

[综合评述]

探索脑化学——纳米电化学监测单细胞、 单囊泡、突触间隙释放化学信号 分子及形貌分析

程介克, 王 玮, 吴文展, 黄卫华, 王宗礼
(武汉大学化学与分子科学学院分析科学中心, 武汉 430072)

摘要 针对已有的微米及纳米电化学监测单囊泡、单突触及突触间隙释放, 扫描电化学显微镜用于单细胞释放前后形貌变化的定量分析, 微流控与阵列电极集成芯片, 用于细胞灌注培养及监测释放化学信号分子的研究工作进行了评述. 同时, 对近几年此领域的前沿研究进行了简要评论, 并对其未来发展提出了一些新的观点.

关键词 纳米电化学; 单细胞; 单囊泡; 突触间隙; 形貌分析

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2008)12-2609-09

时空分辨监测单细胞释放化学信号分子(神经递质)是探索脑化学的基础. 哺乳类动物的细胞很小(直径8~15 μm), 囊泡更小(直径100~400 nm), 突触间隙极小(10~50 nm), 神经递质释放速度很快(ms级), 被测化学信号分子低到分子水平(zmol). 因此, 监测递质释放必须采用具有超高灵敏度、高选择性、高时间分辨、高空间分辨以及超小体积的分析技术. 这对分析化学提出了极大的挑战, 也带来了机遇, 促进了分析化学学科的发展. 1970年, 美国电化学家 Adams 积极开展交叉学科研究, 开拓了电化学技术探索脑化学的研究方向. 由于受当时条件限制(使用毫米电极), 研究工作仅限于脑组织水平. 近20年来, 这一研究领域已获得蓬勃发展. 最近, Amatore 等^[1]及 Wightman 等^[2]对神经递质、脑功能以及监测单个活细胞释放进行了卓越的评论.

1996年以来, 我们研究组^[3~5]开展了毛细管电泳用于单细胞分析的研究. 于2000年, 我们开展了监测单细胞释放研究^[6], 研制组装了微米电极(5~8 μm)、纳米电极(100~300 nm)及锥形纳米电极(50~100 nm), 分别用于监测单个活细胞、单个活囊泡及单个突触间隙神经递质释放动力学, 取得一些可喜的成果^[7].

本文主要对本研究组系统研究的微米及纳米电化学监测单细胞、单囊泡及突触间隙释放, 单细胞释放前后形貌变化的定量分析, 微流控芯片用于细胞操纵、培养及监测释放的研究进行综合评述. 对近几年此领域的前沿研究也进行了评论, 并对未来发展提出了一些新观点.

1 微米电极监测单细胞释放

哺乳动物脑神经网络通过各种感觉如视觉、听觉、嗅觉及触摸等接收环境中的各种信息, 很多信息在脑神经细胞间通过神经递质(化学信使)进行传导. 多巴胺是脑中重要的神经递质, 涉及神经中枢、识别功能及应答系统. 多巴胺储存于细胞的囊泡中, 当细胞受激时, 离子通道打开, 引起细胞膜去极化, 产生动作电位, 突触前膜的通透性发生改变, 钙离子进入细胞内, 促使囊泡附着突触前膜, 并使囊泡膜与细胞膜融合, 形成融合孔[图1(A)中I], 将储存于囊泡内的神经递质释放到突触间隙中

收稿日期: 2008-09-28.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20675060, 20405012, 20299034)资助.

联系人简介: 程介克, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事单细胞分析研究. E-mail: jkcheng@whu.edu.cn

黄卫华, 男, 博士, 教授, 主要从事生命分析科学研究. E-mail: whhuang@whu.edu.cn

[图 1(A) 中 II], 神经递质分子通过扩散到靶细胞, 完成神经信号传递, 神经信号分子传导神经信号及胞吐释放全过程^[11] 如图 1(A) 所示. 图 1(B) 和 (C) 为 PC12 神经细胞释放多巴胺过程的 TEM 图像.

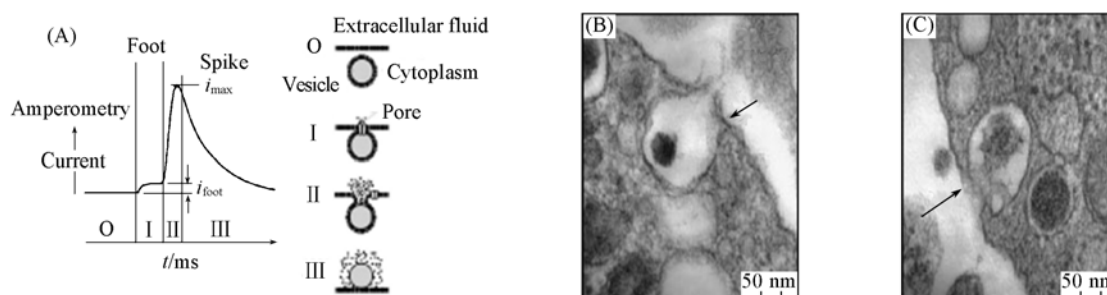


Fig. 1 Schematic of the different phases of vesicular exocytosis as observed by amperometry (A), TEM images of PC12 cell vesicles fusin with the plasma membrane (B) and release dopamine (C)^[11]

嗜铬神经细胞瘤(PC12)是鼠肾上腺细胞的癌变产物, PC12 细胞内囊泡的直径、密度及蛋白质组成等与脑中多巴胺能神经细胞相近, 在胞内合成、储存及释放多巴胺及去甲肾上腺素. 由于胞内多巴胺含量较去甲肾上腺素高 1~2 个数量级, 我们用毛细管电泳-微米碳纤维电极安培法仅检测到单个 PC12 细胞中的多巴胺, 但未检测到其它神经递质^[8], 表明 PC12 细胞是研究神经细胞释放的理想模型, 因此一直采用 PC12 细胞研究神经传递物质多巴胺释放. 最近 Ewing 等^[9]对 PC12 细胞作为神经递质释放的模型进行了评述, 认为其进展超过了其它细胞模型, 如嗜铬细胞等, 从而可以认定, 今后 PC12 细胞仍是研究细胞胞吐的重要模型.

