

抑郁症相关活性分子的荧光成像^{*}

车飞达 赵晓茗 张馨 丁琪 王昕^{*} 李平^{*} 唐波^{*}

(山东师范大学化学化工材料与科学学院 济南 250014)

摘要 抑郁症是抑郁障碍的一种典型情况,给家庭和社会带来了极大的负担。目前病因及发病机制的不明确性极大地阻碍了有效抗抑郁药物的开发。抑郁症相关的活性分子例如活性氧、神经递质及蛋白质等水平变化在抑郁症的发生发展中扮演着关键角色。因此检测抑郁症相关活性分子对于理解抑郁症的发病机制尤为重要。荧光成像具有高灵敏度、直观、原位及实时等优点,因此,荧光成像技术已经成为监测抑郁症相关活性分子的有效方法。迄今为止,研究者们利用荧光成像技术实现了多种抑郁症相关活性分子的成像检测。综述了近五年抑郁症相关活性分子中的活性氧自由基(ROS),神经递质和相关酶的荧光成像检测的部分研究进展,并着重在相关荧光探针的发展方面进行了探讨和展望。

关键词 抑郁症; 荧光成像; 活性氧; 神经递质; 酶

Fluorescence Imaging of Active Molecules Associated with Depression^{*}

Che, Feida Zhao, Xiaoming Zhang, Xin
Ding, Qi Wang, Xin^{*} Li, Ping^{*} Tang, Bo^{*}

(Shandong Normal University, College of Chemical Materials and Science, Jinan 250014)

Abstract Depression is a typical condition of depressive disorder, which takes great burden to family and society. However, the current uncertainty about the etiology and pathogenesis has greatly hindered the development of effective antidepressant drugs. Changes in the levels of active molecules associated with depression, such as reactive oxygen species, neurotransmitters and proteins, play a key role in the occurrence and development of depression. Therefore, detection of active molecules related to depression is particularly important for understanding the pathogenesis of depression. Fluorescence imaging has the advantages of high sensitivity, intuition, *in situ*, real-time, etc. Therefore, fluorescence imaging technology has become an effective method to monitor the active molecules related to depression. Researchers have effectively detected these active molecules using fluorescence imaging. The recent progress in fluorescence imaging detection of reactive oxygen species (ROS), monoamine neurotransmitters and monoamine oxidase in the active molecules associated with depression in the past five years are reviewed with focus on the development of fluorescence probes and prospects.

Keywords depression; fluorescence imaging; reactive oxygen species (ROS); neurotransmitter; enzyme

1 引言

抑郁症是一种情绪障碍,具有极高的发病率和致死致残率,为家庭和社会带来了极大的精神和经济负担^[1]。核心症状是情绪低落、快感缺乏、易怒、难以集中注意力、食欲和睡眠异常等^[2]。若要实现抑郁症的有效预防和治疗,必须对抑郁症的发生和发展过程进行彻底的了解。然而,目前抑郁症因其致病因素复杂、病因不清及发病机制不详,一直是神经科学领域的一大难题。现有研究表明,抑郁症相关的活性分子包括神经递质、相应的合成或水解酶、活性氧自由基(ROS)等,在抑郁症的发生发展过程中发挥至关重要作用^[3-4]。

大脑因其耗氧量高,脂肪含量丰富,极易发生氧化

应激且对氧化应激尤为敏感^[5]。研究表明,大脑中氧化应激即 ROS 过量产生,造成大量蛋白质、核酸等生物大分子的损伤,从而导致抑郁症的发生与发展。如 Maes 课题组^[6]指出重度抑郁症的患者体内 ROS、过氧化物和黄嘌呤氧化酶等氧化性物质水平显著增加,而维生素 E、锌和辅酶 Q10 等一些关键抗氧化剂的浓度以及谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)等抗氧化酶活性明显降低; Bilici 课题组^[7]发现抑郁症患者血液中的 ROS 含量较高,同时抗氧化酶活性和脂质过氧化水平增高,作者认为可能是免疫炎症应答的激活、单胺类物质的分解代谢和异常脂质化合物导致了 ROS 的过量产生。同时,5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)和去甲肾上腺素(NE)等神经递质在大脑正常生理活动中起到重要作用。例如 Schildkraut

^{*} Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

^{*} E-mail: xinwang@sdu.edu.cn; lip@sdu.edu.cn; tangb@sdu.edu.cn

Received April 30, 2023; published June 27, 2023.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22134004, 21927811, 22074083) and the Natural Science Foundation of Shandong Province of China (No. ZR2020ZD17).

^{*} 庆祝《化学学报》创刊 90 周年。

项目受国家自然科学基金(Nos. 22134004, 21927811, 22074083)及山东省自然科学基金(No. ZR2020ZD17)资助。

等^[8]发现抑郁症的发生是由于大脑中枢神经系统中去甲肾上腺素(NE)含量不足所致; Coppen 等^[9]认为抑郁症的发生是中枢神经系统中血清素功能下降, 释放 5-HT 减少, 突触间隙含量下降所致; Randrup 等^[10]则发现某些抑郁症患者脑内多巴胺(DA)功能降低, 认为 DA 可能参与抑郁症的发生; Janowsky 等^[11]认为乙酰胆碱(ACh)能神经元亢进和肾上腺素(E)能神经元功能低下, 导致抑郁症的发生. 脑内 ACh 能神经元过度活动, 可能导致抑郁; 而 E 能神经元过度活动, 可能导致躁狂. 因此, 分析 ROS、神经递质等生物活性分子的种类和浓度变化对揭示抑郁症的发生发展机制显得尤为重要.

目前针对 ROS、神经递质、相关蛋白的传统检测方法包括循环伏安法^[12-13]、液相色谱法^[14]、免疫荧光染色^[15]和原位杂交^[16]等. 然而, 这些方法大多是离体检测, 且操作复杂, 尤其不能实现细胞及活体水平抑郁症相关活性分子的原位、实时检测, 造成对生物活性分子的时空信息难以获取的问题, 严重阻碍了对抑郁症分子机制的探究. 而荧光成像技术因其时空分辨率高、无侵入性及操作简单等特点, 更适用于生物活性分子的活体、原位成像检测及相关信号通路研究^[17-20], 为理解抑郁症的发生发展提供了新思路. 而荧光成像技术的应用, 最关键的是荧光成像探针的开发^[21-26]. 因此, 近年来研究者们针对抑郁症活性分子难以精准检测的难题, 设计了一系列小分子、蛋白和纳米荧光探针等, 实现了对脑部 ROS、神经递质和相关蛋白等抑郁症活性分子的原位荧光成像检测. 本文对近五年抑郁症相关活性分子中的 ROS、神经递质及相关蛋白等的荧光成像方法进行了系统综述, 并对未来开发新型荧光探针用于脑部荧光成像, 进一步揭示抑郁症分子机制等方面进行了探讨与

展望, 有望为全面了解抑郁症的具体机制提供参考与借鉴.

2 抑郁症相关活性分子的荧光成像研究进展

2.1 抑郁症相关 ROS 的荧光成像

ROS 被认为在生物体中起着双重作用. 它们是一些重要信号传导反应所必需的, 过量的 ROS 会导致细胞氧化应激^[27]. 大脑中氧化应激即 ROS 过量产生, 造成大量蛋白质、核酸等生物大分子的损伤, 从而导致抑郁症的发生与发展^[6]. 鉴于 ROS 独特的作用, 近年来我们课题组发现的抑郁小鼠脑内臭氧(O_3)、超氧阴离子自由基(O_2^-)及羟基自由基($\bullet OH$)等 ROS 水平的增加, 以及 Mn-SOD 和 SIRT1 等抗氧化酶活性的降低, 为抗抑郁治疗提供了新的靶点.

O_2^- 是最先产生的 ROS, 其水平的高低直接反映了氧化应激的程度. 因此, 我们^[28]首先发展了一种含 Te 的碳量子点(CDs)探针 **1**(图 1), 用于抑郁小鼠模型脑部 O_2^- 的原位、动态成像. 基于 Te 和 Te=O 之间的氧化还原循环, **1** 具有动态、可逆、瞬时、高灵敏度(LOD ≈ 8.0 pmol/L)的检测 O_2^- 的能力. 利用 **1**, 观察到在小鼠剧烈运动、易怒和轻度抑郁时, O_2^- 水平显著升高. 这项工作为从 ROS 水平揭示急性运动和情绪变化对健康的影响提供了一种新的成像工具.

