

你的愁你的乐 荧光多巴胺探针能“看到”

本报记者 赵汉斌

多巴胺是一种重要的神经递质,用来帮助细胞传递脉冲,它与帕金森症、药物成瘾、精神分裂症、多动症和创伤后压力综合征等多种神经系统疾病密切相关。

为更好地研究多巴胺在生理和病理过程中的作用,研究人员需要拥有一种能够实时、

灵敏、特异地监测多巴胺的“手”“兵器”。此前,北京大学生命科学学院李毓龙实验室开发了一系列监测神经递质的荧光探针,其中包括第一代多巴胺探针。

10月22日,李毓龙实验室与美国纽约大学和英国国立卫生研究院合作,在《自然·方法学》杂志在线发表论文,报告了新型红色荧光多巴胺探针和第二代绿色荧光多巴胺探针的开发应用成果。

绿色荧光探针让细胞自己发光

多巴胺是大脑中含量最丰富的儿茶酚胺类神经递质,这种脑内分泌物与运动控制、动机、学习、记忆、情绪等生理过程有关,负责传递兴奋及开心的信息,具有调控中枢神经系统的多种生理功能。

20世纪50年代,瑞典科学家阿尔维德·卡尔森确定了多巴胺是脑内信息传递者的角色,让人们认识到一旦人类多巴胺调节系统出现障碍,往往会出现帕金森症、精神分裂症、抽动秽语综合征、注意力缺陷多动综合征以及垂体肿瘤的发生等。卡尔森据此研制出治疗这类疾病的药物,并获得了2000年诺贝尔生理学或医学奖。

“科学家如果拥有一种能以高时空分辨率、高特异性和高灵敏度感知多巴胺浓度变化的工具,将有助于研究多巴胺在生理和病理条件下的多种功能,去追踪在活体模式生物中、复杂行为模式下多巴胺信号的动态变化情况。”李毓龙说。

传统的监测方法,主要是通过微透析对脑脊液进行采样并生化监测、通过碳纤维电极进行记录等。这些监测手段各自存在一些局限性,如缺乏足够的时间和空间分辨率,难以精确反映神经递质的真实动态信息;监测特定神经递质的特异性不够高;监测方法对生物体的损伤性大等。因此,科学家一直致力于优化已有方法,或者开发新方法,力图弥补短板,取得突破。

升级版探针可以多色“合作”

近两年来,李毓龙团队对研发的第一代探针进行了改造和优化。“就像电脑的芯片,从第一代到第二代,它的运算速度越来越快,多巴胺探针,更新换代后变得更灵敏,而且所带来的非损伤性或者说副作用要更少。”李毓龙说。

第一代多巴胺探针的局限在于,只有在多巴胺释放较多的时候才能够监测到,监测也需要较长的时间。但如果有了更灵敏的探

针,就可以实时地地一些精细的动物行为学上——比如说受奖赏或受惩罚时,抑或是在成瘾或疾病发作时,更精准地监测多巴胺的动态变化。针对新一代多巴胺探针,李毓龙等人在细胞、脑片、果蝇、小鼠中对其表现进行了系统地研究,并通过一系列对照实验,对探针信号的特异性进行了验证。

“然后你就可以拍照,或拍个视频,哪个地方亮,哪个地方有多巴胺释放。”李毓龙向记者介绍,这样就可以通过荧光成像的方法,将原本不可见的神经递质的动态变化,转变成直观、易测的荧光信号,进行实时监测,创造性地克服了已有多巴胺监测手段中时空分辨率低、分子特异性差等诸多问题,而且对细胞几乎不会造成损伤。

他们通过转染、病毒注射等手段,将探针表达在细胞、小鼠脑片或活体的果蝇、斑马鱼、小鼠上,监测到了电刺激小鼠脑片引发的多巴胺释放,并在活体果蝇、斑马鱼和小鼠的大脑中监测到了与嗅觉刺激、视觉刺激、学习记忆、交配行为相关的多巴胺信号变化。