我们的研究首先从研制超微电极出发. 由于碳电极的生物相容性好, 在生物微环境中不易毒化, 经长期探索, 开发出了一种高灵敏、低噪音的碳纤维微米电极及纳米电极^[10,11]. 用火焰熔融法将微米碳纤维(5~8 μm)密封于拉尖的毛细管内, 制得微米碳纤维电极消除了传统环氧树脂封电极的渗漏及噪音大等缺点. 此微米电极再经火焰蚀刻成为纳米碳纤维电极(100~300 nm). 我们应用此微米电极及纳米电极分别监测单细胞及单囊泡释放, 获得了满意的结果. 为了提高监测灵敏度, 纳米材料应具有高比表面, 可提高电极表面的催化活性. 并运用单壁纳米碳管修饰纳米碳纤维电极, 成功地研制出单壁纳米碳管修饰的纳米碳纤维电极, 并发现修饰后纳米电极的催化活性显著提高, 安培检测多巴胺的检出限达到 7.7 nmol/L, 灵敏度提高约一个数量级, 电极性能稳定, 经 1000 次循环伏安法扫描后, 电流无明显变化^[12].

微流控芯片研究刚兴起时, 我们曾开发出一种可以更换电极的芯片毛细管电泳-电化学检测多巴胺的装置, 即将电极置于芯片通道中心处, 可提高库仑效率, 检测多巴胺的灵敏度高于当时文献报道值^[13]. 后经改进, 用此纳米碳纤维电极在芯片上快速分离检测了单个 PC12 细胞中的多巴胺^[14]. 在此基础上, 我们首创了一种新颖的微流控细胞芯片^[15], 在该芯片上用重力流进行单细胞操纵、传输、定位、引入刺激剂及实时监测全过程, 实时监测了单个 PC12 细胞中多巴胺量子释放.

最近, Ewing 等^[16]将几支碳纤维微盘电极(直径 5 μm)集合组装在拉尖玻璃毛细管中, 形成碳纤维阵列电极(直径 10~20 μm), 7 支碳纤维阵列电极同时监测单个 PC12 细胞释放多巴胺. 由于 7 支微电极分别位于 PC12 细胞表面不同区域, 可以得到不同的多巴胺量子释放曲线. 此结果表明, 有可能研制超微电极用于空间分辨监测单细胞胞吐过程. 但他们采用 5 μm 微电极, 7 支阵列电极直径达 20 μm , PC12 细胞直径一般为 10~20 μm , 有时小至 5 μm , 则监测空间分辨率明显不够. 因此, 必须减小电极直径, 达到高空间分辨监测. Toledo 等^[17]对融合孔调节神经递质释放进行了评述. 近 10 年来, 有关 PC12 细胞、嗜铬细胞、肥大细胞及胰腺细胞等典型细胞胞吐融合孔性质与囊泡量子大小间相关性已有大量研究, 较深入地解释了细胞胞吐释放的过程. 有关 pH 值^[18]及温度^[19]等对囊泡释放的影响也有深入研究. 采用微米电极电化学监测单细胞释放, 打开了监测脑中化学信号分子瞬时变化的大门, Wightman^[20]及 Schuhmann 等^[21]都进行了有关评述. 现在, 微米电化学已成为电化学研究中最有发展前景的一个重要分支, 广泛应用于生物微环境探索细胞化学及脑化学, 也为细胞生理学有关机理研究提供了有力的手段.

2 纳米电极监测单囊泡及单突触释放

2.1 监测单囊泡释放

哺乳类动物细胞内含有成千上万个囊泡, 囊泡的直径均为纳米级, 如 PC12 细胞中囊泡直径为 99 nm, 嗜铬细胞的囊泡直径为 125 nm, 肥大细胞的囊泡直径为 400 nm. 微米电极可监测到细胞内多个囊泡释放的一系列电流峰. 我们用自行研制的碳纤维微米电极(直径 8 μm)监测 PC12 细胞(直径 10 μm)释放多巴胺, 结果见图 2(A)~(C), 其中图 2(A)为微米电极与细胞排布示意图, 图 2(B)为高分辨显微图像, 图中左侧为加刺激剂的微注射器, 图 2(C)为监测得到的一系列囊泡(一般有数十个)释放多巴胺的电流峰, 每个电流峰为一个囊泡释放结果. 目前文献报道微米电极监测单细胞释放均得到类似结果. 我们研究组^[22]采用自行研制的碳纤维纳米电极(直径 100 nm), 并应用膜片钳^[23]灵敏的电流放大器(可测 0.006 pA 电流), 首次监测到单个囊泡释放[图 2(D)~(F)], 使监测达到单囊泡分辨水平(时间分辨率 0.3 ms, 空间分辨率 100 nm, 多巴胺检出限 zmol). 最近, 在 Amatore 等^[1]及 Murray^[24]的评论中, 都特别介绍了这一工作. 至今尚未见到对纳米电极空间分辨监测单囊泡释放研究的其它文献报道.