过氧化物酶体作为细胞内调控氧化应激过程的重要细胞器, 在维持细胞氧化还原稳态方面发挥着举足轻重的作用^[29]. 基于此, 我们^[30]设计了一种能够靶向过氧化物酶体内的双光子荧光探针 **2**(图 1), 首次实现了对抑郁小鼠脑部过氧化物酶体内 O_2^- 的实时可视化. **2** 以咖啡

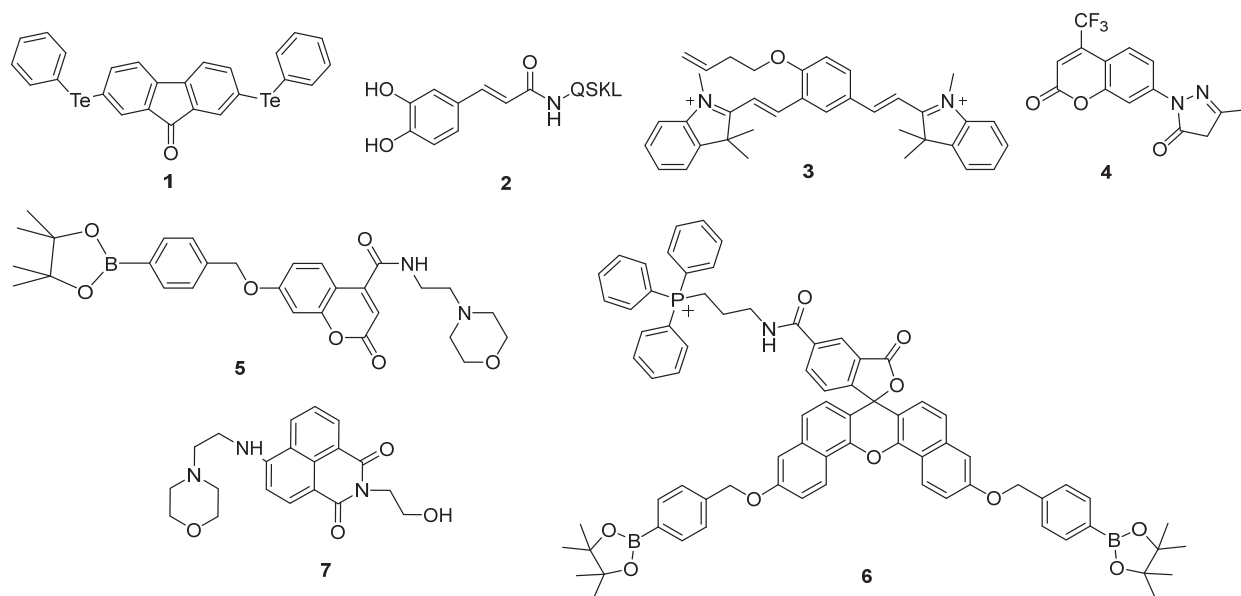


图 1 成像 ROS 相关荧光探针的化学结构

Figure 1 Chemical structure of ROS related fluorescent probes

酸作为 O_2^- 的荧光团和识别基团, 以含有 SKL (-Ser-Lys-Leu-) 的小肽作为过氧化物酶体靶向基团. 在 O_2^- 存在的情况下, **2** 结构中的供电子邻苯二酚基团可被氧化形成吸电子的邻苯二醌基团, 从而改变探针结构的电子分布, 发出强荧光, 从而实现对过氧化物酶体内 O_2^- 的可识别成像. 利用 **2**, 我们发现氧化应激过程中过氧化物酶体内过量产生的 O_2^- 导致过氧化氢酶(CAT)失活. CAT 活性降低会导致细胞内过氧化氢的过量产生, 从而进一步降低色氨酸羟化酶 2 (TPH2) 水平, 进而导致小鼠大脑中 5-HT 下降, 最终导致抑郁的发生. 这项工作作为过氧化物酶体内 O_2^- 介导的抑郁症信号通路提供了直接证据.

对于应用在生物组织的荧光成像, 近红外荧光成像具有组织穿透较深和背景荧光较弱等优势^[31]. 因此, 我们^[32]构建了一种近红外(NIR)荧光探针 **3**(图 1)成像抑郁小鼠大脑中 O_3 的变化. **3** 使用花菁衍生物(Cy7)作为荧光团, 3-丁烯基作为识别基团. O_3 可以与 3-丁烯基末端烯烃发生特异的环加成反应, 将 ACy7 转化为醌衍生物 QCy7, 扩大共轭体系, 从而发出明亮的近红外荧光, 实现 O_3 的检测. 利用 **3**, 原位观察到抑郁症小鼠脑部 O_3 水平升高促进 IL-8 的过量产生, 参与了抑郁症的发生发展. 这项工作作为 O_3 与抑郁症之间的正相关提供了直接证据, 并将有助于更全面地阐明与氧化应激相关的抑郁症发病机制.

•OH 作为氧化能力最强的 ROS, 能够造成生物大分子的严重损伤, 加速细胞衰老、死亡, 从而导致神经系统疾病的发生, 探究活体脑部•OH 浓度变化与抑郁症的关系, 将有助于加深对抑郁症发生发展分子机制的理解^[33]. 基于此, 我们^[34]设计并合成了第一个成像分析抑郁小鼠脑部•OH 的双光子荧光探针 **4**(图 1). **4** 以带有三氟甲基基团的香豆素(Cou151)作为荧光团, 以吡咯烷酮作为•OH 的特异性识别基团. 探针与•OH 发生自由基加成反应后造成分子内电荷转移, 导致探针的荧光增强; **4** 结构中的三氟甲基有助于分子穿过血脑屏障到达大脑. 利用 **4** 进行双光子成像, 结果表明, •OH 的浓度在轻度与重度刺激导致的抑郁行为中有不同程度的上升. 通过蛋白质质谱分析进一步发现•OH 是通过氧化使去乙酰化酶 1 (SIRT1) 失活, 从而造成抑郁症的发生. 该工作作为阐明抑郁症的发生、发展分子机制、寻找治疗靶点及预后评价提供了新方法.

过氧化氢(H_2O_2)作为细胞内含量最多的一种 ROS, 对脑部 H_2O_2 含量变化进行探究有助于理解抑郁症的发病机制^[35]. 因此, 我们^[36]构建了荧光探针 **5** 来检测溶酶体中的 H_2O_2 , **6** 来检测线粒体中的 H_2O_2 , 从而实现溶酶体和线粒体中 H_2O_2 协同变化检测(图 1). **5** 和 **6** 均选择苯硼酸酯作为识别基团. **5** 以香豆素作为荧光基团, 吗啉基团作为溶酶体靶向基团; **6** 以萘荧光素作为荧光基团, 三苯基膦作为线粒体的靶向基团. 通过荧光成像, 我们发现线粒体 H_2O_2 介导抑郁症小鼠大脑溶酶体中葡萄糖

脑苷脂酶(GCase)活性降低. 这项工作作为理解抑郁症的发病机制提供了有力的工具.

次溴酸(HOBr)作为一种 ROS 可以损伤细胞中蛋白质或脂质等, 影响细胞正常生理功能^[37]. 我们^[38]开发了一种荧光探针 **7**(图 1), 用于实时可视化活体中 HOBr. **7** 以 1,8-萘酰亚胺为荧光基团, *N*-(2-氨基乙基)-吗啉为溶酶体的靶向基团和 HOBr 的识别基团, 并引入羟基增加探针的溶解度. **7** 与 HOBr 相互作用后, HOBr 引发叔胺的芳族取代迅速发生. **7** 对 HOBr 具有选择性好、响应快 (5 s) 及灵敏度高[检测下限(LOD)=15 nmol/L]等优点. **7** 可以实现检测到炎症组织、乳腺癌组织和抑郁症小鼠大脑中的 HOBr 增加, 为探究 HOBr 相关疾病提供了有效工具.

