

引文格式:

申雪峰, 赵帅男, 柳孜俐, 等. 谷氨酸递质电化学检测技术的研究与应用进展 [J]. 集成技术, 2023, 12(6): 57-71.

Shen XF, Zhao SN, Liu ZL, et al. Research advances in electrochemical technology for monitoring of glutamate in the central nerve system [J]. Journal of Integration Technology, 2023, 12(6): 57-71.

谷氨酸递质电化学检测技术的研究与应用进展

申雪峰^{1*} 赵帅男¹ 柳孜俐¹ 陈培华^{1*} 孙坚原^{1,2*}

¹(中国科学院深圳先进技术研究院脑认知与脑疾病研究所 深圳 518055)

²(中国科学院大学 北京 100049)

摘要 过量谷氨酸所致神经兴奋毒性是脑卒中等严重神经系统疾病中脑细胞损伤的主要原因。电化学技术是当前研究中枢神经系统谷氨酸递质的重要检测手段, 可对病灶内神经兴奋毒性的特性、程度等进行快速准确的检测评估。因此, 谷氨酸传感器的研究与应用对制定更为全面的治疗方案、脑保护策略以及研发新药等都具有重要意义。基于纳米技术、新型生物酶、光刻与印刷技术、晶体管技术的发展, 电化学检测谷氨酸技术与应用也得到了大力推动。该文对适用于中枢神经系统谷氨酸检测的电化学传感器的检测原理、传感器设计与制备工艺及其应用等方面的研究进展进行了综述, 并对其未来发展趋势进行了展望。

关键词 电化学技术; 神经兴奋毒性; 谷氨酸; 评述

中图分类号 Q 3 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20221020001

Research Advances in Electrochemical Technology for Monitoring of Glutamate in the Central Nerve System

SHEN Xuefeng^{1*} ZHAO Shuainan¹ LIU Zili¹ CHEN Peihua^{1*} SUN Jianyuan^{1,2*}

¹(The Brain Cognition and Brain Disease Institute of Shenzhen Institute of Advanced Technology,

Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

²(University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

*Corresponding Authors: xf.shen@siat.ac.cn; ph.chen@siat.ac.cn; jy.sun1@siat.ac.cn

Abstract The excessive glutamate-induced neuroexcitotoxicity has been widely thought as the main cause of brain cell damage in severe neurological diseases (such as ischemic stroke). Electrochemical technology is the most commonly used tool for glutamate monitoring at present. It could be applied to provide rapid and accurate

收稿日期: 2022-10-20 修回日期: 2023-06-12

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2022A1515010297)

作者简介: 申雪峰(通讯作者), 副研究员, 研究方向为新型神经电化学技术的研发与应用, E-mail: xf.shen@siat.ac.cn; 赵帅男, 助理研究员, 研究方向为神经递质释放的电化学检测技术开发和应用; 柳孜俐, 助理研究员, 研究方向为生理与病理条件下的突触传递机制; 陈培华(通讯作者), 副研究员, 研究方向为突触囊泡量子化信号检测技术, E-mail: ph.chen@siat.ac.cn; 孙坚原(通讯作者), 研究员, 研究方向为突触传递的分子与细胞学机制, E-mail: jy.sun1@siat.ac.cn.

assessment of the neuroexcitotoxicity for patients and animal disease models. Research advances in glutamate sensors will be important in establishing efficient therapies and brain protection strategy, and developing new drugs for severe neurological diseases. Application of nanotechnology, new enzymes, photolithography, printing, transistor technology in fabrication of glutamate sensors have greatly boosted developments in electrochemical monitoring of glutamate. In the present paper, research progress of sensing principles, design and preparation technology as well as the applications in medical studies have been reviewed, and future trends and prospective have also been discussed.