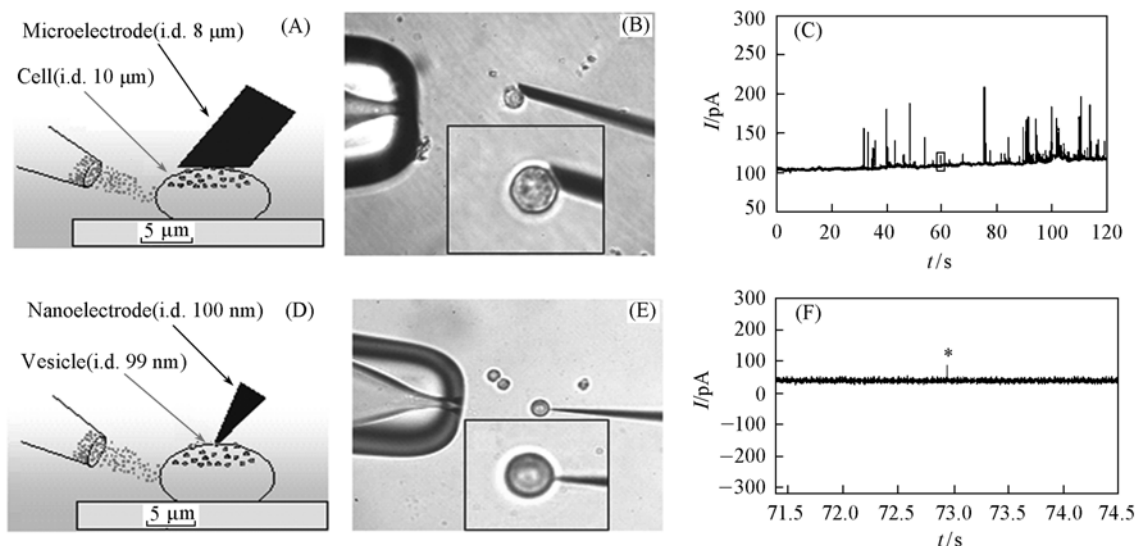


Fig. 2 Monitoring of dopamine release from single living vesicle of single PC12 cell^[22]

(A)—(C) Amperometric detection of single-cell using the microelectrode;

(D)—(F) amperometric detection of single-vesicle using the nano-electrode.

我们运用这一新的研究手段, 首次发现在细胞表面同一位点有多个囊泡连续释放神经递质的自然现象. 此前, 由于微米电极测得多个位点释放的一系列电流尖峰掩盖了一个位点上存在的囊泡连续释放信号, 因此未能发现这一自然现象. 我们用纳米电极在细胞表面不同位点监测到不同结果, 证实细胞表面存在活性区及非活性区. 用纳米电极对 121 个 PC12 细胞表面不同位点监测囊泡释放的统计结果表明, 在 212 次监测中有 147 次未监测到电流峰(占 69%), 65 次监测到电流峰(占 31%), 表明细胞表面非活性区约占 2/3, 活性区约占 1/3. 在监测到的电流峰中, 有单个峰 31 个(占 15%), 多个峰 177 个(占 85%), 表明囊泡在活性区连续释放, 在神经细胞传导中起主要作用. 这一重要发现为深入研究细胞胞吐生理学及探索脑化学中神经信号分子传导开拓了新思想.

2.2 监测单突触及突触间隙释放

哺乳类动物的神经细胞间信号传导主要依赖于突触传递化学信号分子. 突触由突触前膜、突触后膜及突触间隙构成. 突触前膜为神经细胞的树突末梢, 末梢有许多分支, 终端成球状, 称突触末梢, 其范围一般小于 1 μm^2 [如图 3(A)所示]. 当细胞之间形成突触连接时[图 3(B)], 则化学信号分子通过突触间隙传递信号. 突触间隙一般在 10~50 nm 之间, 刚形成连接时, 间隙可增加到 100 nm. 由于突触间隙的超微环境, 必须开发更小尺寸且能插入突触间隙的纳米电极, 以监测细胞间信号传导, 这对

分析学家是一个严峻的挑战,至今尚未见文献报道.

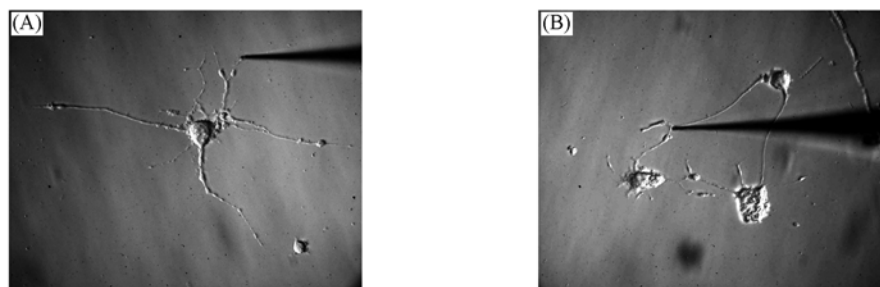


Fig. 3 Primary synapse of PC12 cell(A) and synapse junction in two PC12 cells(B)

有关纳米电极的研制已有不少报道.最近, Murray^[24]对其进行了详细的评论.他指出采用电化学刻蚀、等离子体轰击及火焰刻蚀等方法,已研制出电极活性面积达1 nm的电极.但对于插入突触间隙的电极,要求电极的长径比(长度与直径的比例)大,便于电极插入突触间隙中;电极应绝缘,适于定量检测;在实际应用中,电极消耗量大,应该研制工艺简便、成功率高、能够批量制备的电极. Bard等^[25]研制了碳纤维纳米电极(50~250 nm),其制作较简易,已用于扫描电化学显微镜(SECM)研究.但封接碳纤维的玻璃管直径约100 μm,电极的长径比小,不能用于插入突触间隙监测.