2.2 抑郁症相关神经递质的荧光成像

大量研究表明, 抑郁症的发生与神经递质的水平及功能异常密切相关^[8-11]. 5-HT 作为重要的神经递质之一, 主要负责调节情绪、食欲和睡眠等, 在维持大脑中的情绪平衡中起着至关重要的作用^[39]. 为了探究 5-HT 在抑郁症发生发展过程中的作用, 研究人员构建了多种荧光成像材料实现对 5-HT 的水平变化的原位成像.

Looger 等^[40]利用机器学习进行辅助, 应用绑定口袋重新设计的策略, 创建了一种 5-HT 荧光传感器(iSeroSnFR). iSeroSnFR 可以用于成像自由活动的小鼠在恐惧条件反射、社会互动和睡眠/觉醒过渡过程中脑部 5-HT 的释放(图 2). 在此工作的基础上, 作者还开发了一种检测 5-HT 转运体功能和药物筛选的新方法. 这种机器学习引导的绑定口袋重新设计的策略为 5-HT 的成像提供了重要参考.

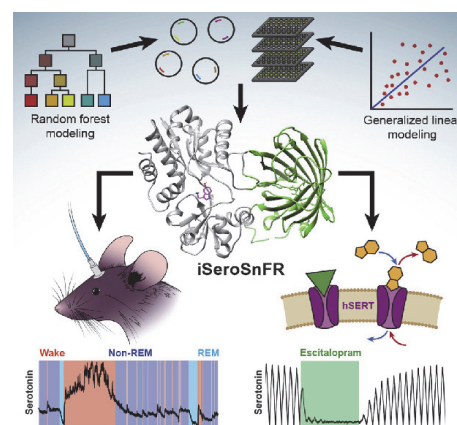


图2 iSeroSnFR 的原理示意图^[40]

Figure 2 Schematic diagram of iSeroSnFR^[40] (Copyright 2020 Elsevier)

Li 等^[41]开发了一种基于 G 蛋白偶联受体的基因编码荧光传感器(GRAB_{5-HT}), 用于 5-HT 的原位成像检测. GRAB_{5-HT} 对 5-HT 具有较高的亲和力($EC_{50} \approx 22$ nmol/L)、较快的检测速度($\tau_{on} \approx 70$ ms)及较高的特异性, 能够检测在多种生理和病理条件下果蝇和小鼠神经元

内 5-HT 的释放,并观察到在小鼠的睡眠-觉醒周期中 5-HT 水平动态变化(图 3). GRAB_{5-HT} 为探究 5-HT 信号传导的相关机制提供了重要的方法.

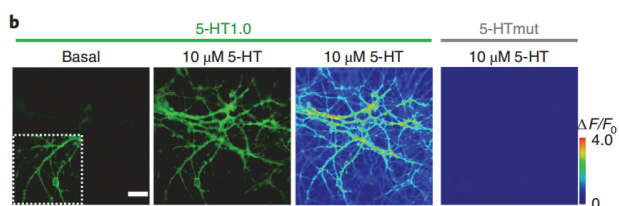


图 3 表达 5-HT1.0(绿色)或 5-HTmut(灰色)的大鼠皮层神经元荧光反应的代表性图像(左)、荧光反应轨迹(中)和组数据(右)^[41]

Figure 3 Representative images (left), fluorescence response traces (middle) and group data (right) of the fluorescence response in cultured rat cortical neurons expressing 5-HT1.0 (green) or 5-HTmut (gray)^[41] (Copyright 2023 Springer Nature)

基于荧光单壁碳纳米管(SWCNTs), Kruss 等^[42]设计了一种近红外(NIR)荧光纳米传感器(NIRSer),实时成像人血小板中 5-HT 的释放.该纳米传感器由 SWCNTs 和可以与 5-HT 结合的 DNA 适配体组成.当适配体与 5-HT 结合时,构象发生变化,使 SWCNTs 发出近红外荧光. NIRSer 可以对 5-HT 进行可逆检测,其解离常数为 (301 ± 138) nmol/L,在相关生理区域的动态线性范围为 100 nmol/L~1 μ mol/L. NIRSer 具有优异的时空分辨率,能够在细胞水平上成像血小板所释放的 5-HT,追踪 5-HT 释放的位置,并量化刺激血小板和释放 5-HT 之间的时间延迟(约 21~30 s),展示出可应用于细胞间化学通信成像方面的潜力.

DA 在奖励动机行为、控制运动、情绪、注意力和学习等方面起着至关重要的作用^[43].当 DA 在大脑中释放时,有助于刺激大脑的奖励系统,从而产生愉悦感并加强行为^[43].多项研究表明,抑郁症患者脑中 DA 含量降低.因此,科学家们发展了多种 DA 的荧光成像方法,并探究了 DA 相关的抑郁症分子机制.

Liu 等^[44]采用水热方法制备成了氮和硼共掺杂碳量子点(NB-CQDs),用于丙酮与 DA 的多色细胞成像(图 4). NB-CQDs 可以检测 0.1~70 μ mol/L 范围内的 DA (LOD=11 nmol/L),但其荧光强度与多巴胺浓度成反比. NB-CQD 具有广泛应用的巨大潜力,如水和空气质量监测、食品质量监督和生物医学控制等.

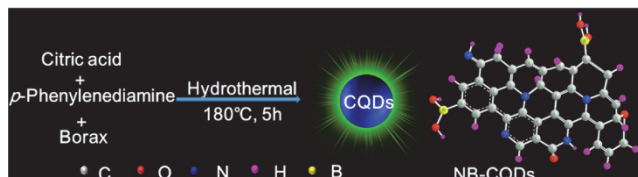


图 4 NB-CQDs 的制备工艺示意图^[44]

Figure 4 Schematic preparation process of NB-CQDs^[44] (Copyright 2018 Elsevier)

Salimi 等^[45]也采用简单的一锅水热合成方法将中性红染料、尿素和柠檬酸三钠制备成聚合物点(Pdot),用于 DA 的检测.该 Pdots 在 435 nm 处表现出较强的荧光.由于内滤光效应(IFE)和静态猝灭效应(SQE),DA 可以将 Pdots 明亮的荧光猝灭.该 Pdots 具有选择性好、灵敏度高(LOD=0.28 nmol/L)及细胞毒性低等优点.该 Pdots 能够在液滴微流控装置上对单个活细胞中 DA 的分泌进行成像.该技术为神经递质相关的疾病提供了可靠的方法和理想的平台.

Liu 等^[46]发展了一种基于碳点(CDs)和 7-氨基-4-甲基香豆素(AMC)的双发射比率荧光传感系统,用于 DA 的快速检测.在 300 nm 的激发波长下,该系统有两个荧光发射双峰,分别位于 455 和 505 nm,通过监测荧光强度的比值变化可以定量检测 DA.该方法对 DA 的检测具有良好的灵敏度(LOD=5.67 nmol/L)和选择性,对 DA 的检测具有借鉴意义.

Ding 等^[47]利用微波加热方法将 L-半胱氨酸与柠檬酸合成为一种具有高荧光量子产率的碳点.由于氨基和巯基与碳点的结合提高了荧光性能,该碳点具有较高的荧光量子产率(高达 85%).该碳点可以用于检测 DA 并且具有良好的选择性.更重要的是,该碳点可以应用于 CRL-5822 细胞和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)内 DA 的成像.综上所述,该碳点有潜力成为高效生物传感和生物成像的强有力工具.

Kolekar 等^[48]利用水热合成法制备出一种氮杂碳点作为检测 DA 的荧光探针. DA 可以猝灭该碳点的荧光,且该荧光强度的变化仅由 DA 引起,表明该碳点对 DA 的检测具有良好的选择性与特异性.该碳点具有优异的灵敏度(LOD=1.97 μ g/mL).此外,该碳点具有良好的生物相容性,可用于 HeLa 细胞的多色荧光成像.该碳点在探究 DA 相关的生物医学研究中具有广阔的应用前景.

