al. A genetically encoded sensor for measuring serotonin dynamics [J]. *Nature Neuroscience*, 2021, 24(5): 746-752
- [2] Buhot M-C. Serotonin receptors in cognitive behaviors [J]. *Current opinion in neurobiology*, 1997, 7(2): 243-254
- [3] Berger M, Gray J A, Roth B L. The expanded biology of serotonin [J]. *Annual review of medicine*, 2009, 60: 355-366
- [4] Ishimura K, Takeuchi Y, Fujiwara K, et al. Quantitative analysis of the distribution of serotonin-immunoreactive cell bodies in the mouse brain [J]. *Neuroscience letters*, 1988, 91(3): 265-270
- [5] Tanzer J R, Weyandt L. Imaging happiness: Meta analysis and review [J]. *Journal of Happiness Studies*, 2020, 21(7): 2693-2734
- [6] Rubin A N, Espiridon E D, Kattan M, et al. Serotonin Syndrome with Atypical Hypernatremia[J]. *Cureus*, 2018, 10(11): e3616
- [7] Okaty B W, Commons K G, Dymecki S M. Embracing diversity in the 5-HT neuronal system [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2019, 20(7): 397-424
- [8] Lin S-H, Lee L-T, Yang Y K. Serotonin and mental disorders: a concise review on molecular neuroimaging evidence [J]. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 2014, 12(3): 196
- [9] Yohn C N, Gergues M M, Samuels B A. The role of 5-HT receptors in depression [J]. *Molecular brain*, 2017, 10(1): 1-12
- [10] Volpi-Abadie J, Kaye A M, Kaye A D. Serotonin syndrome [J]. *Ochsner Journal*, 2013, 13(4): 533-540
- [11] Zestos A G, Kennedy R T. Microdialysis coupled with LC-MS/MS for in vivo neurochemical monitoring [J]. *The AAPS journal*, 2017, 19(5): 1284-1293
- [12] Meng H, Wang Y, Huang M, et al. Chronic deep brain stimulation of the lateral habenula nucleus in a rat model of depression [J]. *Brain research*, 2011, 1422: 32-38
- [13] Abdalla A, Atcherley C W, Pathirathna P, et al. In vivo ambient serotonin measurements at carbon-fiber microelectrodes [J]. *Analytical chemistry*, 2017, 89(18): 9703-9711
- [14] Bunin M A, Prioleau C, Mailman R, et al. Release and uptake rates of 5 hydroxytryptamine in the dorsal raphe and substantia nigra reticulata of the rat brain [J]. *Journal of neurochemistry*, 1998, 70(3): 1077-1087
- [15] Candelario J, Chachisvilis M. Mechanical stress stimulates conformational changes in 5-hydroxytryptamine receptor 1B in bone cells[J]. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2012, 5(3): 277-286
- [16] Fuller R W. Uptake inhibitors increase extracellular serotonin concentration measured by brain microdialysis [J]. *Life sciences*, 1994, 55(3): 163-167
- [17] Unger E K, Keller J P, Altermatt M, et al. Directed evolution of a selective and sensitive serotonin sensor via machine learning[J]. *Cell*, 2020, 183(7): 1986-2002. e1926
- [18] Borden P, Zhang P, Shivange A, et al. A fast genetically encoded fluorescent sensor for faithful in vivo acetylcholine detection in mice, fish, worms and flies. *bioRxiv* [J]. Preprint, 2020, 10 (2020.02): 07.939504
- [19] Jing M, Zhang P, Wang G, et al. A genetically encoded fluorescent acetylcholine indicator for in vitro and in vivo studies [J]. *Nature biotechnology*, 2018, 36(8): 726-737
- [20] 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. e419
- [21] Patriarchi T, Cho J R, Merten K, et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors [J]. *Science*, 2018, 360(6396): eaat4422
- [22] Lin L, Gupta S, Zheng W S, et al. Genetically encoded sensors enable micro-and nano-scopic decoding of transmission in healthy and diseased brains[J]. *Molecular Psychiatry*, 2021, 26(2): 443-455
- [23] Marvin J S, Borghuis B G, Tian L, et al. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission[J]. *Nature methods*, 2013, 10(2): 162-170
- [24] Wacker D, Stevens R C, Roth B L. How ligands illuminate GPCR molecular pharmacology[J]. *Cell*, 2017, 170(3): 414-427
- [25] Trzaskowski B, Latek D, Yuan S, et al. Action of molecular switches in GPCRs-theoretical and experimental studies [J]. *Current medicinal chemistry*, 2012, 19(8): 1090-1109
- [26] Krishnan A, Almén M S, Fredriksson R, et al. Remarkable similarities between the hemichordate (*Saccoglossus kowalevskii*) and vertebrate GPCR repertoire [J]. *Gene*, 2013, 526(2): 122-133
- [27] Dong C, Ly C, Dunlap L E, et al. Psychedelic-inspired drug discovery using an engineered biosensor [J]. *Cell*, 2021, 184 (10): 2779-2792. e2718
- [28] Feng J, Zhang C, Lischinsky J E, et al. A genetically encoded fluorescent sensor for rapid and specific in vivo detection of norepinephrine [J]. *Neuron*, 2019, 102(4): 745-761. e748
- [29] Zhu P K, Zheng W S, Zhang P, et al. Nanoscopic visualization of restricted nonvolume cholinergic and monoaminergic transmission with genetically encoded sensors [J]. *Nano letters*, 2020, 20(6): 4073-4083
- [30] Marvin J S, Schreiter E R, Echevarría I M, et al. A genetically encoded, high signal to noise maltose sensor [J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2011, 79(11): 3025-3036