

综述

脑内多巴胺信号动态变化的检测方法及在成瘾研究中的应用

顾 钧, 谢小虎, 符 丹, 李龙辉, 陈为升, 刘惠芬, 周文华*

(宁波大学附属康宁医院精神科, 宁波市康宁医院精神科, 浙江省戒毒研究重点实验室, 宁波 315201)

摘要: 多巴胺是脑内重要的神经递质, 中脑多巴胺系统在控制奖赏、动机、运动和情绪调节过程中起重要作用。脑内多巴胺功能紊乱与药物依赖、精神分裂症、抑郁症和帕金森氏病等神经精神障碍有关, 动态测定脑内多巴胺变化对于了解多巴胺功能和揭示相关疾病病理机制具有重要意义。本文主要介绍了微透析、快速扫描循环伏安法和光纤光度法的基本原理和方法, 并对比分析了这些技术在多巴胺动态检测应用中的优缺点。以药物成瘾研究为应用实例, 利用微透析法发现伏隔核壳部是成瘾性药物产生奖赏效应的关键部位, 快速扫描循环伏安法检测到与可卡因自身给药行为相关的三种多巴胺信号模式, 而光纤光度法则揭示了酒精成瘾和复吸过程中伏隔核和中脑复侧被盖区多巴胺活动特征存在空间和时间上的多样性。这些发现为揭示药物成瘾的机制做出了重要贡献。

关键词: 多巴胺; 成瘾; 微透析; 快速扫描循环伏安法; 光纤光度法

Methods for measuring the dynamic changes of dopamine in the brain and their application in addiction research

GU Jun, XIE Xiaohu, FU Dan, LI Longhui, CHEN Weisheng, LIU Huifen, ZHOU Wenhua*

(Department of Psychiatry, Affiliated Kangning Hospital of Ningbo University, Ningbo Kangning Hospital, Zhejiang Province Key Laboratory of Addiction Research, Ningbo 315201, China)

Abstract: Dopamine is an important neurotransmitter in the brain, and the midbrain dopamine system plays an important role in controlling reward, motivation, locomotion, and emotional regulation. The dysfunction of dopamine system in the brain is associated with neuropsychiatric disorders such as drug dependence, schizophrenia, depression, and Parkinson's disease. Dynamic measurement of dopamine changes in the brain is of great significance for understanding dopamine function and revealing the pathological mechanisms of related diseases. This review mainly introduces the basic principles and methods of microdialysis, fast scan cyclic voltammetry, and fiber photometry, and compares and analyzes the advantages and disadvantages of these techniques in dopamine dynamic detection applications. Taking drug addiction research as an application example, microdialysis has discovered that the shell of the nucleus accumbens is a key site for the reward effect of addictive drugs. Fast scan cyclic voltammetry has detected three dopamine signal patterns related to cocaine self-administration behavior, while fiber photometry has revealed the spatial and temporal diversity of dopamine activity in the nucleus accumbens and the ventral tegmental area during alcohol addiction and relapse. These findings make an important contribution to unraveling the mechanisms of drug addiction.

收稿日期: 2023-09-08

基金项目: 国家重点研发计划项目(200YFC3300905); 国家自然科学基金面上项目(82071499)

第一作者: E-mail: jun_nimh@126.com

*通信作者: E-mail: whzhou@vip.163.com

Key Words: dopamine; addiction; microdialysis; fast scan cyclic voltammetry; fiber photometry

药物依赖、精神分裂症、抑郁症和帕金森氏症等神经和精神障碍是严重危害人类健康的疾病。这类疾病虽然在诊断上取得了进步,但在治疗上仍然缺乏强效药物。脑内多巴胺(dopamine, DA)神经传导异常在这些疾病中起着至关重要的作用^[1-3]。中脑DA系统主要由两条具有不同功能的神经通路组成。黑质纹状体通路起源于黑质致密部的DA神经元,投射到背侧纹状体,其作用主要与运动控制有关。中脑边缘通路主要由腹侧被盖区(ventral tegmental area, VTA)的DA神经元胞体组成,并投射到腹侧纹状体,该区域也称为伏隔核(nucleus accumbens, NAc)。这条通路在控制奖赏、动机和情绪调节过程中起关键作用^[4]。中脑DA神经元具有两种电活动模式——紧张性和位相性放电,这两种独特的放电模式在脑内起不同作用^[5]。紧张性活动是DA神经元以大约5 Hz的低频率自发性放电,这对维持脑内稳定的DA基础浓度起了重要作用。另一方面,DA能神经元在超过20 Hz的频率下爆发式放电会导致脑DA浓度短暂的大量增加,位相性放电作用在于个体在行为执行过程中建立环境刺激和奖赏之间的联系,并对此形成长期记忆^[6]。了解脑内DA神经系统正常生理功能以及与神经精神疾病相关的DA神经传递病理机制,需要观察DA神经活动在不同时间和空间的动态变化与个体行为的关系。过去几十年,研究神经递质释放功能的方法已经从体外测量组织中的神经递质含量发展到在体神经化学和脑成像检测技术。最近,研究人员开发了一种基于G蛋白偶联受体构建的基因编码DA生物传感器。这种传感器的特点在于其高分子特异性、高亲和力和高时空分辨率。当其与体内成像技术(如光纤记录、双光子显微镜等)结合使用时,有望彻底改变当前脑内DA测定方法的现状,并为脑内DA功能研究做出巨大贡献^[7]。