Keywords electrochemical technology; neuroexcitotoxicity; glutamate; review

Funding This work is supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (2022A1515010297)

1 引 言

谷氨酸是哺乳动物中枢神经系统内最主要的兴奋性神经递质,在认知^[1]、学习记忆^[2]、神经发育^[3]等生命活动中发挥重要作用。在生理条件下,谷氨酸在脑内的浓度及分布均受到了严格的调控。胞浆中的谷氨酸浓度为 $1\sim 10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[4],囊泡中的浓度则大于 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[5]。经囊泡释放到突触间隙的谷氨酸浓度可在几毫秒内迅速升至约 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,之后通过神经元与星形胶质细胞膜上的兴奋性氨基酸转运体得到快速清除^[6],使胞外谷氨酸浓度保持在 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平^[4]。而在病理条件下,特别是在一些严重的神经疾病,如脑卒中^[7]、脑瘤^[8]、神经退行性疾病^[9]、药物难治性癫痫等^[10-11]的发病过程中,神经细胞的氧化磷酸化与腺嘌呤核苷三磷酸生成受到阻滞,引发细胞膜内外离子浓度失衡,进而抑制谷氨酸转运体的再摄取。滞留在胞外的过量谷氨酸导致神经元上的谷氨酸受体过度活化,通过N-甲基-D-天冬氨酸和电压门控钙通道引发大量 Ca^{2+} 内流,最终导致 Ca^{2+} 过载引起神经元死亡,这一机制即神经兴奋毒性^[12-15]。

神经兴奋毒性被广泛认为是脑卒中等神经系统疾病产生脑细胞损伤的主要原因。以往的实验显示:神经元在谷氨酸浓度为 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶

液中很难存活超过 24 h ^[16]。在缺血性脑卒中病灶内,谷氨酸浓度甚至可骤升至 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上^[17],这将对脑细胞产生严重损伤。此外,神经兴奋毒性常伴随着氧化应激、炎症等一系列变化^[12]。虽然在体外实验中使用N-甲基-D-天冬氨酸受体阻断剂等起到缓解过量谷氨酸引起的神经兴奋毒性^[18]。但是,近年来的临床研究显示:在脑卒中等疾病的病程中使用谷氨酸受体阻断剂并不能起到预想的治疗效果^[19]。更多的研究显示,源于N-甲基-D-天冬氨酸受体过度激活途径的神经兴奋毒性作用在疾病发病的初期最为关键;而胞外过量的谷氨酸所导致的能量代谢失衡则是产生疾病后期谷氨酸毒性现象的主要原因^[12]。上述研究说明,在以神经兴奋毒性为靶点的神经疾病治疗中,仍有很多疑点待解开。因此,针对上述脑疾病产生的神经兴奋毒性的特性、程度与范围等特征,以及其与其他脑损伤途径的关联性,进行快速准确的检测评估,对制定合理有效的治疗方案、脑保护策略以及研发新药等都具有重要意义。

在临床上,计算机断层成像^[20]、磁共振成像^[21]和多普勒超声^[22]等医学影像学技术常用于揭示脑卒中等严重神经疾病的病变部位和性质,但不适用于对神经兴奋毒性现象进行快速直接的观测。目前,可用于谷氨酸检测的技术手段包括高效液相色谱^[23]、荧光探针显微成像^[24]、毛细

管电泳法^[25]与电化学技术^[26]等。高效液相色谱法基于被测物质与色谱柱中固定相的差异性相互作用获得特征峰信号, 由此可精确分析成分类型及含量^[27]; 同时, 凭借其较强的安全性, 已在临床研究中得到应用^[23]。但其时间分辨率仅为分钟级, 且其采样针尖端尺寸通常在亚毫米级, 因此, 探测区域只能在组织层面^[28-29], 难以用于微观检测分析。适用于检测谷氨酸的荧光成像技术的出现主要得益于可与递质选择性结合的遗传性荧光探针的开发^[30]。该技术基于激光共聚焦显微成像原理, 具有较高的空间分辨率, 且成像采样频率可下探至约十毫秒级^[30], 可用于同时检测多个突触的活动。但缺乏有效的浓度标定方法, 目前只能定性或半定量分析局部的递质水平变化。此外, 遗传性荧光探针难以在短时间内表达, 且存在一定的生物安全风险, 尚不适合临床应用。毛细管电泳法是利用离子在电场作用下迁移速度的不同对组分进行分离和分析的方法, 具有分离效率高和样品用量少等优点, 可用于单细胞水平的痕量分析^[31], 并已应用于临床患者脑脊液中谷氨酸等成分的检测分析^[32-33]。但其时间分辨率在分钟级(甚至更长)^[34-35], 因而不适用于递质释放等现象的观察。相对而言, 电化学技术对谷氨酸的选择性和灵敏度均较高, 且响应迅速, 时间分辨率可达毫秒级, 可用于快速精准测定神经兴奋毒性的程度变化; 电化学传感器具有微型