我们经过长期探索,开发出一种碳纤维锥形纳米电极.具体的作法:首先拉制玻璃毛细管得到直径小于1 μm、壁厚小于200 nm的尖端,将火焰蚀刻的碳纤维穿入玻璃微管.在抛光仪上用铂丝加热熔融玻璃管密封,再用火焰蚀刻成碳纤维锥形纳米电极,电极尖端直径50~100 nm,伸出玻璃微管长约0.5~1.0 μm,尖端后绝缘层厚度200 nm.如图4(A)所示,(A₁)和(A₂)为玻璃微管,(A₃)为火焰蚀刻后碳纤维,(A₄)~(A₆)为放大倍数不同的碳纤维锥形纳米电极.采用碳纤维微米电极(直径8 μm)、碳纤维纳米电极(直径100 nm)及碳纤维锥形纳米电极(直径50 nm)分别监测PC12单细胞、单囊泡及单突触末梢释放多巴胺,结果如图4(B)所示,曲线a为微米电极监测单个未分化PC12细胞的胞体,曲线b为纳米电极监测胞体的单囊泡释放,曲线c为锥形纳米电极监测分化细胞的单突触末梢[见图3(A)].图4(B)中曲线d~f为各个电流放大峰.结果显示,它们之间的释放动力学参数显著不同,统计结果表明,检测微米电极电流的半峰宽为7~8 ms,纳米电极的半峰宽为2.55 ms.突触末梢释放非常快速,每个囊泡释放持续时间均小于1 ms,其释放机制比未分化细胞的复杂.

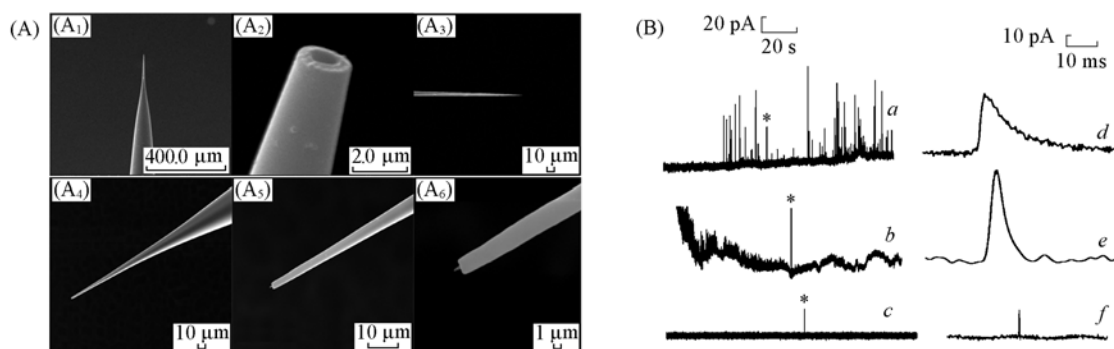


Fig. 4 SEM pictures of carbon fiber finite cone nanoelectrode(A₁—A₆) and monitoring of release from single cell(a, d), single vesicle(b, e) and single axon terminal(c, f) of PC12 cell(B)

将碳纤维锥形纳米电极插入突触间隙[见图3(B)]监测释放,结果如图5所示,图5(B)为图5(A)的放大电流峰图.监测结果显示,突触间隙内的释放电流峰较胞体及突触末梢更为复杂,例如图5(B),在5 ms内,监测到5个释放电流峰,释放持续时间很短,每个电流峰持续时间约0.3 ms.电流峰间隔约1 ms,这种多重电流峰可能由同一囊泡多次释放所致.我们推测,为了满足胞间通讯需要,当突触连接形成,突触间隙内膜结构发生改变,使神经细胞加强了囊泡释放的控制能力.由于锥形纳米电极具更小的尺度、更快的时间响应特性和更高的灵敏度,首次插入突触间隙,发现胞间通讯具有更为复杂的机制.

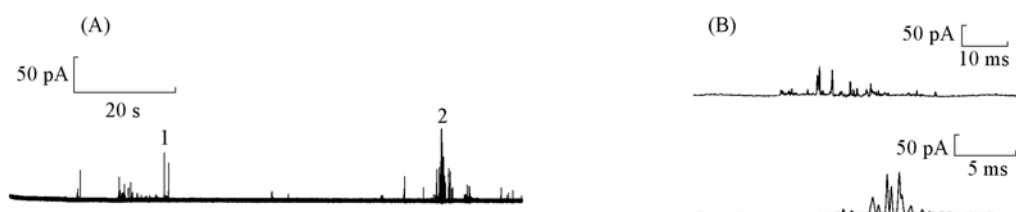


Fig. 5 Monitoring of release from synaptic cleft by a carbon fibre finite cone nanoelectrode