本文主要介绍目前常用的脑内DA动态变化检测方法,重点介绍微透析、快速扫描循环伏安法(fast scan cyclic voltammetry, FSCV)和光纤光度法技术原理、方法以及在药物成瘾领域的应用,并

对这些技术在DA动态检测应用方面的优势和缺点进行分析和比较。

1 微透析

脑微透析是一种用于收集和测定特定脑区的透析液中神经递质含量的实验方法^[8]。微透析系统由微量注射泵、微透析探针、透析液收集系统等组成。使用立体定向仪将微透析探针植入脑内特定核团,微量注射泵与探针一端的管路连接,灌流液以1~5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度缓慢通过半透膜,然后另一端的探针与另一根管路连接,以收集微透析样品。微透析的原理在于探针的透析膜内外存在化学物质浓度的梯度,当浓度高的一侧物质通过被动扩散进入透析膜的另一侧时,脑内的小分子物质(包括神经递质)就会扩散到透析管中。透析样品中的神经递质含量可以通过多种检测方法(如高效液相色谱法、放射免疫分析法、质谱法等)进行测定^[9,10]。透析膜由半透膜材料制成,这些材料具有一定的选择性,可以允许特定大小、相对分子质量或电荷的分子通过,而阻止其他较大或带电的分子通过。常见的透析膜材料包括纤维素、聚酰胺、聚醚砜等半透膜,这些材质生物兼容性较好,已在实验中得到广泛应用。选择合适的透析探针对于确保实验的准确性和可靠性至关重要。透析探针膜的长度应根据目标核团的解剖结构进行选择,尺寸太长可能引起实验结果不准确,尺寸太短可能导致透析效果不佳。对于大鼠实验,膜长2 mm的探针可用于Nac,而背侧纹状体可用4 mm的探针。透析膜的截留相对分子质量决定了透析探针对分子的选择性,透析膜通常有一个标准的截留相对分子质量,如10 000、30 000等。选择透析膜时,应查看技术说明书以了解对于特定分子大小的透析效果。如果目标分子较小,选择截留量较小的膜;相反,如果较大,则选择截留量较高的膜。不同材质的探针对目标分子的回收率影响是不同的,因此不建议在同一个批次实验中使用不同材质的探针。此外,选择合适的微透析灌流液对实验的成功与否也起着重要的作用。

灌流液通常由与细胞外液离子成分和pH值相近的人工脑脊液配制而成。需要注意的是,灌流液中 Ca^{2+} 浓度的微小差异会对基础神经递质水平产生显著影响,而稍许提高灌流液中的 K^{+} 浓度则可能诱导神经元释放神经递质。微透析的优点在于可以应用于自由活动动物中,另外透析膜可阻止大分子蛋白质物质进入透析管,可以直接在色谱柱进样测定细胞外液中包括DA在内的多种化学物质含量,色谱测定具有很高的分析灵敏度和化学选择性。此外,也可以通过反向微透析法把药物传输到特定的核团,用来研究药物在特定神经环路的作用。微透析的缺点在于由于微透析样品收集时间过长(通常为5~15 min),微透析的时间分辨率相对较低;另一缺点是微透析探针植入过程中可产生脑组织水肿、损伤和炎症反应,进而影响探针周围脑组织微环境。过去二十多年,微透析技术一直是测定脑内DA变化的主流实验手段,微透析技术通常用于在体检测脑内紧张性DA水平以及观察药物处理后的DA水平变化。

1.1 成瘾性药物优先增加NAc壳细胞外DA水平

NAc是中脑DA奖赏系统的主要输入结构,它整合来自皮层和边缘系统的信息,参与调节目标导向的行为,在解剖上NAc可以分为两个亚区:核部和壳部。研究发现,NAc核部和壳部在药物成瘾过程中起不同作用,成瘾性药物优先增加壳部的细胞外DA水平^[11]。将微透析探针分别植入大鼠的NAc壳和核,观察静脉注射低剂量和高剂量的可卡因、苯丙胺和吗啡对自由活动大鼠NAc壳和核细胞外DA浓度的影响。0.2 mg/kg和0.4 mg/kg的嗎啡和0.5 mg/kg的可卡因仅增加了NAc壳中的细胞外DA。高剂量的可卡因(1.0 mg/kg)和低剂量的苯丙胺(0.125 mg/kg)同时增加了壳和核部中的细胞外DA。但与核部相比,壳中的DA增加更明显。只有高剂量的苯丙胺才能在同等程度上增加壳和核部的细胞外DA^[11]。另一项研究使用微透析法观察了海洛因自身给药的大鼠和被动给药的大鼠在连续给药后NAc壳和核DA的变化,发现了类似的结果^[12]。自身给药大鼠NAc壳中DA优先增加,从第一次给海洛因后NAc壳DA增加112%,在整个4周自身给药周期内NAc壳DA增加130%~140%。被动给药大鼠在第一次给海洛因时观察到壳中DA的优