化优势, 可在多种环境下进行记录, 实现自宏观的活体脑水平至微观的细胞水平的全面而深入的探索^[36]; 检测方便快捷, 可与电生理记录等技术结合, 实现多目标的同步检测, 有助于研究谷氨酸与其他脑损伤途径之间的联系; 此外, 电化学技术检测谷氨酸对设备的要求相对较低, 成本相对较低低廉, 易于推广。基于上述优势, 电化学技术已经成为时下谷氨酸检测研究的重要手段^[6]。本文对适用于神经兴奋毒性评估的谷氨酸传感电化学技术的最新进展进行综述。

2 谷氨酸电化学检测的工作原理进展

2.1 酶基检测原理

与单胺类递质和抗坏血酸等具有较强氧化还原特性的电化学活性物质相比, 呈电化学惰性的谷氨酸很难用一般的电化学方法直接检测到。因此, 谷氨酸电化学检测通常涉及生物酶的应用。目前, 使用最广泛的生物酶是谷氨酸氧化酶(*glutamate oxidase*, *GluOx*)。在该酶作用下, 谷氨酸可被氧化, 并产生电化学活性较强的中间产物 H_2O_2 , 后者作为报告分子可在施加一定电压的电极表面发生氧化还原反应, 产生的电子可被电极监测到(如图 1(a)所示)^[6]。由于所测得的 H_2O_2 信号幅值与反应底物谷氨酸浓度在一定范围内呈线性关系, 因此可通过定标推算出测试液