Kim 等^[49]开发了一种漆酶固定化纤维生物传感器用于检测 DA.作者先将姜黄素和二甲基甲酰胺制备成碳点(CDs),再用硅前体(3-(氨基丙基)-三乙氧基硅烷)将这些碳点功能化,得到 APT-CDs,最后将漆酶固定在 APT-CD 上,得到该传感器.该生物传感器对 0~30 μ mol/L 线性范围内的 DA 具有明显的荧光猝灭效应,检测限为 41.2 nmol/L.此外,该生物传感器具有良好的光稳定性和生物相容性,在 SH-SY5Y 细胞和具有蓝色、绿色和红色发射的光纤中,该传感器均展现出了优越的多色成像特性.更重要的是,在人血清和脑脊液样本的检测中,该生物传感器表现出了优异的成像能力.此工作为构建其他成像 DA 的荧光传感器提供了新的设计思路.

Tian 等^[50]开发了基于基因编码的 DA 传感器 RdLight1,其能够实现自由活动动物的脑内 DA 动态、高分辨成像. RdLight1 具有红色荧光发射,光稳定性好,

生物体内信噪比低等. RdLight1 一方面能够在细胞水平上评估 DA 释放和特异性监测 DA 神经元的活动(图 5), 另一方面能够对自由活动的大鼠脑内的 DA 释放进行监测. RdLight1 为探究 DA 生物学相关生理过程提供了重要工具, 也为相关传感器的开发开辟了一种新的途径.

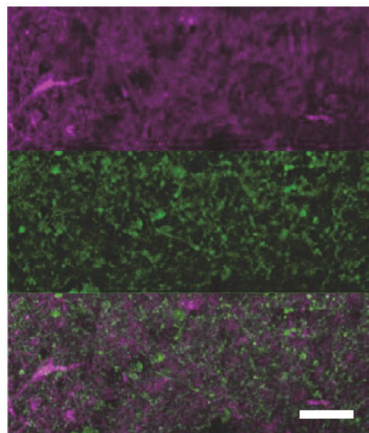


图 5 野生型大鼠脑内注射 RdLight1 和注射 GCaMP6f 的双色光度图 (红色为 RdLight1, 绿色为 GCaMP6f)^[50]

Figure 5 Top, schematic of dual-color photometry in the NAc of wild-type rats coexpressing RdLight1 injected in the NAc and axon-GCaMP6f injected in mPFC. Bottom, representative micrograph showing RdLight1 in red and axon-GCaMP6f in green^[50] (Copyright 2023 Springer Nature)

Li 等^[51]基于 G 蛋白偶联受体和荧光蛋白发展了基因编码 DA 传感器 GRAB_{DA}. 在对细胞外 DA 的检测中, GRAB_{DA} 表现出明显的荧光信号增强, 具有亚细胞分辨率、亚秒瞬时响应以及纳摩尔级亲和力. 此外, GRAB_{DA} 能够检测到小鼠大脑切片中 DA 释放和果蝇中单个神经元诱发的 DA 释放, 并报告了自由活动小鼠脑中光遗传诱导的黑质纹状体 DA 释放以及中伏隔多巴胺能神经元的活动. GRAB_{DA} 还可以追踪体内不同回路中多巴胺能

神经元信号传导和神经元活动. GRAB_{DA} 能够用于探究 DA 相关生理活动的信号通路, 为阐述神经化学活动提供了一种多色成像工具.

低水平的 NE 通常与抑郁症的发病机制有关. 因此, 研究人员在可视化去甲肾上腺素方面开展了大量的工作. 如 Yin 等^[52]开发了一种小分子荧光探针 **8**, 使用“保护-去保护”策略特异性检测 NE. **8** 以花菁作为荧光团. NE 的 β -羟基乙胺部分可与碳酯通过亲核取代和分子内亲核环化反应释放荧光团(图 6). **8** 能够在复杂的生物系统对 NE 进行特异性检测, 评估抗抑郁药物对 NE 干预的作用(图 7). 这一策略为开发神经递质荧光探针提供了新的思路, 也为探究 NE 及其相关疾病的分子机制提供了有效工具.

Huo 等^[53]设计了一种比率型荧光探针 **9**(图 6), 用来检测 NE 水平的变化. **9** 是由香豆素作为荧光团, 吡喃盐作为识别基团. NE 的分子内氢键促进了氨基与苊盐中双键的快速活化, 进而促进了级联亲核取代反应的快速发生. **9** 可以实现嗜铬细胞瘤肿瘤发展过程中 NE 水平波动的荧光可视化. **9** 的设计思路有助于开发新型 NE 荧光探针, 并在 NE 相关病理机制的研究中具有潜在的应用价值.

Huo 等^[54]开发了一种 NIR 荧光探针 **10**(图 6)用于在细胞水平成像 NE 的变化. **10** 以半花菁偶联苯并脲作为 NIR 荧光团, 噻吩作为 NE 的识别基团. **10** 与 NE 发生两个亲核加成反应, 噻吩基团离去, 释放出荧光团, 从而实现对 NE 的特异性检测. 作者以 PC12 为细胞模型, 利用 **10** 探究了抑郁细胞和正常细胞中 NE 的含量和释放量, 发现抑郁细胞和正常细胞中 NE 含量无显著性差异. 然而, 抑郁细胞中 NE 的释放量明显低于正常细胞. 此外, 作者还发现 NE 受体的抑制可能会影响 NE 的正常释放. 这为抑郁症的诊疗研究提供了新的靶点.

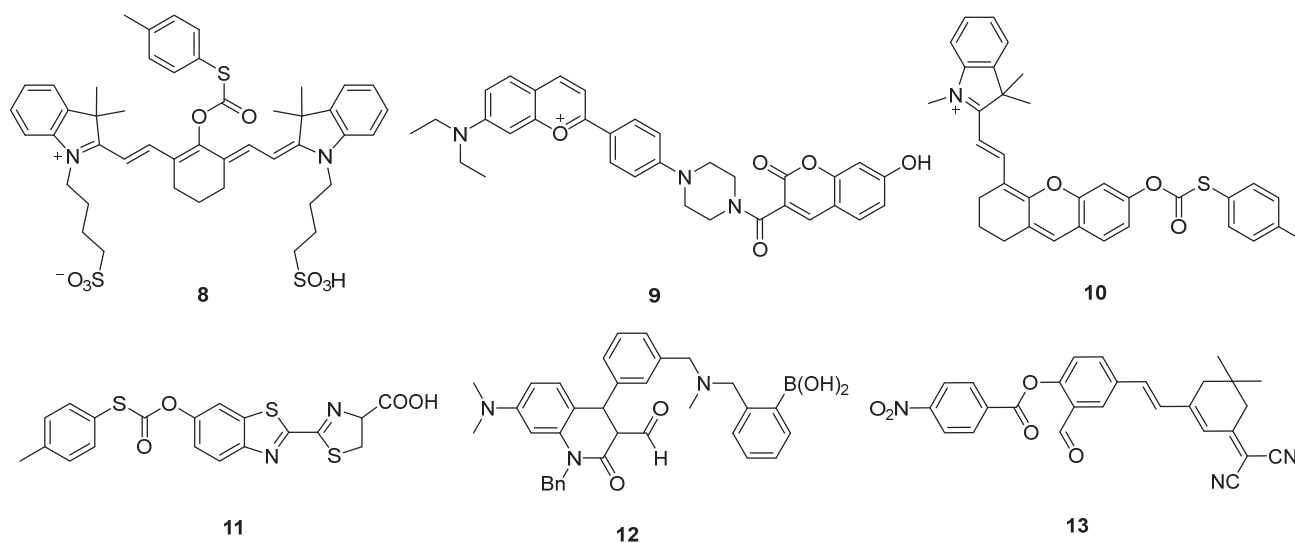


图 6 成像神经递质相关荧光探针的化学结构

Figure 6 Chemical structure of neurotransmitter related fluorescent probes

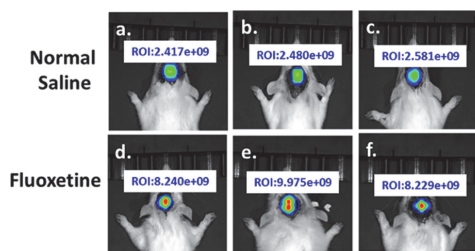


图7 利用8(a~c)大鼠腹腔注射生理盐水的体内成像和(d~f)腹腔注射氟西汀的大鼠的体内成像^[52]