先增加,但增加幅度较少仅为60%,在4周被动给药过程中NAc核的DA水平逐渐从25%增加到118%,NAc壳与核NAc核中DA浓度比例倒置^[12]。这些结果表明,NAc内存在功能分区,NAc壳部是成瘾性药物优先作用靶点,主动给药和被动给药在NAc壳和核部产生不同神经适应性变化。

1.2 药物行为敏化、戒断反应与脑内DA释放关系

个体在成瘾性药物反复暴露后产生行为敏化,这可能与脑内DA神经系统可塑性变化导致觅药行为动机增强有关^[13]。目前,还存在关于脑内DA过高还是过低导致成瘾的争论:一种理论认为,使用成瘾性药物会减少DA的神经传递,导致脑内DA功能低下,从而鼓励服用更多的药物来弥补DA缺乏;另一种理论认为,使用药物会增加脑内DA神经传递,导致对药物和药物线索的高反应性^[14]。长期阿片类药物暴露会导致DA系统功能下调,戒断反应是成瘾性药物停药后产生的躯体和精神症状,表现为颤抖、出汗、焦虑、食欲下降、烦躁不安、睡眠困难、情绪低落等不适反应,为了逃避这些症状,患者通过负性强化过程导致持续性药物复吸行为。戒断与中脑边缘DA功能的降低有关。微透析实验发现,实验动物在成瘾性药物(如可卡因、乙醇、吗啡和苯丙胺等)戒断后,NAc中的紧张性DA浓度降低^[15]。另有证据表明,VTA DA神经元的形态缩小和放电频率在戒断期间降低^[16,17]。使用微透析方法,对重复吗啡处理后纹状体的DA神经传递变化进行了研究。通过剂量递增法建立大鼠吗啡行为敏化模型,并在停药一段时间后,用低剂量吗啡激发大鼠的行为反应。同时,通过微透析监测DA的水平。实验发现,与对照大鼠相比,反复给予吗啡后会产生强烈的行为敏化,同时NAc核部和背侧纹状体DA含量增加,但NAc壳中DA含量减少^[18]。另一项研究使用在体微透析技术比较了长时程可卡因自身给药和间歇性可卡因自身给药大鼠在NAc DA释放和产生成瘾行为方面的差异。研究发现,长期接触可卡因降低了NAc的DA神经传递,而间歇性接触可卡因则使脑内DA神经传递增强。间歇性接触可卡因体验在产生成瘾相关行为方面比长时程接触可卡因更有效,间歇性接触可卡因大鼠的高动机状态与NAc高DA反应有关^[19]。这些结果支持NAc DA能系统

增敏在个体从娱乐性用药到强迫性觅药行为转化过程中起重要作用。

2 FSCV

FSCV是一种电化学检测技术,可以用来测定脑内一些具有电化学生活性的物质(如DA、肾上腺素、去甲肾上腺素和5-羟色胺等神经递质)^[20,21]。FSCV可实时、高时间分辨率地测量脑内DA动态变化。FSCV仪器装置通常由电化学电极、电位控制、电流测量、数据采集和软件分析系统组成。电位控制系统可产生循环伏安波形,即电位在一个很短的时间内以较高速度从一个值变化到另一个值。电流测量系统记录在氧化还原反应中产生的电流变化。在将碳纤维微电极植入脑内核团后,FSCV通过在电极上施加循环伏安波形,促使待测分子在电极表面发生氧化还原反应,同时产生电流。这个电流的大小与待测分子的浓度成正比。通过记录电流与时间的变化,可以获取与目标分子浓度变化相关的电流信号。对于DA测定,一般采用快速扫描速率(400 V/s),电极上施加三角波(通常为-0.4~1 V),不同的化合物在不同的电压下产生氧化和还原电流,采集速率通常设置为10 Hz^[20]。在阳极扫描过程中,多巴胺氧化为多巴胺醌,氧化峰值出现在约0.6 V,在阴极扫描过程中从多巴胺醌还原为多巴胺,峰值还原发生在约-0.2 V,根据电流和施加电压关系可绘制循环伏安图^[21]。由于每一个化合物都具有独特的循环伏安图,循环伏安图被视为鉴定化合物的指纹。FSCV实验得到的混合电流数据包含了与被测物质相关的电流信号,通过循环伏安图对DA类物质进行定性,然后通过检测电流信号来获得DA浓度变化信息。FSCV在评估脑内DA动态方面具有一些优势:FSCV具有毫秒级的时间分辨率,同时提供了详细的脑内DA释放和清除动力学的动态信息;FSCV能够捕捉与瞬态事件和DA信号相关的快速变化,有助于了解DA在动机行为中的作用;FSCV无需采集样品可直接在电极表面测量DA,可实时检测DA释放和清除率。但是FSCV在灵敏度和选择性方面有一些不足,它只能检测纳摩尔及以上的DA浓度。由于DA和去甲肾上腺素的循环伏安图几乎相同,FSCV事实上很难区分这两种化学物质,因