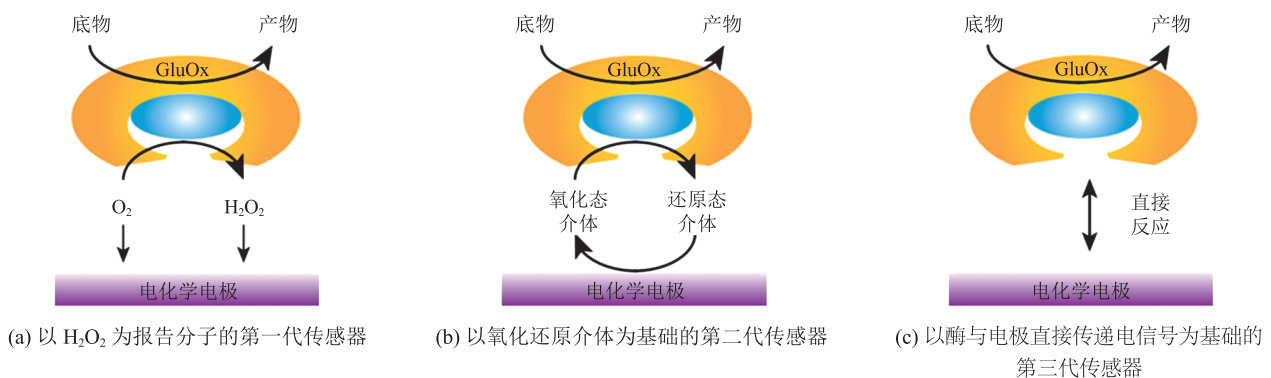


图 1 酶基谷氨酸传感器的检测原理

Fig. 1 Sensing principles of enzyme-based glutamate sensors

中的谷氨酸浓度^[37]。

近年来, 纳米科技的蓬勃发展使大量可供生物传感使用的纳米材料涌现^[38]。以碳纳米管、氧化石墨烯等为代表的碳基纳米材料表面具有大量的功能活性基团^[39], 与等量微米或毫米材料相比, 具有更多的金属纳米颗粒的锚定位点^[40-41], 有助于特定形态纳米复合物的生长^[42]。使用金属纳米颗粒制备的电极表面比等质量普通金属电极表面提供更多的活性位点, 极大地提高反应效率^[43]。使用单一纳米材料^[44]或者多种材料整合成的纳米复合物^[45]可使传感器的灵敏性、选择性、响应时间等技术参数均得到大幅改善。2010 年, Jamal 等^[46]将铂纳米颗粒与 GluOx 一同装载于金纳米线阵列上, 显著增强了电极对 H₂O₂ 的检测能力, 制成了线性传感范围为 0.02~20 mmol·L⁻¹, 检出限为 1.0 μmol·L⁻¹ 的酶基谷氨酸传感器。2017 年, Dalkiran 等^[47]将 Co₃O₄、石墨烯与壳聚糖制成的纳米复合物修饰于玻碳电极表面, 发现该方法可显著增强 GluOx 对谷氨酸的亲合性。2019 年, Maity 等^[48]将固定 GluOx 的铂纳米颗粒修饰到玻碳电极表面的多壁碳纳米管上, 获得较快的电极响应(3 s), 线性范围为 10~100 μmol·L⁻¹, 检出限低至 0.88 μmol·L⁻¹, 适于神经兴奋毒性检测。

然而, 报告分子 H₂O₂ 的氧化峰电位相对较高(+0.6~+0.8 V)。在该电势下, 脑内广泛存在的抗坏血酸、尿酸, 以及在记录区可能共存的其他递质均会干扰谷氨酸检测的特异性和准确性。为了解决这一难题, 近年来已发展出多种方法。其中, 最常用的是干扰物隔离方法, 即利用表面负电荷互斥或聚合物材料孔隙限制等原理, 用特异性隔绝膜对上述生物活性物质进行选择性的隔离^[37]。此外, 可以采用自参比记录方法。这一方法通常需借助微电极阵列来完成, 通过将酶涂层记录位点记录的电流减去无酶对照位点记录的电流, 可获得去除了干扰的谷氨酸信号^[49]。为了进一步增强抗干扰性能, 自参比记录方法也可联

合隔绝膜^[50]。这一方法的优势在于不仅可以去除抗坏血酸等物质的干扰, 还可以将疾病产生的包括 H₂O₂ 在内的氧化应激产物(非谷氨酸酶催化来源的 H₂O₂)干扰去除, 是目前在体电化学检测谷氨酸的重要记录方法^[51]。除以上两个方法之外, 还有改良电极表面修饰物方法。有些学者在引入谷氨酸氧化酶之前, 在电极表面修饰作为氧化还原介体的普鲁士蓝^[52]或钌氧化还原聚合物^[53]介导 H₂O₂ 的还原反应。在谷氨酸检测时, 工作电势可设定在 0 V, 甚至负电势, 传感器的谷氨酸选择性得到增强, 这一类电极称作第二代传感器(如图 1(b)所示)^[26]。也有报道通过碳纳米管与纳米金颗粒的联用将 GluOx 工作产生的电子直接传递给电极, 而无须经由报告分子。这一类电极被称作第三代传感器(如图 1(c)所示)^[54]。

综上, 基于 GluOx 发展的酶基谷氨酸传感器及其检测方法已较为成熟, 适用于生理条件和一般病理条件下的谷氨酸电化学检测。然而, 谷氨酸在 GluOx 作用下的氧化过程需要 O₂ 的参与^[37], 而缺血性脑卒中等疾病所产生的局部缺氧环境显然对该反应不利^[55], 在一定程度上可能会影响谷氨酸检测的准确性, 从而造成结果偏低的情况。因此, Andreescu 实验室在 2014 年尝试将具有氧转移能力的 CeO₂ 纳米颗粒嵌入到电极表面的壳聚糖基质中, 并发现该方法可使 GluOx 涂膜铂电极在无氧环境中对谷氨酸的灵敏度仍能保持在有氧环境中的 80% 左右, 检出限可保持在有氧环境的 2 倍左右^[56]。但这一方法仍无法完全摆脱对 O₂ 的依赖^[57], 因此, 在不同程度的缺氧条件下所得到的谷氨酸检测结果缺乏可比性。为了从根本上解决这一问题, 其他以谷氨酸为底物且无须 O₂ 参与氧化过程的生物酶也开始进入人们的视野。其中, 较早得到研究的生物酶是谷氨酸脱氢酶^[58]。但其缺点是在检测过程中需要辅酶 NADP⁺ 的参与, 这不仅增加了检测的复杂性, 也在一定程度上增加了研究成本。2018 年, 中国