3 微流控芯片用于单细胞操纵及监测释放

由于单个活细胞的操纵存在较大难度,微流控芯片的兴起为活细胞的操纵提供了一个有力的技术平台.我们已对早期设计的操纵、传输及监测单细胞释放的微流控芯片作过介绍^[15]. Kennedy 等^[26]最早提出了在生理研究中开发微流控芯片的观点. 10年来,在生物化学分析中,微流控芯片已用于检测200余种化学形态物质^[27].微流控芯片用于操纵单细胞的各种方法也已有综述^[28].微阵列芯片由于高通量分析的特色,也得到迅速发展.最近 Kennedy 等^[29]对微阵列芯片用于分析进行了综述. Lindau 等^[30]采用微电子技术在玻片上组装4支铂微阵列电极,同时监测单个嗜铬细胞释放儿茶酚胺. Susuki 等^[31]报道了微电极阵列芯片用于神经网络的研究.我们自行设计研制出一种新颖的微流控与阵列电极集成化芯片,用于细胞引入、定位、灌注培养和监测细胞释放.通过软光刻与磁控溅射结合的方法,在洁净的玻片表面先溅射一层Ti,以增加玻璃表面的黏附性,再溅射一层Pt,得到64支Pt/Ti阵列电极,同时设计集细胞引入、定位、灌注培养于一体的PDMS微流控芯片.将两个芯片组合为集成化的芯片实验室[如图6(A)所示].细胞通过注射泵引入,在芯片上设计一个微堰,以减小向芯片内灌注新鲜培养液时对细胞的剪切力.与传统细胞培养相比,这种方法对细胞的影响小,用于芯片培养细胞有一定优势.经过长期灌注培养PC12细胞(约7d),细胞在神经生长因子诱导下,生长良好,细胞状态优于传统的培养方法[如图6(B)所示,图中箭头所指为集成在芯片上的阵列电极].

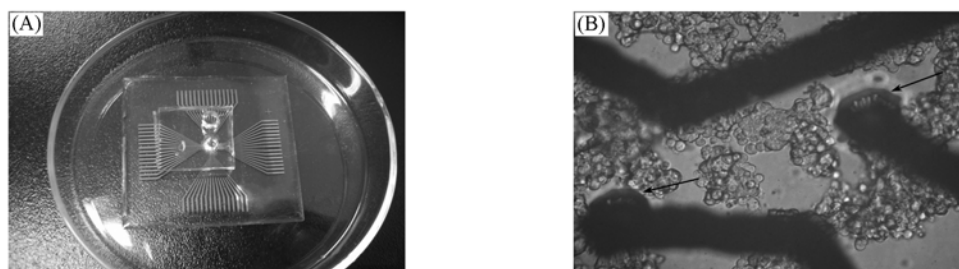


Fig. 6 Microfluidic and array-electrode integrated microsystem(A) and PC12 cell cultured in the microsystem(B)

4 扫描电化学显微镜用于单细胞释放形貌分析

近几年,扫描电化学显微镜(SECM)用于单细胞的研究迅速发展. Bard 等^[32]及 Amemiya 等^[33]分别对SECM用于单个活细胞化学成像作了评述. SECM不仅可用于细胞表面形貌分析,也可用于细胞活性研究,如光合成、呼吸、电子转移、胞吐及膜传输等.一氧化氮(NO)是一种重要的神经递质,参与信息传递.我们提出了一种新型碳纳米管修饰方法^[34],利用膜片钳系统精确的空间操纵,在碳纤维微盘电极(直径5 μm)的盘面上修饰单壁碳纳米管及Nafion,得到新型高灵敏NO微盘传感器,NO检出限达到4.3 nmol/L,成功地应用于监测单个胎儿脐带静脉内皮细胞(HUVEC)释放NO^[35].我们研制了一种用于SECM的碳纤维微盘电极(直径5.5 μm)作为探针,采用SECM的负反馈恒距离模式[图7(A)],首次对单个HUVEC细胞进行了活体三维形貌扫描,实时监测了单个HUVEC细胞的受激释放信号,并对细胞释放前后三维形貌进行了分析^[36].首次对细胞三维形貌进行了定量计算得到, HUVEC细胞高度(H_{cell})为2.89 μm,由于细胞贴壁,其底部的长度及宽度难以精确计算,我们应用色

谱曲线中半峰宽的计算方法,得到半高度处的细胞长度($W_L^{H/2}$)为 19.84 μm ,半高度处的细胞宽度($W_S^{H/2}$)为 10.11 μm ($n=8$).证实了 HUVEC 细胞的三维棱形结构.细胞释放后,细胞高度明显降低了 52%,细胞长度($W_L^{H/2}$)增加 3%,细胞宽度($W_S^{H/2}$)增加 21%[图 7(B₁)和(B₂)].SECM 形貌分析的分辨率达到 1 μm ,是 SECM 用于细胞化学成像最好的分辨率^[1].为了提高细胞成像的分辨率,我们研制了纳米碳纤维微盘电极(直径约 60 nm),用作 SECM 的探针.由于仪器限制,不能采用恒距离模式扫描,电极与曲面细胞距离大,纳米探针检测灵敏度不够,未取得满意的结果.若采用纳米碳纤维微盘电极作 SECM 的探针及膜片钳高灵敏检测,预计可获得纳米分辨率的细胞三维形貌图.最近, Mirkin 等^[37]利用纳米铂电极(直径 123 nm)作探针,在自组装的 SECM 上,采用恒距离模式(针尖距细胞表面约 20 nm)扫描,获得人乳房细胞三维形貌图,分辨率达到 200 nm. SECM 用于单细胞研究已引起广泛的兴趣,随着纳米探针的小型化,细胞形貌分析的分辨率不断提高,可以获得更精细的细胞形貌图.