此FSCV仅适用于检测NAc、纹状体、内侧前额叶皮层和嗅结节等DA含量高的脑区。FSCV方法适合检测亚秒级DA位相性活动,已被广泛用于动物行为实验研究,且更多地用于探索脑内DA的释放与动物行为关系^[22]。有研究同时用微透析和FSCV方法观察大鼠在注射选择性DA摄取抑制剂GBR12909后纹状体DA动态的变化,并将FSCV数据与微透析获得的数据进行了对比。这两种技术都检测到DA的变化,而且这些变化与GBR12909诱导的行为效应的动力学相关,但与微透析结果相比,FSCV检测到的DA水平变化的时间过程与行为变化更为密切^[23]。

2.1 可卡因自身给药不同阶段DA位相性变化

用FSCV方法研究发现,可卡因自身给药大鼠在得到可卡因相关线索后,在VTA到NAc投射区记录到DA瞬变,表现为以毫秒时间范围释放DA^[24]。另外发现,对于可卡因自身给药大鼠在杠杆按压行为反应前、后,可以观察到两种不同的信号:杠杆按压反应前和反应后DA瞬变^[24,25]。NAc中的位相性DA信号在可卡因自身给药的维持期、消退期和恢复期的不同阶段起不同的作用,杠杆按压行为发生前DA瞬变在振幅上是可变的,但持续存在于自身给药行为的全过程。相反,杠杆按压行为发生后DA瞬变在维持阶段是稳定的,在消退期间其振幅逐渐降低,并且在自身给药恢复期间与杠杆按压反应重新建立关联。因此,反应前和反应后DA瞬变在NAc中具有不同的功能,按压杆之前的瞬变促进了药物的目标导向行为或觅药行为,反应后的DA瞬变可能编码药物相关刺激和可卡因之间的习得关联。另外,还发现了第三种DA信号模式,即自发DA瞬变频率变化。自发DA瞬变频率在自身给药消退期间下降,在恢复期间重新出现。这些自发DA瞬变与脑内可卡因浓度有很好的相关性,与杠杆按压行为反应前和反应后的DA瞬变没有关联^[25]。这些结果表明,在可卡因自身给药不同阶段的DA瞬变具有高度可塑性,它受动机、环境相关线索以及可卡因本身药理作用调控,因此DA瞬变在介导觅药行为的动机和药物奖赏强化中起着至关重要的作用。

2.2 性别差异与药物成瘾易感性

药物成瘾在易感性上存在性别差异^[26]。雌激素

可以影响实验动物对药物的反应。在给母鼠注射雌激素后, 它们更容易对可卡因产生成瘾行为。这表明雌激素对于药物奖赏系统的调节起到重要作用^[27]。此外, 雌性大鼠在戒断药物后更容易出现应激和焦虑的行为, 而这些行为可能与药物成瘾的复吸有关, 表明动物在停药后可能更容易复吸, 并寻求再度使用药物来缓解焦虑和应激^[28]。研究发现, 雌性大鼠更容易受到海洛因的影响, 该研究评估了雌性和雄性大鼠在海洛因自身给药行为获得、觅药行为、剂量-反应曲线和用药量等方面的性别差异^[29]。与雄性大鼠相比, 雌性大鼠表现出对海洛因的反应和摄入量增加, 以及在长时程自身给药过程中海洛因的总摄入量增加, 海洛因的剂量-反应曲线出现位移。用FSCV测量NAc壳DA动力学的研究发现, 雌性大鼠在位相性放电模式下, NAc壳DA释放显著增加, 而雄性大鼠没有差异^[29]。但在紧张性放电模式下雌性和雄性大鼠NAc壳中DA释放都没有差异^[29]。这些结果表明, 雌性大鼠DA神经发生适应性改变, 可能是雌性大鼠海洛因自身给药行为增加的原因, 药物成瘾易感性与DA位相性放电存在性别差异有关。

2.3 丁丙诺啡治疗海洛因成瘾脱毒机制

阿片类药物被认为通过作用于抑制性GABA神经元 μ 阿片受体来间接激活中脑DA神经元^[30]。海洛因的奖赏和强化作用被认为是由其增加NAc壳中DA释放介导的。丁丙诺啡是 μ 阿片受体的部分激动剂, 而海洛因是完全激动剂。临床上丁丙诺啡用于海洛因脱毒治疗, 其机制可能与脑内能产生稳定水平的 μ 阿片类受体激活有关。有研究用FSCV比较单独使用海洛因或丁丙诺啡以及二者合用对自由活动大鼠NAc壳中的DA释放的影响。实验发现, 与海洛因相比, 丁丙诺啡的DA释放能力较弱。丁丙诺啡处理后DA释放频率最大增加了约25%, 而海洛因处理后增加了约60%^[31]。相较于海洛因, 丁丙诺啡起到较弱的DA释放剂作用; 在海洛因给药之前给予丁丙诺啡, 丁丙诺啡对海洛因起到竞争性拮抗剂的作用。虽然海洛因以线性剂量依赖的方式增加了DA释放频率, 但丁丙诺啡使用的剂量对DA释放产生了钟形效应^[31]。丁丙诺啡诱发的DA释放频率在低剂量范围内增加, 但高剂量反而下降, 说明丁丙诺啡以剂量依赖的方式双