视觉中国供图

组合而成的。我们在第一代探针的基础上,对这两部分蛋白交界面的重要氨基酸依次尝试了不同的种类变化,并逐个监测探针的特性;随后对表现优秀的氨基酸变化形式进行排列组合,以实现“强强联合”,达到最优化的探针监测效果。”李毓龙说。此外,他们尝试更换不同种类的荧光蛋白,开发出不同荧光颜色的探针。

“在我们的大脑中,有很多很复杂的化学信号,多巴胺只是其中一种。”李毓龙解释说,除了令人愉悦的多巴胺,还有被认为管理着压力感的肾上腺素,或者是调节抑郁情绪的

5-羟色胺。

因此,当有一个对“幸福感”敏感的多巴胺红色探针,以及对抑郁情绪或压力敏感的绿色神经递质探针在一起工作时,人们就可以同时看到不同神经递质之间的关系,从而更好地理解大脑的化学物质如何进行协同变化。

他们开发的新型红色荧光多巴胺探针,可与其他钙离子探针、神经递质探针等绿色荧光探针共同使用,实现多种信号的同时记录。另外他们还优化出具有更高灵敏度及成像信噪比的第二代绿色荧光多巴胺探针。

体外实时探测多巴胺不是梦

人们监测大脑内化学物质之前多使用的是化学方法,比如通过试剂监测受体的化学反应;或者通过质谱法,来监测特定大小的分子。“化学试剂本身是有毒的;质谱法要首先让这些分子离子化,活细胞根本无法承受。”李毓龙表示,所以这些监测方法不适合在活体动物中使用。

李毓龙团队运用新一代多巴胺探针,在活体动物自由活动也能记录其深部脑区中多巴胺的动态变化。相比于第一代探针,经过优化得到的第二代绿色荧光探针,荧光更亮,结合神经递质后信号变化更显著。此外,新型红色荧光探针在对多巴胺监测时,从前的单一绿色荧光拓展到多色荧光。因此,两款新型探针可以更容易与神经科学领域其他重要技术,

如钙成像、光遗传学等结合使用。新型探针也为多巴胺受体的相关药物筛选优化提供了新的可能。

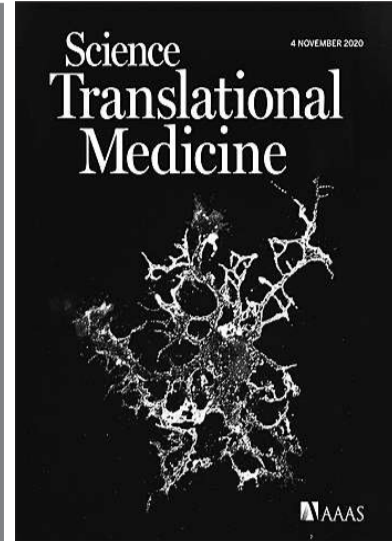
李毓龙向记者介绍,目前他们已着手研发更新一代的荧光探针,让红光更红。“因为在活体中,探针就像信号灯或者是导航灯,更红的光穿透力更强,信噪比更高,也更容易监测到。”现在监测这些荧光信号,人们还得给动物体内加一根光纤,才能够监测到多巴胺信息。

想要观测动物大脑里是“怎么想的”,更真实、准确地理解其神经系统怎么工作,需要荧光探针有足够的亮度,甚至在自由活动的动物体外也可直接看到红色的、穿透力足够强的光。“这些理论上是可以实现的。”李毓龙说,而这正是他们努力的方向。