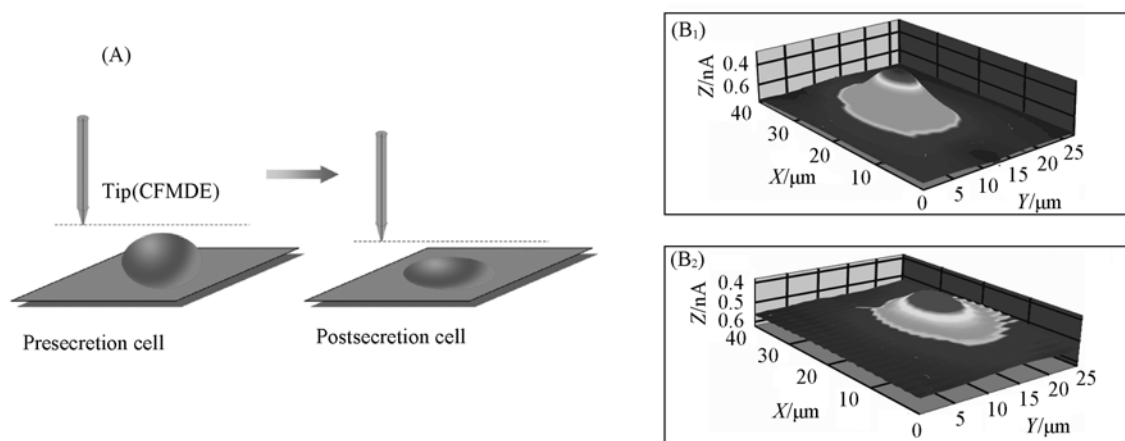


Fig. 7 SECM images of single-cell by constant height mode(A) and single cell(HUVEC)[(B₁), (B₂)]

5 发展与展望

细胞之间信号传导是一个极其复杂的过程,包括细胞释放信号分子、信号分子传递到靶细胞,并与靶细胞的受体作用、跨膜转换形成胞内第二信使,以及经过其后的信号途径组份级联传递、引起细胞生理反应和诱导基因表达等过程.近年来,细胞之间信号传导已成为国际科学界的研究热点,在某些研究领域已取得较大进展,并解决了细胞之间信号传导的一些关键问题,但还远不足以解释复杂的生命现象,仍有大量“未解之谜”有待揭晓.

5.1 开发更小尺寸纳米电极

细胞之间信号传导,主要依赖于突触间隙传递化学信号的分子,为更好地监测突触间隙释放信号的分子,应开发更小尺寸的纳米电极,这些电极应具备电极尖端小于 10 nm、长径比大、与生物相容性好且易成批制取,并能自如地插入突触间隙,监测化学信号分子在突触间隙内的更精细的、更贴近真实的动力学特性.通过发展阵列纳米电极,可深入细胞内部探测亚细胞结构的局部信息,并实现多细胞信号网络的同步监测.

上世纪 90 年代初, Lewis 等^[38]首次成功组装了 1 nm Pt 电极,从而将其电子传递速率提高两个数量级.随后,有关纳米电极的构建方法有不少报道.最近, Mirkin 等^[39]报道了 3.7 nm Pt 电极的电子转移反应动力学,并将 40 nm Pt 电极插入细胞内,由于其直径比细胞直径小 1000 倍,电极插入细胞未造成细胞膜损伤,可测量细胞内氧化还原活性.根据我们的经验,金属电极的生物相容性差,由于细胞内蛋白质吸附极易毒化电极,在连续循环伏安扫描中,灵敏度不断下降,且难以再生,在生物分子电化学研究中应尽量避免使用.

碳电极的生物相容性好,因此在监测单细胞释放^[1]及快速监测脑的化学通讯^[2]研究中均采用碳纤维微电极. Kouklin 等^[40]将一束纳米碳管穿入微毛细管组装成纳米电极(直径 20 nm)插入阴茎的活细

胞内,细胞未见明显损伤,可测量细胞内特定部位的电活性物质,为一新思路. 但此纳米电极尖端长,无绝缘层,难以量化,且价值 2000~3000 美元/每支. 在细胞研究中,碳电极多次使用,仍有被毒化现象,电极消耗量大,一般恐难以承受. 关于纳米粒子对人的危害性一直存在争议. 最近,Porter 等^[41]报道将单壁碳纳米管(直径 0.6~3.5 nm)引入细胞研究对细胞的毒害,发现纳米碳管进入细胞 4 d 后对细胞产生明显毒害. 现在,应用纳米粒子的研究较多,它们容易进入细胞,但会对人体健康带来危害. 因此,深入探索突触间隙这样的超微生物微环境,开发更小尺寸的纳米电极仍是十分重要的途径.

5.2 集成化的微流控芯片

微流控芯片已成为细胞分析领域最活跃的研究方向之一,在芯片上能够成功构建细胞生理微环境,此外还可集成多种检测手段,如电化学及各种光谱学方法,同步获取细胞中的多维信息,将有望涌现出微型化、集成化和自动化的新一代技术方法.

将纳米芯片用于生物学分析,开始显示出希望平台,但在细胞与芯片界面控制及测量方面仍存在挑战. Helmke 等^[42]展望未来,主要在纳米级探索细胞生物学,认为只要在细胞与芯片界面能够形成集成系统,就能实现高分辨分析及控制细胞生理过程. 典型的微流控芯片长约 10 mm,当样品与试剂引入通道并混合,即可分选出单细胞. 纳米芯片长约 10 μm ,将细胞置于纳米纤维地毯上,阵列次微米探针可分别进行刺激细胞、检测细胞表面释放、检测细胞核及细胞浆等.

将来的芯片实验室能实时读出及解释大量集成的阵列信号,并具有良好的信噪比,阵列传感器应具有纳米级空间分辨及微秒级时间分辨率,且芯片应能重复制取,能全面深入地探索细胞间通讯.