相调控了伏隔DA的释放^[31]。这些结果支持丁丙诺啡仅在低剂量范围内作为一种基于DA弱释放剂用于治疗阿片类药物成瘾。

3 光纤记录

光纤光度法是利用光纤将荧光信号传输到检测系统, 从而实现实时监测脑内神经活动变化的技术^[32,33]。基因编码生物传感器是可传递荧光信号的分子信号传导介质, 可通过病毒注射或使用转基因动物技术植入基因编码型荧光探针或生物传感器, 对脑内特定类型细胞进行标记, 结合多光子成像技术、单光子的微型显微镜成像技术或光纤光度测定法来记录这些荧光信号, 从而得到标记神经元活动信号。光纤光度法实验装置一般由光纤、激发光源、透镜系统、荧光光度计、数据采集和软件分析系统等组成。光纤记录系统可以分为单通道光纤记录系统、多通道光纤记录系统和多色光纤记录系统。单通道光纤通常只能测量一个位置的信号, 单通道光纤可同时监测多个区域的信号。在多色光纤系统中, 每根光纤可以独立接收和记录不同颜色的荧光信号, 从而实现对一个区域内多个神经活动信号的监测。在脑内植入光纤后, 通过光纤传递激发光, 这个激发光经过透镜系统照射到荧光标记的神经元上。荧光标记蛋白吸收激发光后会发出荧光信号。这个信号通过同一根光纤传送到检测系统。荧光光度计用于测量返回的荧光信号的强度, 得到的荧光信号会被转换为电信号。荧光信号的强度与神经元内的活动相关, 通过分析这些信号的变化, 可以了解脑内实时神经活动状况^[34]。光纤光度法在评估脑中DA动态方面具有以下几个优点: 光纤光度法能够在动物自由活动过程中连续监测DA活动, 具有很高的时间和空间分辨率; 通过利用DA传感器, 光纤光度法可以选择性地测量特定脑区或神经元群中的DA动态变化; 与其他技术相比, 光纤光度法侵入性较小; 光纤光度法还可进行慢性记录和纵向研究, 观察在较长时间范围内的DA动态变化, 如在疾病模型或慢性给药过程中的DA变化。但是光纤光度法的不足在于可能无法提供有关亚细胞或细胞水平上的DA动态变化, 这一缺陷可通过双光子显微镜成像等技术解决。

基因编码钙指示剂由荧光蛋白和内源性钙结合蛋白组成,主要用于测量神经元活动钙信号^[35]。常用基因编码钙指示剂有绿色钙调素融合蛋白(green calmodulin fusion protein, GCaMP),它含有环化重排绿色荧光蛋白,该结构在C末端与钙调素的钙结合序列融合,在N末端与RS20肽融合。在突触传递和动作电位放电过程中, Ca^{2+} 进入神经元,钙和钙调素结构结合导致绿色荧光蛋白荧光增加。GCaMP现已被广泛用于跟踪神经元中的钙动力学,通过DA神经元的钙成像峰可推断DA紧张性和位相性放电模式,因此也可用它代表DA神经活动的指标^[36]。GCaMP具有高时空分辨率和细胞类型特异性的优势,而在亚细胞层面GCaMP可记录轴突和树突钙瞬变。GCaMP6是GCaMP家族的重要一员,也是最常用的基因编码钙指示剂,GCaMP6的几种变体具有不同分子特性,如GCaMP6s、GCaMP6m和GCaMP6f,其亮度、信噪比和时间分辨率各不相同^[37]。GCaMP8是目前最快速和灵敏度最高的钙指示剂^[38]。

相较于GCaMP间接跟踪脑内DA神经活动,DA传感器可以直接测量脑内DA动态变化。DA传感器是基于G蛋白偶联受体构建的可遗传编码的神经递质荧光探针。目前已开发出两大类DA传感器,来自加州大学Tian研究团队的dLight传感器和来自北京大学李毓龙研究团队的GRAB_{DA}传感器。dLight传感器由不同亚型DA受体嵌入环化重排绿色荧光蛋白组成,当传感器与DA结合时发生构象改变,会导致环化重排绿色荧光蛋白荧光强度发生变化^[39]。dLight1传感器能够可靠地检测生理和行为相关的DA瞬变,如测定与行为相关的皮层特异性DA变化和伏隔核DA变化。dLight1.1使用DA D1受体,而dLight1.4使用D4受体,dLight1.5使用D2受体。与dLight1相比,dLight1.4和dLight1.5对DA具有更强的亲和力、选择性、响应动态范围和灵敏度,这些使dLight1.4和dLight1.5能够更精确地监测DA的变化。GRAB_{DA}也采用类似的设计,GRAB_{DA}主要使用D2受体^[40]。第一代GRAB_{DA}受体的传感器称为GRAB_{DA1m}和GRAB_{DA1h},其EC₅₀值分别为10 nmol/L和130 nmol/L, $\Delta F/F$ 均为90%,具有亚细胞分辨率、亚秒DA动力学和优异的分子特异性。第二代传感器GRAB_{DA2m}和GRAB_{DA2h}的动态