Figure 7 (a~c) *In vivo* imaging of rats intraperitoneally injected with saline and (d~f) *in vivo* imaging of rats intraperitoneally injected with fluoxetine^[52] (Copyright 2020 American Chemical Society)

Li 等^[55]开发了一种“turn-on”型的 NE 生物发光探针 **11**(图 6)。**11** 在荧光素的基础上, 连接甲苯硫醇基团用于 NE 的识别。甲苯硫醇阻止了荧光素与荧光素酶的反应。在 NE 与 **11** 反应后, 荧光素被释放出来, 从而发出荧光。**11** 对 NE 的荧光响应具有选择性高和灵敏度高优点, 能够在转基因活体小鼠中 NE 的体内成像。**11** 有助于促进研究 NE 相关的病理生理学, 并具有探究 NE 的药理机制的潜在的应用价值。

Glass 等^[56]设计合成了一种对儿茶酚胺具有高亲和力的荧光传感器 **12**(图 6), 用来观察活细胞中 NE 的释放。**12** 是由喹诺酮类作为荧光团, 以硼酸基团作为儿茶酚胺识别基团, 可用于可视化活细胞中的 NE 释放。

Yin 等^[57]提出了一种“狩猎-射击”策略 **13**(图 6), 旨在提高 NE 荧光探针的特异性和响应率。在 **13** 中, 作者选择 2-(环己基-2-烯-1-酰基)丙二腈衍生物作为荧光团, 并在酯基(或苯磺酸盐)的邻位上引入了一个醛基团, 以创建一个双位点探针。该探针能够成功穿透血脑屏障, 并用于观察小鼠脑内 NE 释放的变化。此外, 通过脑组织解剖研究详细揭示了不同脑区 NE 的分布和水平变化。这一工作为开发血脑屏障穿透荧光探针提供了新策略, 并为神经系统疾病的诊断和发病机制研究提供了有效工具, 对中枢神经源性药物的评价和筛选具有指导意义。

Li 等^[58]基于 G 蛋白偶联受体开发了两种基因编码传感器(GRAB_{NE1m} 和 GRAB_{NE1h}), 用于 NE 的成像检测。这类传感器具有选择性高和稳定性好等优点。病毒或转基因介导表达的 GRAB_{NE} 传感器能够检测斑马鱼和小鼠大脑切片中电刺激诱发的 NE 释放。在活体小鼠中, GRAB_{NE} 传感器可视化了光刺激触发的蓝斑核(LC)中 NE 的释放以及在多种应激相关行为中下丘脑 NE 水平的波动。因此, GRAB_{NE} 传感器是快速和特异性监测体内生理和病理过程中 NE 传递的有力工具。

Qi 等^[59]设计并构建了同时成像分析细胞内温度和 NE 的荧光探针。该探针由聚(*N*-异丙烯酰胺), 1-[4-(7-硝基喹啉[1,2,5]噻二唑-4-基)哌嗪-1-基]-丙烯(PNIPAm-AANBD)和(*E*)-1-(4-硼烷)-2-(2-(1,3-二噁-1*H*,3*H*-苯并

[*de*]-异铬烯-6-yl)乙烯基)吡啶-1-甲基溴(PHE)组成。PHE 中的萘酰基团与 NE 的氨基结合形成萘基-NE, 能够特异性地检测 NE。PNIPAm-AANBD 则对温度变化有良好的响应。利用该荧光探针, 可以同时可视化 NE 再摄取过程中细胞内温度和 NE 的变化。随着抗抑郁药物的不断发挥作用, 作者观察到细胞内温度升高了 1.2~2.1 °C, NE 再摄取降低了约 21.5 μmol/L。通过测量神经递质再摄取过程中细胞内温度和 NE 的变化, 可以阐明神经递质信号通路的潜在机制, 这将有助于抗抑郁药物及其他治疗手段的开发。

2.3 抑郁症相关酶的荧光成像

单胺氧化酶(MAO)是一种分解多巴胺、血清素和去甲肾上腺素等单胺类神经递质的酶, 具有 MAO-A 和 MAO-B 两种亚型, 与抑郁症的发生发展密切相关^[60]。此外非典型抑郁症是重度抑郁障碍的一种亚型, 与高 MAO 活性有关。MAO 抑制剂(MAOIs)可以通过抑制 MAO 的活性来提高大脑中多巴胺、血清素和去甲肾上腺素等水平, 从而缓解抑郁症状^[61]。基于此, 大量研究人员通过荧光成像的方式探究了 MAO 参与的相关机制。

Liu 等^[62]合成了 **14**(图 8), 用于 MAO 成像检测。**14** 是在三苯基膦的基础上, 将苯环转变为萘, 再连接哌嗪。哌嗪基团作为电子供体可以保证 ICT 化合物的有效发光, 其中仲胺部分可以增大亲水性并作为 MAO 的识别基团。MAO 将亲水基团氧化成疏水基团, 实现反应诱导的聚集诱导发光(AIE)过程, 增大荧光。细胞成像实验表明, **14** 可能是一种很有前途的可实时监测活细胞中 MAO 活性的探针。此外, 这种策略也可适用于为其他酶设计特异性探针。

Kamkaew 等^[63]开发了一种 AIE 荧光探针 **15**(图 8), 通过酶促反应检测活细胞内的 MAO。**15** 中的丙胺部分作为 MAO 识别基团。当 **15** 与 MAO 反应后, 再发生 β-消除, 释放出具有 AIE 效应的荧光基团, 实现对 MAO 的检测。**15** 在溶液和活细胞中都能够 5 min 内实现对 MAO 活性进行快速检测。**15** 还可用于细胞中 MAO 的实时和原位成像, 具有良好的光稳定性、高分辨率和长期跟踪能力等优势。**15** 具有作为探究 MAO 相关机制的有效工具的潜力。

Liu 等^[64]利用三芳基硼化合物开发了一种新型荧光探针 **16**(图 8)。亲水十二环基团作为识别基团, 并可功能化疏水三芳基硼化合物。在分子结构中引入疏水二苯胺基团, 以调节探针的亲水性, 从而可以实现反应诱导的 AIE。MAO 可以催化十二环基团中仲胺的氧化, 氧化反应一方面降低了分子的柔韧性, 另一方面降低水溶性从而使探针容易聚集, 聚集导致荧光光谱的蓝移, 实现比率检测 MAO。此外, **16** 可以将表达 MAO 的细胞与其他细胞区分开来, 实时监测细胞中的 MAO 水平。这种反应诱导的聚集策略也可能适用于为其他目标分析物设计特异性探针。