5.3 扫描电化学显微镜等显微技术联用

在 Mirkin^[43]撰写的 21 世纪的 SECM 评述中,重点对纳米电极到单细胞成像等进行了展望. 最近,他们报道了在 SECM 研究中所开发的电化学 aL-pL 体积注射器,可准确将 aL 体积溶液注入活细胞^[44],并在 μL 体积溶液中检测单分子电化学^[45]等研究,有可能为 SECM 应用于单囊泡释放等生物超微环境研究提供有力的工具.

将纳米电化学探针与原子力显微镜(AFM)、扫描隧道显微镜(STM)及透射电子显微镜(TEM)等显微技术联用,可以提高时间分辨率及空间分辨率,获得细胞更精细的图像.

5.4 荧光显微成像

荧光显微成像是研究细胞内动力学过程常用的方法,并可与电化学法相互补充及验证. 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)及全内反射荧光显微镜(TIRFM)等成像技术是对细胞表面或内部分子分布与运动进行实时观测的重要手段. 在信号传导过程中,对囊泡的转运、锚靠、融合以及膜受体等研究方面已取得了重要结果. 但远场光学显微成像的空间分辨率由于受衍射极限的限制而难以深入到数十纳米的囊泡.

最近提出的以受激发射损耗(STED)荧光显微镜为代表的远场光学纳米显微镜(STED far-field optical nanoscopy)技术^[46],分辨率达到 10 nm 左右,已成功用于神经细胞释放过程中突触囊泡的实时观察^[47]. STED 较 LSCM 可获得更清晰、高分辨的单囊泡图像,从而打开了纳米尺度上细胞分子可视化的大门. 应用随机光学重建荧光显微镜三维超分辨成像技术可获得纳米细胞结构的三维形貌^[48],分辨率为 20~30 nm. 荧光显微成像一般均用荧光染料示踪,开发新型荧光探针(如量子点及荧光聚合物等),建立可视化示踪技术,从而研究分子在细胞表面及细胞内部的分布与运动. 将荧光显微成像与纳米电化学方法相结合,有望实现细胞信号传导过程中单分子事件的探测及定位.

近来,研究光透明电极,将电化学与光化学测量联用,同时对一个生物样品进行检测,使光谱电化学进入到一个新水平^[49]. Amatore 等^[50]探讨在透明氧化铟钛(ITO)微电极上,通过电化学与荧光显微镜结合用于监测及显示单个神经细胞释放,但未得到同步测量结果. 这是一个值得深入探索的研究方向.

参 考 文 献

[1] Amatore C., Arbault S., Guille M., et al. Chem. Rev. [J], 2008, 108: 2585—2621