科学院化学研究所的毛兰群研究组发现铁氧化还原蛋白依赖的谷氨酸合成酶的逆反应用于测定谷氨酸, 该过程不依赖 O_2 , 也无须辅酶参与, 线性范围为 $1\sim 20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 适用于痕量谷氨酸的检测^[59]。这一新酶的发现为电化学检测谷氨酸领域提供了一种全新的思路, 有望在不远的未来应用于新型谷氨酸传感器的制备。

2.2 非酶检测原理

酶基谷氨酸传感器是当下谷氨酸检测研究中的主要工具, 由于涉及的生物酶——GluOx 是目前市面上价格最高的酶之一, 导致酶基传感器的成本居高不下。近年来, 纳米技术的兴起推动了以新型纳米材料为传感元件的非酶检测技术, 已成为近年来替代酶基传感技术的热点方向, 并在糖类检测领域得到了广泛应用^[41,60]。2009年, Heli 等^[61]利用铜纳米颗粒首次以非酶检测原理测定了线性范围为 $100\sim 1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的谷氨酸含量, 检出限为 $30\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2013年, Jamal 等^[62]发现镍纳米线阵列电极也可用于检测谷氨酸, 线性范围为 $0.5\sim 8.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检出限为 $135\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。上述检测方法的基本原理是碱性溶液中的铜或镍等金属纳米材料可在特定的电势条件下形成具有极强氧化活性的高价态 Cu(III) ^[63] 或 Ni(III) ^[64], 从而对氧化还原电位较高的有机物进行氧化。与 GluOx 不同的是, 上述非酶检测过程无须 O_2 , 适用于缺氧条件下的谷氨酸检测; 此外, 由于不需要生物酶, 因此使得非酶传感器的整体造价比较便宜。

然而, 至今尚缺乏可供在组织或细胞水平使用的谷氨酸非酶传感器。究其原因, 主要为三点。第一, 较差的选择性。铜纳米颗粒除了能够检测到谷氨酸之外, 对赖氨酸等其他类型氨基酸也有响应^[61]。镍纳米线对抗坏血酸与尿酸的抗干扰性能较好, 但无法较好地区分谷氨酸与葡萄糖^[62], 而在脑中, 葡萄糖浓度^[65]显著高于谷氨酸^[4], 因此成为该方法的主要干扰物。第二, 传

感器的浓度检测范围不适用于生物环境。神经兴奋毒性状态下的胞外谷氨酸浓度最高可升至 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[17], 但也只是探及上述非酶电极的检测范围下限。第三, 检测环境要求为强碱性。这一要求使得上述电极均无法在活体条件下对细胞或组织进行直接检测。虽然非酶检测技术应用于中枢谷氨酸递质的检测仍面临很多问题, 但随着纳米材料的发展, 相信不久的将来可实现具有良好实用性的谷氨酸非酶检测技术。

2.3 受体介导检测原理

受体介导谷氨酸检测技术的概念最早由 Maeda 等^[66]于 1995 年提出。首先, 他们用一根玻璃微电极通过“外面向外”膜片钳技术获取一张含有谷氨酸受体的锥体细胞膜膜片。然后, 将该玻璃微电极靠近所要记录的细胞表面, 当细胞释放的谷氨酸与电极尖端膜片上的谷氨酸受体结合后, 受体通道开放产生电流, 从而记录到谷氨酸的释放信号。与上述的酶基与非酶谷氨酸检测方法相比, 该技术虽然适用于单细胞研究, 但其制备工艺与操作较复杂, 后续报道少见。2019年, Li 等^[67]在以还原性氧化石墨烯为基础的场效应晶体管上固定了代谢性谷氨酸受体, 并将分离的海马神经元也培养到同一场效应晶体管上。当神经元释放的谷氨酸与所固定的受体结合时, 即可产生电流信号。这一方法的灵敏度极高, 谷氨酸的检测范围为 $0.001\sim 100\ \text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检出限低至 $10\ \text{fmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且响应迅速。而通过在针灸针或柔性材料等基底上构建场效应晶体管传感器, 该技术可用于活体动物脑内递质的检测, 具有较好的发展前景^[68-70]。