响应范围比第一代传感器高出2~3倍^[41]。GRAB_{DA}已用于纤维光度法测量大鼠、小鼠、果蝇和斑马鱼的脑内DA释放。DA生物传感器优点在于与配体结合时表现出优异的荧光灵敏度和亮度,同时其对内源性配体具有高度的特异性和亲和力,DA传感器在受体激活数十毫秒后发生快速的构象变化,因此具有很高的空间和时间分辨率,但需要注意的是DA传感器不能对DA浓度进行定量测定。有研究对光纤记录结合dLight1.3b传感器实验结果和微透析实验数据进行比较,通过测量注射苯丙胺或生理盐水前后小鼠背侧纹状体中的细胞外DA动态变化,发现DA传感器实验数据和微透析实验数据在分钟和小时时间尺度范围内比较,两者的测量结果有很好的相关性^[42]。

3.1 成瘾性药物对VTA DA神经元活动的影响

成瘾性药物虽然都能增加NAc细胞外DA水平,但它们对VTA DA神经元活动影响是不同的。有研究用光纤光度法结合基因编码的 Ca^{2+} 指示剂GCaMP6技术观察了海洛因、尼古丁、可卡因和MDMA急性暴露对VTA DA神经元和中缝背核5-HT神经元的神经活性调控作用。GCaMP6m在VTA DA神经元中选择性表达后,急性海洛因给药以剂量依赖的方式显著增加了VTA DA神经元 Ca^{2+} 信号,时间可长达1 h,动力学分析发现海洛因给药60 s后VTA DA神经元激活^[43]。尼古丁激活DA神经元并对DA神经元产生双相调节反应,尼古丁暴露增加了VTA DA神经元 Ca^{2+} 瞬变波动的频率,但对 Ca^{2+} 瞬变幅度没有显著影响。可卡因导致VTA DA神经元的 Ca^{2+} 信号显著剂量依赖性下降,最高剂量下降约40%,维持时间超过70 min。可卡因还大大降低了VTA DA神经元 Ca^{2+} 信号的瞬时波动幅度和频率,其机制是可卡因与DA转运体结合,阻止DA再摄取,导致细胞外DA的增加,通过作用于DA D2受体,降低自发动作电位放电^[43]。

3.2 阿片成瘾DA机制

对于阿片类药物奖赏机制存在两种假说。传统假说认为阿片类药物奖赏作用是由VTA的DA能神经元去抑制介导的,即通过作用于GABA能中间神经元间接调控VTA的DA能神经元产生奖赏效应。另一种假说认为,阿片类药物初始奖赏效应是由非DA能神经元介导的,脚桥核可能是阿片类药物

的初始靶点, 个体只有在阿片类药物反复暴露后, 才能产生DA依赖性机制^[44]。最近, 光纤结合DA传感器的研究支持阿片类药物初始奖赏作用会引起NAc中DA的释放^[45]。在NAc中注射编码dLight1的腺相关病毒, 植入光纤后记录自由活动小鼠NAc DA的释放。小鼠在腹腔第一次注射海洛因后不到1 min, DA传感器荧光特异性地捕捉到DA瞬变, 该瞬变在3 min后达到峰值。第一次注射海洛因会在几分钟内增加NAc中的DA浓度, 海洛因优先激活内侧VTA中的DA神经元亚群, 增加内侧NAc壳中的DA释放^[45]。另外, 在DAT-Cre小鼠中表达了Cre依赖性GCaMP6m, 用纤维光度法记录自由活动小鼠静脉注射海洛因后的VTA DA神经活动, 海洛因重复注射在几分钟内增加了VTA DA神经元的钙信号^[45]。VTA DA活动的动力学与在NAc中观察到的DA释放激增相似, 表明VTA DA神经元的活动与DA释放之间存在密切相关性。

3.3 酒精成瘾DA机制

微透析实验发现, 低剂量酒精可促进大鼠NAc DA释放增加。慢性酒精成瘾大鼠NAc基础DA水平变化不明显, 相比之下, 酒精戒断后NAc基础DA浓度下降明显, 这可能是导致酒精成瘾的原因之一^[46]。有研究人员使用dLight1.1和光纤光度法研究了大鼠酒精自身给药、消退和复吸不同阶段, 中脑边缘DA系统NAc不同空间区域的DA动态变化。实验结果显示, 在酒精自身给药维持阶段, DA活动在不同区域之间呈现出时间上的协调性, 边缘DA系统的NAc核部和壳部显示出一致的DA释放模式^[47]。在酒精自身给药消退阶段, DA活动呈现出下降的趋势, 而在复吸(通过环境诱导的恢复)阶段, DA活动再次上升。这表明在复吸阶段, 环境的再现能够引起DA释放的重新增加, 值得注意的是, 复吸期间的DA活动呈现出更高的频率和更大的幅度^[47]。这些结果表明, 该系统对于动机驱动和环境诱发的复吸起到重要作用。另外, 在酒精自身给药、复吸和重新获得阶段, 用GCaMP光纤光度法对VTA酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)神经元活动进行观察, 确定了VTA TH神经元的内侧和外侧活动特征。研究结果显示, 在酒精自身给药阶段, VTA TH神经元的内侧和外侧显示出不同的活动模式, 内侧VTA TH神经元表现出较