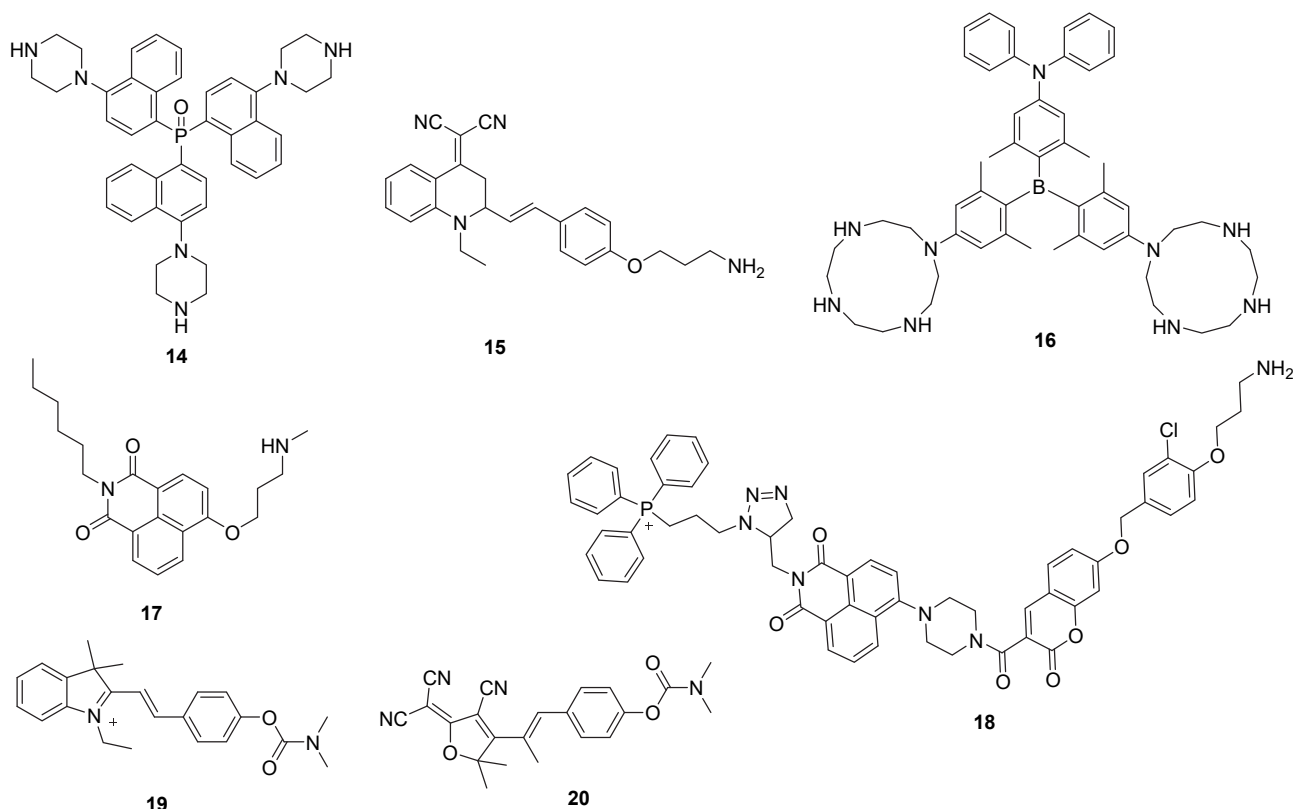
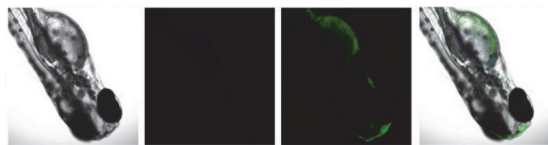


图8 成像抑郁症相关酶的荧光探针

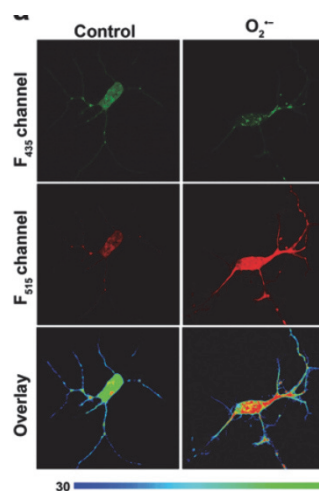
Figure 8 Chemical structure of MAO related fluorescent probes

Qu 等^[65]开发了一种比率荧光探针 **17**(图 8), 用于检测活细胞和斑马鱼中的单胺氧化酶 A (MAO-A)(图 9). **17** 是以 1,8-萘酰亚胺作为荧光团, 仲胺作为 MAO-A 的识别基团. **17** 本身发出蓝色荧光, 与 MAO-A 反应后释放出具有绿色荧光的 4-羟基-1,8-萘酰亚胺, 进而对该酶产生比值荧光信号响应. 与之前的探针 **1** 相比, **17** 的反应速度更快, 同时探针 **17** 的荧光响应受温度的影响较小. 此外, **17** 不仅能够检测活细胞内的内源性 MAO-A, 而且被成功应用于斑马鱼的成像(图 9), 显示了其在各种生物系统中检测 MAO-A 的良好潜力.

图9 探针 16 孵育的斑马鱼荧光图像^[65]Figure 9 Fluorescence images of zebrafish for incubated with Probe **16**^[65] (Copyright 2020 Elsevier)

Tian 等^[66]开发了一种比率荧光探针 **18**(图 8), 用于选择性测量神经元中的线粒体 MAO-A(图 10). 在 **18** 中, 香豆素苯氧基丙胺衍生物(CMPA)可以通过分子内电荷转移(ICT)产生荧光变化. 苯氧基丙胺(PA)基作为 MAO-A 特异性响应单元, 可以被 MAO-A 氧化形成一个羟基香豆素衍生物并激活 ICT 过程. *N*-丙炔基-4-哌嗪基-1,8-

萘酰亚胺(PPNP)可以作为能量受体与 CMPA 发生荧光共振能量转移(FRET), 从而实现比率定量检测 MAO-A. 在研究中还发现 O_2^- 诱导 MAO-A 水平升高, 进一步激活线粒体 TRPM2 通道, 导致 Ca^{2+} 流入线粒体. 这一工作有助于理解 MAO-A 在氧化应激等病理过程中的作用. 该分子设计策略可以合理地扩展到可能与大脑事件相关的神经递质、氨基酸、蛋白质等其他生物分子上.

图10 在 **17** 存在下, $80\ \mu\text{mol/L}$ O_2^- 刺激神经元的荧光图像^[66]Figure 10 Fluorescence images of $80\ \mu\text{mol/L}$ O_2^- stimulated neurons in the presence of **17**^[66] (Copyright The Royal Society of Chemistry 2022)

乙酰胆碱酯酶(AChE)是一种在大脑中分解神经递质乙酰胆碱(ACh)的酶. 研究表明乙酰胆碱水平低可能导致抑郁症状. 此外, 乙酰胆碱酯酶抑制剂已被发现对缓解某些个体的抑郁症状有效^[67]. 因此, 开发检测乙酰胆碱酯酶的工具有助于探究抑郁症的发病机制.

我们^[68]开发了一种双光子荧光探针 **19**(图 8)来检测抑郁小鼠大脑中的 AChE(图 11). AChE 识别基团选用的是 AChE 抑制剂新斯的明, 荧光团选用部花菁. **19** 中的羰基直接附着在氧原子上, 削弱了部花菁的推拉电子效应; 因此, **19** 表现出微弱的荧光. 当 AChE 的水解中心识别 **19** 中的氨基甲酸二甲酯时, 酯键被裂解, ICT 效应增强, 导致荧光增强. **19** 对 AChE 有良好的选择性, 并发现 AChE 与抑郁表型呈正相关. 此外, 我们证明了 O_2^- 可以调节 AChE 活性并导致抑郁症状. **19** 可作为探究 AChE 相关疾病的有效工具, 为抑郁症的治疗提供重要信息.

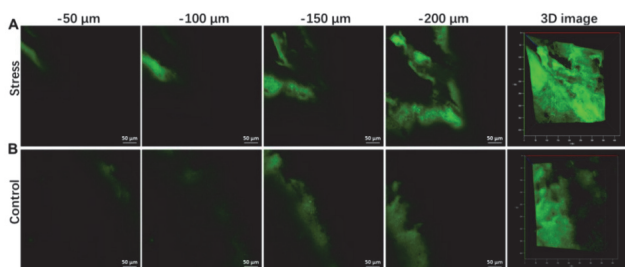


图 11 利用 **18** 在小鼠大脑中的原位双光子荧光成像^[68]

Figure 11 In situ TP fluorescence imaging in the brains of mice by **18**^[68] (Copyright 2019 American Chemical Society)

Kim 等^[69]开发了一种 NIR 荧光探针 **20**(图 8), 用于检测 AChE. **20** 对 AChE 的检测具有良好的选择性, 即与脑部干扰分子丁酰胆碱酯酶相比, **20** 对 AChE 具有更高的反应性. **20** 可以实现细胞和斑马鱼中 AChE 成像. 这一工作推进了检测生物系统中 AChE 的进程, 有助于 AChE 相关疾病的探究.

3 结论

综上所述, 我们对近年来抑郁症相关活性分子的荧光成像检测方法进行了综述. 荧光检测方法由于其较高的灵敏度及较强的选择性, 是检测抑郁症相关活性生物分子的重要方法. 此外, 荧光成像方法因具有较高的时空分辨率, 更适合活细胞及活体内的实时原位检测. 小分子、纳米、蛋白和核酸探针等多种成像工具均可实现成像分析抑郁症相关活性分子(包括 ROS、神经递质、相关蛋白等), 不同的成像工具在解决不同的科学问题时都有独特的优势.