封面故事

主持人:本报记者 陆成宽

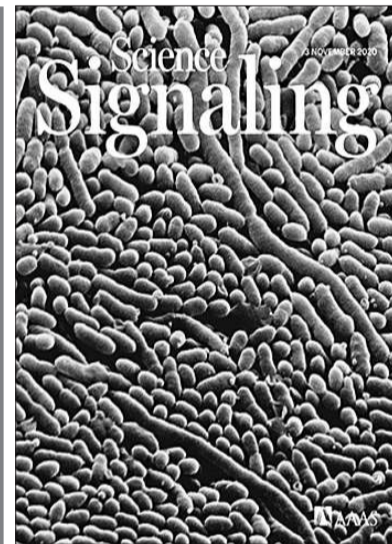
把细胞外囊泡当抗原 或可治疗多发性硬化症



《科学·转化医学》
2020.11.4

多发性硬化症(MS)是一种以神经炎症和脱髓鞘为特征的自身免疫性疾病,而少突细胞来源的细胞外囊泡可作为抗原,特异性治疗小鼠自身免疫性神经炎。在小鼠模型中使用髓鞘特异性自身抗原诱导耐受性已被证明有效,但识别疾病相关抗原面临困难。美国托马斯杰斐逊大学的贾科莫·卡塞拉等研究人员发现,少突胶质细胞源性胞外囊泡(OI-EVs)含有多种髓鞘相关抗原。为测试其潜在的治疗效果,他们构建了多个实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)的啮齿动物模型,给予胞外囊泡后可恢复免疫耐受并降低疾病的病理症状。研究提示,胞外囊泡可能是一种治疗多发性硬化症的有效方法。

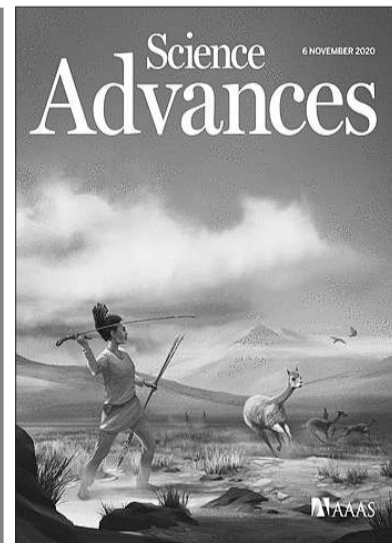
遇到囊性纤维化肺 这种细菌靠突变应对



《科学·信号》
2020.11.3

双组分调控系统(TCS)是广泛存在于细菌中的一种信号传导机制。从囊性纤维化(CF)患者中分离出的铜绿假单胞菌菌株通常具有影响双组分调控系统的突变,而该双组分调控系统可感知并响应环境刺激。西北大学生命科学学院的曹桥(音译)等研究人员发现,适应囊性纤维化的铜绿假单胞菌菌株的突变影响了组氨酸激酶的基因BfmS,导致BfmS介导的下游效应子BfmR的抑制作用缺失,从而促进了与慢性感染相关的表型变化。在这些条件下,一种来自不同双组分系统的组氨酸激酶因子GtrS,促进了高葡萄糖含量的囊性纤维化肺中BfmR的活性。因此,影响双组分系统的突变可能通过同源双组分系统的失调直接促进宿主适应,也可能通过使非同源双组分系统之间的异常交叉而间接促进宿主适应。

蛋白质组学分析表明 早期美洲女性也狩猎



《科学·进展》
2020.11

以女性为采集者、男性为狩猎者的性别分工是狩猎采集民族志的主要经验,表明了一种祖先行为模式。美国加州大学戴维斯分校的兰德·哈斯等研究人员提出了一种考古发现和元分析,挑战人类猎人假说。在安第斯高地的一处遗址中发掘结果表明,一个有9000年历史的人类墓葬(WMP6)与一个由石头弹丸和动物加工工具组成的狩猎工具包有关。骨骼学、蛋白质组学 and 同位素分析表明,这个早期的猎人是一个年轻的成年女性,以陆生动物为食。通过对整个美洲晚更新世和全新世早期埋葬方式的分析,研究人员发现WMP6是最早和最安全的猎人埋葬方式,样本中还包含另外10名女性,这在统计上与早期男性猎人埋葬相同。研究结果与非性别劳动实践相一致,表明当时女性也是大型猎物的狩猎者。

治疗急性肾损伤有了可精准“带货”的新方案

新药比原方案在肾脏中的分布提高了3倍

洪恒飞 柯溢能 本报记者 江耘

急性肾损伤(AKI)是指一种由多种侵袭因素(如内毒素等)造成肾功能在短期内急性减退的临床综合征,其发病迅猛,死亡率高。目前针对急性肾损伤的治疗仍以早期液体复苏或肾脏替代治疗等干预法为主,缺乏有效的药物治疗手段。