3 谷氨酸传感器的设计与制备工艺进展

3.1 工作电极的设计

以最常见的酶基谷氨酸传感器为例, 其工作电极的基本结构可大体分为^[71]: 记录电极(通常

为贵金属或碳基材料)、酶涂层和隔绝膜涂层。根据实验需求,可将工作电极的结构设计分为三类。第一,用于活体记录的埋植电极。多为经光刻^[72]或印刷技术^[73]加工而成的微电极阵列,其基底为陶瓷片或硅片,方便插入脑组织中,且损伤较小,可同时记录多个空间位置的谷氨酸信息^[51]。第二,用于检测胞外提取液的电极,多与微透析管配合^[74]。该类电极无须与脑组织接触,主要采用平面记录槽样结构,当提取液通过引流管流经平面电极表面时进行检测^[75]。第三,用于细胞水平记录微电极。常采用微米级碳纤维电极,借助微操纵器可将其移动至感兴趣的细胞或神经末梢附近,以记录谷氨酸释放信号^[76]。这一类传感器的适用范围较广,稍作改良也可在前两类的应用场景中使用^[52]。

上述工作电极多采用电导联方式将检测信号经金属导线传递至记录设备。近年也发展出可通过蓝牙传输信号的无线型电化学传感器^[77],可对自由活动状态下的动物模型或患者开展实时电化学检测,有助于研究人员获得更接近生理条件下的信息,具有较好的应用前景。

3.2 适用于多目标同步检测的传感器设计

神经兴奋毒性在诸多严重脑疾病的发病过程中并非独立出现,常伴随着氧化应激、炎症、凋亡等一系列变化^[12]。这意味着在对患者或疾病动物模型的脑损伤情况进行综合评估时,仅采用单一的谷氨酸检测是不全面的。因此,近年来,多个研究团队开始尝试对谷氨酸与其他物质进行联合检测,或将电化学技术与其他研究手段(如电生理技术、光遗传学技术)相结合,以期对疾病的发病与治疗过程进行更为综合深入的研究。

目前,针对多物质同步检测的设计可分为三类。第一,两个或多个独立传感器的联用。2019年,Zhao等^[78]首次将酶基谷氨酸传感器与全固态 Ca^{2+} 选择性微电极联用,在缺血模型上同步记录到了因血管夹闭引起的纹状体、海马与皮层

等处谷氨酸浓度的缓慢上升与 Ca^{2+} 含量的迅速下降。第二,微电极阵列的应用。凭借微电极阵列的多个记录位点,可以完成谷氨酸与其他生物活性物质的同步记录^[79]。基于光刻技术的微电极阵列制备工艺已较为成熟,位点间距可以控制在 $30\sim 50\ \mu\text{m}$,因而可确保多个记录位点都集中在同一核团中,有利于对核团的生理功能进行综合解读。第三,基于同一根工作电极,利用不同活性物质(包括报告分子)在电极表面独特的氧化还原特性^[80],使用快相循环伏安法等电化学方法进行同步监测^[77]。可以预见,通过将该检测策略与微电极阵列结合,可以极大地扩展所能检测的物质种类和信号类型。

对电化学传感器进行改良,制成多功能传感探头,可实现多种研究手段的有机整合。2018年,Budai等^[81]在同一根玻璃毛坏内装入直径为 $9\ \mu\text{m}$ 的碳纤维与直径为 $125\ \mu\text{m}$ 的光纤,制得一种兼具光刺激与电化学检测能力的新型传感器。此外,Lindau实验室提出的膜片钳电化学技术可以实现使用单个记录探头对单细胞进行电生理与电化学的同步记录^[82],但这一方法目前尚难以在神经元上进行。而经改良的微电极阵列也可用于同步记录谷氨酸电化学信号与电生理信号^[83]。