虽然现有的成像工具实现了对 ROS、多种神经递质以及相关神经递质受体、水解酶等抑郁症相关活性分子的原位检测, 但仍有许多问题需要解决. 本文接下来阐述抑郁症相关活性分子的荧光成像材料的部分潜在挑

战和发展机遇.

(1) 目前已经开发了近红外荧光探针或双光子乃至三光子荧光探针, 可以在一定程度上解决组织穿透深度和生物自发荧光干扰的问题. 然而实现深层人脑的荧光原位实时成像依然具有很大挑战. 因此, 一方面有必要推进开发更有效的双光子、三光子或者近红外荧光成像工具, 另一方面更多的成像方法可以与荧光成像相结合, 如磁共振成像、光声成像、光热成像、正电子发射断层成像等, 发展多模态成像技术, 实现对生命系统中抑郁症相关活性分子的精确追踪和标记.

(2) 迄今为止大多数的荧光成像探针只是针对一种或两种组分. 在生物体的生理病理过程中, 往往是多种组分共同发挥作用. 因此, 需要开发能够动态实时检测多种物质的探针, 实现多组分同时检测, 从而可以更加深入了解相关活性分子的生理学作用.

(3) 此外, 基于抑郁症患者大脑中高水平疾病标志物, 还可创制集高灵敏度、高选择性响应、高效释放药物于一体的多功能荧光成像材料, 深入揭示疾病相关的分子机制, 建立活体抑郁症诊断、治疗、预后及药效评价的新方法, 能够为抑郁症的高效、精准的临床诊疗提供新策略.

总之, 发展检测抑郁症相关活性分子的新型荧光探针, 仍将是今后荧光成像领域发展前沿的重要研究内容之一, 这将为揭示抑郁症等脑部疾病发生发展过程中活性分子的调控作用提供重要的新材料和新方法.

作者简介



车飞达, 山东师范大学化学化工与材料科学学院在读博士研究生. 研究方向为抑郁症相关分子的细胞与活体荧光成像.



赵晓茗, 山东师范大学化学化工与材料科学学院在读硕士研究生. 研究方向为抑郁症相关分子的细胞与活体荧光成像.



张馨, 在山东师范大学化学化工与材料科学学院在读硕士生. 研究方向为抑郁症相关分子的细胞与活体荧光成像.



丁琪, 山东师范大学化学化工与材料科学学院在读博士研究生. 研究方向为抑郁症相关分子的细胞与活体荧光成像.



王昕, 2020年毕业于山东师范大学, 获博士学位. 主要从事抑郁症相关活性分子的细胞与活体荧光成像工作.



李平, 2008年毕业于山东师范大学, 获博士学位. 1998年加入山东师范大学, 现任化学化工与材料科学学院教授, 国家百千万人才工程入选者、泰山特聘教授、长江学者创新研究带头人. 主要从事新型荧光探针的构建及细胞与活体荧光成像研究工作.



唐波, 1994年获南开大学博士学位. 同年进入山东师范大学化学化工与材料科学学院担任教授, 为国家杰出青年科学家基金获得者, “973计划”首席科学家. 主要从事分析化学及细胞与活体荧光成像研究工作.

References

- [1] Steven, M.; Edward, P.; Trisha, S.; Emily, C.; Allan, Y.; Rachel, U. *The Lancet* **2023**, 401, 141.
- [2] Clark, D. C.; Cavanaugh, S. V.; Gibbons, R. D. *J. Nerv. Ment. Dis.* **1983**, 171, 705.
- [3] Miller, A. H.; Haroon, E.; Raison, C. L.; Felger, J. C. *Depression Anxiety* **2013**, 30, 297.
- [4] Franklin, T. C.; Xu, C.; Duman, R. S. *Brain, Behav., Immun.* **2018**, 72, 2.
- [5] Bhatt, S.; Nagappa, A. N.; Patil, C. R. *Drug Discovery Today* **2020**, 25, 1270.
- [6] Maes, M.; Galecki, P.; Chang, Y. S.; Berk, M. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2011**, 35, 676.
- [7] Bilici, M.; Efe, H.; Köroğlu, M. A.; Uydu, H. A.; Bekaroğlu, M.; Değer, O. *J. Affective Disord.* **2001**, 64, 43.
- [8] Schildkraut, J. J.; Kety, S. S. *Science* **1967**, 156, 21.
- [9] Coppen, A.; Wood, K. M. *Acta Psychiatr. Scand.* **1980**, 61, 21.
- [10] Randrup, A.; Bræstrup, C. *Psychopharmacology* **1977**, 53, 309.
- [11] Janowsky, D.; Davis, J.; El-Yousef, M. K.; Sekerke, H. J. *The Lancet* **1972**, 300, 632.
- [12] Heien, M. L. A. V.; Johnson, M. A.; Wightman, R. M. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 5697.
- [13] Estevão, M. S.; Carvalho, L. C.; Ferreira, L. M.; Fernandes, E.; Marques, M. M. B. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 101.
- [14] Ross, A. R. S.; Ambrose, S. J.; Cutler, A. J.; Allan Feurtado, J.; Kermode, A. R.; Nelson, K.; Zhou, R.; Abrams, S. R. *Anal. Biochem.* **2004**, 329, 324.
- [15] Duicu, O. M.; Lighezan, R.; Sturza, A.; Balica, R.; Vaduva, A.; Feier, H.; Gaspar, M.; Ionac, A.; Noveanu, L.; Borza, C.; Muntean, D. M.; Mornos, C. *Oxid. Med. Cell. Longevity* **2016**, 8470394.
- [16] Meissner, G. W.; Nern, A.; Singer, R. H.; Wong, A. M.; Malkesman, O.; Long, X. *Genetics* **2018**, 211, 473.
- [17] Ye, S.; Zhang, H.; Fei, J.; Wolstenholme, C. H.; Zhang, X. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, 60, 1339.
- [18] Liu, J.; Zhang, W.; Zhou, C.; Li, M.; Wang, X.; Zhang, W.; Liu, Z.; Wu, L.; James, T. D.; Li, P.; Tang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144, 13586.
- [19] Zhao, Y.; Kim, H. S.; Zou, X.; Huang, L.; Liang, X.; Li, Z.; Kim, J. S.; Lin, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, 144, 20854.
- [20] Ren, J.-B.; Wang, L.; Guo, R.; Tang, Y.-H.; Zhou, H.-M.; Lin, W.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2021**, 79, 87 (in Chinese). (任江波, 王蕾, 郭锐, 唐永和, 周红梅, 林伟英, 化学学报, **2021**, 79, 87.)
- [21] Jiang, G.; Lou, X. F.; Zuo, S.; Liu, X.; Ren, T. B.; Wang, L.; Zhang, X. B.; Yuan, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2023**, 62, e202218613.
- [22] Li, W.; Yin, S.; Shen, Y.; Li, H.; Yuan, L.; Zhang, X. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 3736.
- [23] Wang, X.; Wang, A.-Q.; Qian, M.-R.; Li, B.-X.; Jin, L.; Li, T.-H. *Chin. J. Anal. Chem.* **2023**, 4, 531 (in Chinese). (王雪, 王安琪, 钱美汝, 李滨汐, 金龙, 李胎花, 分析化学, **2023**, 4, 531.)
- [24] Wang, S.-Q.; Luo, B.-W.; Yu, J.-C.; Gu, Z. *Chem. J. Chin. Univ.* **2022**, 43, 20220577 (in Chinese). (汪诗琪, 罗博文, 俞计成, 顾臻, 高等学校化学学报, **2022**, 43, 20220577.)
- [25] Liu, B.-D.; Wang, C.-J.; Qian, Y. *Acta Chim. Sinica* **2022**, 80, 1071 (in Chinese). (刘巴蒂, 王承俊, 钱鹰, 化学学报, **2022**, 80, 1071.)
- [26] Xu, N.; Qiao, Q.-L.; Liu, X.-G.; Xu, Z.-C. *Acta Chim. Sinica* **2022**, 80, 553 (in Chinese). (许宁, 乔庆龙, 刘晓刚, 徐兆超, 化学学报, **2022**, 80, 553.)
- [27] Zuo, L.; Zhou, T.; Pannell, B. K.; Ziegler, A. C.; Best, T. M. *Acta Physiol.* **2015**, 214, 329.
- [28] Zhang, W.; Wang, R.; Liu, W.; Wang, X.; Li, P.; Zhang, W.; Wang, H.; Tang, B. *Chem. Sci.* **2018**, 9, 721.
- [29] Schrader, M.; Fahimi, H. D. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **2006**, 1763, 1755.
- [30] Ding, Q.; Tian, Y.; Wang, X.; Li, P.; Su, D.; Wu, C.; Zhang, W.; Tang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 20735.
- [31] Frangioni, J. V. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 626.
- [32] Li, P.; Wang, J.; Wang, X.; Ding, Q.; Bai, X.; Zhang, Y.; Su, D.; Zhang, W.; Zhang, W.; Tang, B. *Chem. Sci.* **2019**, 10, 2805.
- [33] Chang, C. C.; Lee, C. T.; Lan, T. H.; Ju, P. C.; Hsieh, Y. H.; Lai, T. J. *Psychiatry Res.* **2015**, 230, 575.
- [34] Wang, X.; Li, P.; Ding, Q.; Wu, C.; Zhang, W.; Tang, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58, 4674.
- [35] Bienert, G. P.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1758, 994.