高的活动水平, 而外侧VTA TH神经元的活动水平较低^[47]。在复吸阶段, 当环境条件再现时, 内侧VTA TH神经元的活动明显增加, 而外侧VTA TH神经元的活动也呈现出回升的趋势。在重新获得阶段, 当动物再次学习和获得酒精自身给药行为时, 内侧VTA TH神经元的活动再次增加, 而外侧VTA TH神经元的活动也呈现出增加的趋势^[47]。这些结果揭示了VTA TH神经元在酒精自身给药、复吸和重新获得过程中的不同活动模式。内侧VTA TH神经元的活动与动机行为和奖赏有关, 而外侧VTA TH神经元的活动可能与其他方面的神经调节有关。这些结果表明, 中脑VTA DA神经元发出不同的平行通路, 在复吸发生过程中起不同作用。

4 总结

近几十年来, 随着科技的进步, 新的DA检测技术得到不断地研发和应用, 研究人员应该根据具体的研究问题和实验需求选择最合适的技术和方法。微透析法通过脑内植入半透膜探针, 实现对细胞外神经递质水平的采集和分析, 提供了细胞外DA浓度变化的时间特性曲线, 但时间分辨率较低。FSCV利用电化学原理实时测量DA浓度, 具有极高的时间分辨率。光纤光度法是一种较新的光学技术, 利用最近研发的DA传感器可实时监测特定脑区的DA活动, 具有中等时间分辨率的优势, 并能够对DA神经环路活动进行定位。总之, 微透析、FSCV和光纤光度法为我们理解大脑DA生理功能以及预防和治疗神经精神障碍相关疾病提供了科学依据。

参考文献

- [1] Grace AA. Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17(8): 524-532
- [2] Cramb KML, Beccano-Kelly D, Cragg SJ, et al. Impaired dopamine release in Parkinson's disease. *Brain*, 2023, 146(8): 3117-3132
- [3] Wise RA, Jordan CJ. Dopamine, behavior, and addiction. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1): 83
- [4] Klein MO, Battagello DS, Cardoso AR, et al. Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(1): 31-59
- [5] Roeper J. Dissecting the diversity of midbrain dopamine