3.3 酶涂膜固定方法

目前,对第3.1小节中所述第一类与第二类电极进行酶涂膜固定多采用滴涂法,将含有酶与基质的混合液滴加到电极表面,待干燥后完成酶固定^[37]。对第三类电极进行酶涂膜固定以蘸取法为主,将电极尖端多次插入含酶的混合液中(另包括交联剂和/或基质),直至足量的酶黏附于电极表面^[52]。随着研究的深入,出于对痕量样品测定的需求,以及期望尽可能减少埋植过程对脑组织的损伤,传感器微型化已成为一个主要趋势^[84],而这也对电极表面的酶固定方法提出了更高的要求。

壳聚糖(chitosan)是一类多糖凝胶,因拥有

大量氨基基团而具有良好的生物相容性, 已在多种传感器的制备工艺中用作酶固定基质^[85]。2014年, Shi等^[86]将GluOx、氧化还原反应介质与壳聚糖混合, 通过电化学方法提高微电极阵列表面附近混合溶液的pH值, 直至超过壳聚糖的pKa水平(为6.3), 最终使得壳聚糖沉淀析出, 并将其裹挟的酶分子也一同沉积到电极表面, 这显著提高了酶固定位点的选择性。交联剂是用于促进酶与电极表面基质紧密连接的材料, 常见的交联剂包括戊二醛和聚乙二醇二缩水甘油醚。2013年, Vasylieva等^[87]发现, 以戊二醛(而非聚乙二醇二缩水甘油醚)为交联剂的谷氨酸传感器可能会降低GluOx的底物选择性, 导致所测的谷氨酸浓度偏高。但同年, Gerhardt实验室建议将戊二醛与作为基质的小牛血清蛋白混合均匀后再与酶混合, 随后使用该混合液进行酶涂膜^[88], 而不建议采用各个组分分开独立涂膜的方法^[89]。经过测试, 证明戊二醛影响GluOx对谷氨酸的选择性主要源于采用了不合理的酶固定方法, 而采用建议的方法则可以较好地避免这一问题。

3.4 隔绝膜的使用策略

隔绝膜是传感器能够实现高选择性检测的重要因素, 常用的隔绝膜材料主要包括Nafion与聚苯二胺(单体为邻苯二胺或间苯二胺)^[37]。其中, Nafion通过材料表面积聚的负电荷来隔离抗坏血酸与尿酸等带有负电荷的干扰物, 涂膜可通过蘸取法; 聚苯二胺主要依靠聚合材料中的孔隙大小来限制尺寸较大的抗坏血酸、多巴胺等物质的通过, 涂膜需借助电镀法。需要注意的是, Nafion涂覆电极在不使用时需保存在高湿度环境或液体中, 否则, 涂层易开裂, 无法再起到隔离干扰物的作用。为了确定电化学测量谷氨酸的最佳隔绝膜材料, 2012年, Westerink研究组对常用隔绝膜材料做了一份详细的分析研究^[90]。在体外实验中, 发现单一使用聚间苯二胺的电极对

谷氨酸的选择性最强, 对抗坏血酸、多巴胺、二羟苯乙酸与尿酸均展现出良好的抗干扰特性。此外, 也有学者提出, 在电极表面电镀生成聚邻苯二胺时加入小牛血清蛋白, 以进一步增强其对谷氨酸的选择性^[52,91]。

4 电化学技术检测中枢神经系统谷氨酸水平的应用进展

4.1 检测样品的选择

动物疾病模型可以复制模拟出与患者相似的发病过程, 是电化学技术研究神经兴奋毒性现象和损伤机制等问题的极佳实验对象。通过埋植电极对活体脑组织直接进行电化学记录^[78], 或通过微透析管将胞外液连续提取后进行体外检测^[92], 是目前电化学技术评估神经兴奋毒性程度的重要方法。但在体实验仍具有一些局限, 例如: 对于细胞水平的谷氨酸损伤机制, 以及与其他损伤途径间的沟通机制等方面的研究, 很难在在体水平开展。因此, 也有学者在脑片或者培养细胞中通过一些方法模拟特定的神经疾病或创伤, 如通过创建缺氧缺糖环境来模拟缺血性脑卒中^[93], 从而使用微电极或场效应晶体管技术进行记录。另外, 考虑到以埋植电极方式对人脑谷氨酸水平进行检测具有一定感染风险, 也有学者尝试对体液(如血液)中的谷氨酸含量进行研究^[94]。