- [36] Wang, X.; Ding, Q.; Tian, Y.; Wu, W.; Che, F.; Li, P.; Zhang, W.; Zhang, W.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2022**, 58, 6320.
- [37] Park, H. S.; Kim, S. R.; Lee, Y. C. *Respirology* **2009**, 14, 27.
- [38] Zhu, H.; Jia, P.; Wang, X.; Tian, Y.; Liu, C.; Li, X.; Wang, K.; Li, P.; Zhu, B.; Tang, B. *Anal. Chem.* **2022**, 94, 11783.
- [39] Mohammad, L. F.; Moses, L.; Gwaltney, S. M. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2008**, 31, 187.
- [40] Unger, E. K.; Keller, J. P.; Altermatt, M.; Liang, R.; Matsui, A.; Dong, C.; Hon, O. J.; Yao, Z.; Sun, J.; Banala, S.; Flanagan, M. E.; Jaffe, D. A.; Hartanto, S.; Carlen, J.; Mizuno, G. O.; Borden, P. M.; Shivange, A. V.; Cameron, L. P.; Sinning, S.; Underhill, S. M.; Olson, D. E.; Amara, S. G.; Temple, L. D.; Rudnick, G.; Marvin, J. S.; Lavis, L. D.; Lester, H. A.; Alvarez, V. A.; Fisher, A. J.; Prescher, J. A.; Kash, T. L.; Yarov-Yarovoy, V.; Gradinaru, V.; Looger, L. L.; Tian, L. *Cell* **2020**, 183, 1986.
- [41] Wan, J.; Peng, W.; Li, X.; Qian, T.; Song, K.; Zeng, J.; Deng, F.; Hao, S.; Feng, J.; Zhang, P.; Zhang, Y.; Zou, J.; Pan, S.; Shin, M.; Venton, B. J.; Zhu, J. J.; Jing, M.; Xu, M.; Li, Y. *Nat. Neurosci.* **2021**, 24, 746.
- [42] Dinarvand, M.; Neubert, E.; Meyer, D.; Selvaggio, G.; Mann, F. A.; Erpenbeck, L.; Kruss, S. *Nano Lett.* **2019**, 19, 6604.
- [43] Berke, J. D. *Nat. Neurosci.* **2018**, 21, 787.
- [44] Liu, Y.; Li, W.; Wu, P.; Ma, C.; Wu, X.; Xu, M.; Luo, S.; Xu, Z.; Liu, S. *Sens. Actuators, B* **2019**, 281, 34.
- [45] Alizadeh, N.; Salimi, A. *Anal. Chim. Acta* **2019**, 1091, 40.
- [46] An, J.; Chen, M.; Hu, N.; Hu, Y.; Chen, R.; Lyu, Y.; Guo, W.; Li, L.; Liu, Y. *Spectrochim. Acta, Part A* **2020**, 243, 118804.
- [47] Lin, H.; Huang, J.; Ding, L. *J. Nanomater.* **2019**, 1.
- [48] Naik, V.; Zantye, P.; Gunjal, D.; Gore, A.; Anbhule, P.; Kowshik, M.; Bhosale, S. V.; Kolekar, G. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, 2, 2069.
- [49] Sangubotla, R.; Kim, J. *Mater. Sci. Eng., C* **2021**, 122, 111916.
- [50] Patriarchi, T.; Mohebi, A.; Sun, J.; Marley, A.; Liang, R.; Dong, C.; Puhger, K.; Mizuno, G. O.; Davis, C. M.; Wiltgen, B.; von Zastrow, M.; Berke, J. D.; Tian, L. *Nat. Methods* **2020**, 17, 1147.
- [51] Sun, F.; Zhou, J.; Dai, B.; Qian, T.; Zeng, J.; Li, X.; Zhuo, Y.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Qian, C.; Tan, K.; Feng, J.; Dong, H.; Lin, D.; Cui, G.; Li, Y. *Nat. Methods* **2020**, 17, 1156.
- [52] Zhou, N.; Huo, F.; Yue, Y.; Yin, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 17751.
- [53] Zhou, N.; Yin, C.; Yue, Y.; Huo, F. *Sens. Actuators, B* **2022**, 373.
- [54] Zhou, N.; Yin, C.; Yue, Y.; Zhang, Y.; Cheng, F.; Huo, F. *Chem. Commun.* **2022**, 58, 2999.
- [55] Zuo, Z.; Kang, T.; Hu, S.; Su, W.; Gan, Y.; Miao, Z.; Zhao, H.; Feng, P.; Ke, B.; Li, M. *Anal. Chem.* **2022**, 94, 6441.
- [56] Zhang, L.; Liu, X. A.; Gillis, K. D.; Glass, T. E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58, 7611.
- [57] Yan, H.; Wang, Y.; Huo, F.; Yin, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, 145, 3229.
- [58] Feng, J.; Zhang, C.; Lischinsky, J. E.; Jing, M.; Zhou, J.; Wang, H.; Zhang, Y.; Dong, A.; Wu, Z.; Wu, H.; Chen, W.; Zhang, P.; Zou, J.; Hires, S. A.; Zhu, J. J.; Cui, G.; Lin, D.; Du, J.; Li, Y. *Neuron* **2019**, 102, 745.
- [59] Qiao, J.; Wu, D.; Song, Y.; Ji, W.; Yue, Q.; Mao, L.; Qi, L. *Anal. Chem.* **2021**, 93, 14743.
- [60] Youdim, M. B. H.; Edmondson, D.; Tipton, K. F. *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, 7, 295.
- [61] Shulman, K. I.; Herrmann, N.; Walker, S. E. *CNS Drugs* **2013**, 27, 789.
- [62] Zhang, S.; Zhao, B.; Yu, L.; Liu, J.; Zhang, X. *Talanta* **2020**, 209, 120559.
- [63] Duangkamol, C.; Wangngae, S.; Wet-Osot, S.; Khaikate, O.; Chansaenpak, K.; Lai, R. Y.; Kamkaew, A. *Molecules* **2023**, 28.
- [64] Dong, J.; Zhang, C.; Zhao, B.; Zhang, X.; Leng, Z.; Liu, J. *Dyes Pigm.* **2020**, 174.
- [65] Meng, Z.; Yang, L.; Yao, C.; Li, H.; Fu, Y.; Wang, K.; Qu, Z.; Wang, Z. *Dyes Pigm.* **2020**, 176.
- [66] Mei, Y.; Liu, Z.; Liu, M.; Gong, J.; He, X.; Zhang, Q. W.; Tian, Y. *Chem. Commun.* **2022**, 58, 6657.
- [67] Walczak-Nowicka, Ł. J.; Herbet, M. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 9290.
- [68] Wang, X.; Li, P.; Ding, Q.; Wu, C. C.; Zhang, W.; Tang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 2061.
- [69] Fortibui, M. M.; Jang, M.; Lee, S.; Ryoo, I. J.; Ahn, J. S.; Ko, S. K.; Kim, J. *ACS Appl. Bio Mater.* **2022**, 5, 2232.

(Zhao, C.)