- [2] Robsin D. L. , Hermans A. , Wightman R. M. , *et al.* . Chem. Rev. [J] , 2008 , **108** : 2554—2584
- [3] HU Shen(胡深) , WANG Zong-Li(王宗礼) , CHENG Jie-Ke(程介克) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 1996 , **17**(8) : 1207—1209
- [4] CHENG Jie-Ke(程介克) , WANG Zong-Li(王宗礼) . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 1997 , **18**(7) : 1046—1053
- [5] Wang J. H. , Huang W. H. , Cheng J. K. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2004 , **76** : 5293—5498
- [6] Huang W. H. , Wang Z. L. , Cheng J. K. , *et al.* . Chinese Science Bull. , English Edition [J] , 2000 , **45** : 289—294
- [7] CHENG Jie-Ke(程介克) . Single-Cell Analysis(单细胞分析) [M] , Beijing: Science Press, 2005
- [8] Zhang L. Y. , Wang Z. L. , Cheng J. K. , *et al.* . J. Chromatogr. B [J] , 2003 , **792** : 381—385
- [9] Westerink R. M. , Ewing A. G. . Acta Physiol. (Oxf.) [J] , 2008 , **192** : 273—285
- [10] HUANG Wei-Hua(黄卫华) , WANG Zong-Li(王宗礼) , CHENG Jie-Ke(程介克) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2001 , **22**(9) : 1561—1563
- [11] Huang W. H. , Wang Z. L. , Cheng J. K. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2001 , **73** : 1048—1052
- [12] Chen R. S. , Huang W. H. , Cheng J. K. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2003 , **75** : 6341—6345
- [13] Zeng Y. , Wang Z. L. , Cheng J. K. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2002 , **74** : 2441—2445
- [14] Chen H. , Huang W. H. , Cheng J. K. , *et al.* . Electrophoresis [J] , 2007 , **28** : 1579—1586
- [15] Huang W. H. , Wang Z. L. , Cheng J. K. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2004 , **76** : 483—488
- [16] Zhang B. , Adams K. L. , Ewing A. G. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2008 , **80** : 1394—1400
- [17] Fernandez P. C. , Navas S. , Toledo G. A. , *et al.* . Brain Res. Rev. [J] , 2005 , **49** : 406—415
- [18] Camacho M. , Machodo J. D. , Borges R. , *et al.* . J. Neurochem. [J] , 2006 , **96** : 324—330
- [19] Haynes C. L. , Siff L. N. , Wightman R. M. . Biochim. Biophys. Acta [J] , 2007 , **1773** : 728—735
- [20] Wightman R. M. . Science [J] , 2006 , **311** : 1570—1574
- [21] Schulte A. , Schuhmann W. . Angew. Chem. [J] , 2007 , **46** : 8760—8777
- [22] Wu W. Z. , Huang W. H. , Cheng J. K. , *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J] , 2005 , **127** : 8914—8915
- [23] Dernick G. , Gong L. W. , Lindau M. , *et al.* . Nature Methods [J] , 2005 , **2** : 699—708
- [24] Murray R. W. . Chem. Rev. [J] , 2008 , **108** : 2688—2720
- [25] Tel-vered R. , Walsh D. A. , Bard A. J. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2006 , **78** : 6959—6966
- [26] Shackman J. G. , Dahlgren G. H. , Kennedy R. T. . Lab. Chip [J] , 2005 , **5** : 56—63
- [27] Roman G. T. , Kennedy R. T. . J. Chromatogr. A [J] , 2007 , **1168** : 170—188
- [28] Roman G. T. , Cheyn Y. , Viberg P. , *et al.* . Anal. Bioanal. Chem. [J] , 2007 , **387** : 9—12
- [29] Dishinger J. F. , Kennedy R. T. . Electrophoresis [J] , 2008 , **29** : 3296—3305
- [30] Hafez I. , Kisler K. , Lindeu M. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. [J] , 2005 , **102** : 13879—13884
- [31] Susuki I. , Yasuda K. . Biochem. Biophys. Res. Commun. [J] , 2007 , **356** : 470—475
- [32] Bard A. J. , Li A. , Zhan W. . Biosens. Bioelectron [J] , 2006 , **22** : 461—492
- [33] Amemiya S. , Gao J. D. , Gross D. A. , *et al.* . Anal. Bioanal. Chem. [J] , 2006 , **386** : 458—471
- [34] DU Fu-Ying(杜富滢) , HUANG Wei-Hua(黄卫华) , CHENG Jie-Ke(程介克) , *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报) [J] , 2007 , **28**(6) : 1069—1071
- [35] Du F. Y. , Huang W. H. , Cheng J. K. , *et al.* . Biosens. Bioelectron [J] , 2008 , **24** : 415—421
- [36] Wang W. , Huang W. H. , Cheng J. K. , *et al.* . Analyst [J] , 2007 , **132** : 515—518
- [37] Sun P. , Laforge F. O. , Mirkin M. V. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. [J] , 2008 , **105** : 443—448
- [38] Penner R. M. , Heben M. J. , Lewis N. S. , *et al.* . Science [J] , 1990 , **250** : 1118—1121
- [39] Sun P. , Mirkin M. V. . Anal. Chem. [J] , 2006 , **78** : 6524—6534
- [40] Kouklin N. . Appl. Phys. Lett. [J] , 2005 , **87** : 2183—2191
- [41] Porter A. E. , Grass M. , Murrer K. , *et al.* . Nat. Nanotechnol. [J] , 2007 , **2** : 713—717
- [42] Helmke B. P. , Minerik A. R. . Proc. Natl. Acad. Sci. [J] , 2006 , **103** : 6419—6424
- [43] Sun P. , Laforge F. O. , Mirkin M. V. . Phys. Chem. Chem. Phys. [J] , 2007 , **9** : 802—823
- [44] Laforge F. O. , Carpino J. , Mirkin M. V. , *et al.* . Proc. Natl. Acad. Sci. [J] , 2008 , **104** : 11895—11900
- [45] Sun P. , Mirkin M. V. . J. Am. Chem. Soc. [J] , 2008 , **130** : 8241—8250
- [46] Hell S. W. . Science [J] , 2007 , **316** : 1153—1158
- [47] Westphal V. , Rizzoli S. O. , Lauterbach M. A. , *et al.* . Science [J] , 2008 , **320** : 246—249
- [48] Huang B. , Wang W. Q. , Zhuang X. W. , *et al.* . Science [J] , 2008 , **319** : 810—813
- [49] Dai Y. R. , Swain G. M. , Porter M. D. , *et al.* . Anal. Chem. [J] , 2008 , **80** : 14—22

[50] Amatore C. , Arbault S. , Chen Y. , *et al.* . *Angew. Chem. [J]* , 2006, **45**: 4000—4003

Probing Brain Chemistry —— Monitoring of Chemical Signal Molecules Release from Single-Cell, Single-Vesicle, Synaptic Cleft and Morphological Analysis with Nanoelectrochemistry

CHENG Jie-Ke^{*} , WANG Wei, WU Wen-Zhan, HUANG Wei-Hua^{*} , WANG Zong-Li
(*College of Chemistry & Molecular Science, Wuhan University, Wuhan 430072, China*)

Abstract The monitoring of chemical signal molecules release from single cells with spatial and temporal resolution is a very important fundamental research in probing brain chemistry. In recent years, we have investigated systematically chemical signal molecules release from single cells with the microelectrode and developed the monitoring of chemical signal molecules release from single vesicles, single synapses and synaptic clefts with spatial resolution using the nanoelectrode. We have initiated the quantitative analysis to detect morphological changes of single cells before and after release using scanning electrochemical microscopy (SECM). We first researched the microfluidic and array-electrode integrated microsystem and applied it to the perfusion culture and detection of neurotransmitter release from cells. In this paper, the above researches and the frontier researches of this area in the world are reviewed. The new viewpoints of the future development in this research area are suggested. This review includes real time monitoring of dopamine release from single-cell using the microelectrode, monitoring of dopamine release from single vesicle with spatial and temporal resolution using the nanoelectrode, monitoring and manipulation of quantal release from single cells on a microfluidic device, morphological changes of single cells before and after NO release using the scanning electrochemical microscopy, and future analytical challenges: (1) research of decreasing the size of the nanoelectrode, (2) development of the integrated microfluidic device, (3) coupling between amperometry and other analytical techniques such as SECM, AFM, STM, TEM and (4) combination of Fluorescence Microscopy and Amperometry.

Keywords Nanoelectrochemistry; Single cell; Single vesicle; Synaptic cleft; Morphological analysis

(Ed. : A, G)