浙江大学药学院杜永忠教授11月13日接受科技日报记者采访时表示,他们课题组经过2年的攻关,设计出一款可精准“带货”,有效释放、高浓度分布、长期滞留的急性肾损伤靶向治疗药物,为临床转化提供了重要支持。相关研究成果10月9日发表于国际知名期刊《科学·进展》。

传统抗氧化剂不能靶向聚集

“肾缺血和肾小管上皮细胞损伤或坏死、炎症及氧化应激反应,以及外源性和内源性肾毒性物质等是急性肾损伤的主要病理学机制。”杜永忠告诉记者。

据介绍,因大型手术、出血或严重烧伤可能导致大量出血、休克、心功能不全、血管过度扩张等,从而使肾的血流量减少。当肾脏血流突然中断后恢复供血,组织和器官易出现功能障碍及结构破坏,而导致缺血再灌注损伤。

“另外,手术期间可能用到的肾毒性药物包括麻醉药、止痛药、抗生素等,会通过细胞毒性引起肾小管损伤,从而导致急性肾损伤。”论文第一

作者、浙江大学药学院药剂所博士刘迪说,目前,大部分关于急性肾损伤的流行病学研究聚焦在住院患者及重症患者中。我国住院患者急性肾损伤的发生率为0.99%—11.6%。

研究表明,急性肾损伤发生时,肾小管上皮细胞中活性氧会异常升高,引发线粒体损伤,进而导致细胞凋亡,形成肾功能损伤的连锁反应。“传统的抗氧化剂总体临床治疗效果不甚理想。比如维生素C、维生素E等,虽然在细胞水平、动物水平的急性肾损伤研究中具有一定的抗氧化治疗作用,但转化到临床研究中,均未显示较好的急性肾损伤缓解作用。”杜永忠说。

杜永忠解释道,可能由于传统的抗氧化剂均存在不同程度的肾外效应,而不能靶向聚集在肾小管上皮细胞线粒体即活性氧的产生部位,因而作用有限。“肾脏作为人体重要的排泄器官,药物很快会被排出,无法形成高浓度覆盖进而保护受损的线粒体,终止连锁破坏。”

设计药物“火箭”直达损伤部位

一款治疗老年性线粒体疾病、心肌梗死的临床试验新药SS-31,凭其在肾小管上皮细胞中能够高浓度停留、保护线粒体进而遏制细胞凋亡的特性,令课题组受到启发。

“但SS-31作为一种多肽类药物,具有血浆酶降解性高、血浆半衰期极短以及难以递送至靶组织等缺点。”杜永忠表示,课题组希望通过制剂的设计克服这些问题,将该药物送达急性

肾损伤部位。

“我们设计了有两级推进系统和有效载荷组成的‘运载火箭’,实现对‘卫星’SS-31药品的运输。”杜永忠介绍,其中,“第一级火箭”为利用正电性的低分子量聚糖将药物靶向到肾脏,“第二级火箭”通过丝氨酸与急性肾损伤肾小管过表达的肾损伤分子-1的相互作用靶向到肾小管上皮细胞。

记者了解到,在研究人员最初的设计中,前药的载体还包含聚乙二醇,以期实现长循环,防止药物被快速降解。但小鼠体内分布实验显示,该载体的肾脏靶向效果不理想,大量药物分布在肝脏中。

“因此我们更改了设计方案,除去聚乙二醇,将载体与药物通过硫醇酮缩醛连接,保证了药物在损伤的肾小管上皮细胞的高活性氧环境中迅速释放,并在线粒体聚集,从而实现靶向抗氧化治疗。”杜永忠解释道,这相当于将“卫星”和“火箭”分离,极大改善了载体的肾脏分布效果。“对比试验显示,这一运输模式,相比SS-31原药,在肾脏中的分布提高了3倍,显著提高了治疗效果。”

“这种精确的分步靶向给药策略(器官—组织—细胞—细胞器)也可用于其他肾脏疾病的药物设计。”杜永忠表示,例如,可利用癌细胞特异性受体和癌症微环境,设计一款前药,能够实现癌细胞靶向,响应性释放抗癌药物,从而缓解抗癌药物的毒副作用。



视觉中国供图