- neurons. *Trends Neurosci*, 2013, 36(6): 336-342
- [6] Wise RA, Robble MA. Dopamine and addiction. *Annu Rev Psychol*, 2020, 71(1): 79-106
- [7] Labouesse MA, Cola RB, Patriarchi T. GPCR-based dopamine sensors—a detailed guide to inform sensor choice for *in vivo* imaging. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8048
- [8] Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, et al. Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*, 2009. doi: 10.1002/0471142301.ns0701s47
- [9] Zapata A, Chefer VI, Shippenberg TS. Microdialysis in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, 2009. doi: 10.1002/0471142301.ns0702s47
- [10] Kennedy RT. Emerging trends in *in vivo* neurochemical monitoring by microdialysis. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17(5): 860-867
- [11] Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the “shell” as compared with the “core” of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(26): 12304-12308
- [12] Lecca D, Valentini V, Cacciapaglia F, et al. Reciprocal effects of response contingent and noncontingent intravenous heroin on *in vivo* nucleus accumbens shell versus core dopamine in the rat: a repeated sampling microdialysis study. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007, 194(1): 103-116
- [13] Berridge KC, Robinson TE. Liking, wanting, and the incentive-sensitization theory of addiction. *Am Psychol*, 2016, 71(8): 670-679
- [14] Leyton M, Vezina P. Dopamine ups and downs in vulnerability to addictions: a neurodevelopmental model. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(6): 268-276
- [15] Rossetti ZL, Hmadian Y, Gessa GL. Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. *Eur J Pharmacol*, 1992, 221(2-3): 227-234
- [16] Sklair-Tavron L, Shi WX, Lane SB, et al. Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 11202-11207
- [17] Diana M, Muntoni AL, Pistis M, et al. Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(3): 1037-1041
- [18] Cadoni C, Di Chiara G. Reciprocal changes in dopamine responsiveness in the nucleus accumbens shell and core and in the dorsal caudate-putamen in rats sensitized to morphine. *Neuroscience*, 1999, 90(2): 447-455
- [19] Kawa AB, Valenta AC, Kennedy RT, et al. Incentive and dopamine sensitization produced by intermittent but not long access cocaine self-administration. *Eur J Neurosci*, 2019, 50(4): 2663-2682
- [20] Fortin SM, Cone JJ, Ng-Evans S, et al. Sampling phasic dopamine signaling with fast-scan cyclic voltammetry in awake, behaving rats. *Curr Protoc Neurosci*, 2015. doi: 10.1002/0471142301.ns0725s70
- [21] Venton BJ, Cao Q. Fundamentals of fast-scan cyclic voltammetry for dopamine detection. *Analyst*, 2020, 145(4): 1158-1168
- [22] Robinson DL, Venton BJ, Heien MLAV, et al. Detecting subsecond dopamine release with fast-scan cyclic voltammetry *in vivo*. *Clin Chem*, 2003, 49(10): 1763-1773
- [23] Budygin EA, Kilpatrick MR, Gainetdinov RR, et al. Correlation between behavior and extracellular dopamine levels in rat striatum: comparison of microdialysis and fast-scan cyclic voltammetry. *Neurosci Lett*, 2000, 281(1): 9-12
- [24] Phillips PEM, Stuber GD, Heien MLAV, et al. Subsecond dopamine release promotes cocaine seeking. *Nature*, 2003, 422(6932): 614-618
- [25] Stuber GD, Wightman RM, Carelli RM. Extinction of cocaine self-administration reveals functionally and temporally distinct dopaminergic signals in the nucleus accumbens. *Neuron*, 2005, 46(4): 661-669
- [26] Quigley JA, Logsdon MK, Turner CA, et al. Sex differences in vulnerability to addiction. *Neuropharmacology*, 2021, 187: 108491
- [27] Becker JB, Rudick CN. Rapid effects of estrogen or progesterone on the amphetamine-induced increase in striatal dopamine are enhanced by estrogen priming. *Pharmacol Biochem Behav*, 1999, 64(1): 53-57
- [28] Ruda-Kucerova J, Amchova P, Babinska Z, et al. Sex differences in the reinstatement of methamphetamine seeking after forced abstinence in sprague-dawley rats. *Front Psychiatry*, 2015, 6: 91
- [29] George BE, Barth SH, Kuiper LB, et al. Enhanced heroin self-administration and distinct dopamine adaptations in female rats. *Neuropsychopharmacology*, 2021, 46(10): 1724-1733
- [30] Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci*, 1992, 12(2): 483-488
- [31] Isaacs DP, Leman RP, Everett TJ, et al. Buprenorphine is a weak dopamine releaser relative to heroin, but its pretreatment attenuates heroin-evoked dopamine release in rats. *Neuropsychopharm Rep*, 2020, 40(4): 355-364
- [32] Martianova E, Aronson S, Proulx CD. Multi-fiber photometry to record neural activity in freely-moving animals. *J Vis Exp*, 2019. doi: 10.3791/60278
- [33] Li Y, Liu Z, Guo Q, et al. Long-term fiber photometry for neuroscience studies. *Neurosci Bull*, 2019, 35(3): 425-433

- [34] Wang Y, DeMarco EM, Witzel LS, et al. A selected review of recent advances in the study of neuronal circuits using fiber photometry. *Pharmacol Biochem Behav*, 2021, 201: 173113
- [35] Akerboom J, Chen TW, Wardill TJ, et al. Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci*, 2012, 32(40): 13819-13840
- [36] Siciliano CA, Tye KM. Leveraging calcium imaging to illuminate circuit dysfunction in addiction. *Alcohol*, 2019, 74: 47-63
- [37] Chen TW, Wardill TJ, Sun Y, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 2013, 499(7458): 295-300
- [38] Zhang Y, Rózsa M, Liang Y, et al. Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *Nature*, 2023, 615(7954): 884-891
- [39] Patriarchi T, Cho JR, Merten K, et al. Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science*, 2018, 360(6396): eaat4422
- [40] 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. *Cell*, 2018, 174(2): 481-496.e19
- [41] Sun F, Zhou J, Dai B, et al. Next-generation GRAB sensors for monitoring dopaminergic activity *in vivo*. *Nat Methods*, 2020, 17(11): 1156-1166
- [42] Ejdrup AL, Wellbourne-Wood J, Dreyer JK, et al. Within-mice comparison of microdialysis and fiber photometry-recorded dopamine biosensor during amphetamine response. *ACS Chem Neurosci*, 2023, 14(9): 1622-1630
- [43] Wei C, Han X, Weng D, et al. Response dynamics of midbrain dopamine neurons and serotonin neurons to heroin, nicotine, cocaine, and MDMA. *Cell Discov*, 2018, 4: 60
- [44] Laviolette SR, Nader K, van der Kooy D. Motivational state determines the functional role of the mesolimbic dopamine system in the mediation of opiate reward processes. *Behav Brain Res*, 2002, 129(1-2): 17-29
- [45] Corre J, van Zessen R, Loureiro M, et al. Dopamine neurons projecting to medial shell of the nucleus accumbens drive heroin reinforcement. *Elife*, 2018, 7: e39945
- [46] Weiss F, Parsons LH, Schulteis G, et al. Ethanol self-administration restores withdrawal-associated deficiencies in accumbal dopamine and 5-hydroxytryptamine release in dependent rats. *J Neurosci*, 1996, 16(10): 3474-3485
- [47] Liu Y, Jean-Richard-dit-Bressel P, Yau JOY, et al. The mesolimbic dopamine activity signatures of relapse to alcohol-seeking. *J Neurosci*, 2020, 40(33): 6409-6427