4.2 电化学检测中枢神经系统谷氨酸在生理学研究中的应用

量子化递质释放是突触神经递质释放的最主要特征。这一概念由Katz等^[95]于20世纪50年代研究蛙的神经肌肉接头处终板电位时提出, 即突触信号以“阶跃叠加”方式进行编码, 而量子为突触信号的基本单位。随后, Heuser等^[96-97]的电镜结果证实突触囊泡为量子化释放的结构基础, 说明量子的大小取决于突触囊泡内递质的含量。2019年, Cans实验室对体外分离纯化后获

得的谷氨酸能囊泡进行电化学检测,测得的谷氨酸量子水平约为 8 000 个分子^[98]。然而,由于囊泡分离过程存在较大的递质丢失概率^[5],因此,该数值可能显著偏小。而黄卫华实验室利用铂纳米颗粒修饰工艺和聚乙二醇二缩水甘油醚交联固定法,制得 5 μm 直径的谷氨酸碳纤电极,可用于抵近体外培养的海马神经元上的神经末梢,并进行记录,测得的单个谷氨酸量子为 126 000 个分子^[99]。精确评估量子大小对更好地理解量子化释放的精细调控机制及其对神经信息处理的影响具有重要生理意义。

4.3 电化学检测中枢神经系统谷氨酸在疾病研究中的应用

脑卒中是目前世界上第二大死亡原因和第三大致残原因^[100],并因此成为电化学研究领域的热点之一。与其他缺血性脑卒中模型相比,十一血管闭塞模型被认为可以更好地模拟前脑缺血情况^[101]。Caragine 等^[101]在这一大鼠模型上将谷氨酸检测与脑电图和脑血流记录联合,发现当血管闭塞后,脑电图几乎陷入静默,脑血流也基本跌至 0,而病灶内谷氨酸浓度在约 2 min 后开始升高,当血管闭塞 5~10 min 后可达 84~140 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在再灌注阶段可看到脑血流恢复,甚至超过原有水平,谷氨酸水平缓慢抬升片刻后也开始下降,但脑电图却始终处于静默状态^[17],说明已造成明显的脑功能损伤。

癫痫作为最常见的神经疾病之一,在全球范围内约有 5 000 万患者,以反复、短暂的痫性发作或异常的行为、感觉为主要特征。癫痫的具体发病机制复杂多样,但究其核心通常认为是“兴奋/抑制失衡”导致的神经系统异常的过度或同步活动^[102]。Spencer 实验室在 20 世纪 90 年代初通过在体微透析采样联合高效液相色谱方法,首次在颞叶癫痫患者病灶内检测到与癫痫发作相关的谷氨酸释放增强现象^[103]。但受限于高效液相色谱的采样频率,癫痫发作期间,谷氨酸的释放

模式仍不确定。Gerhardt 研究组借助在体谷氨酸电化学检测技术,发现当给予药物诱发大鼠局灶性癫痫发作时,可在病灶区出现瞬时的谷氨酸浓度上升,其后伴随大量高频棘突状谷氨酸释放信号^[104]。以上研究表明,谷氨酸的高频释放现象可能成为癫痫病灶判定的新型标记物。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是目前痴呆症最常见的病因,患者主要表现为持续的进行性智能衰退,而 Tau 蛋白与特征性病理表现之一的神经元纤维缠结密切相关^[105]。近期,有研究显示, Tau 蛋白可能引起海马体的过兴奋,从而产生 AD 伴发的癫痫^[106]。为证明这一机制,Reed 研究组在 AD 模型鼠上发现, P301L Tau 蛋白的表达可导致齿状回与海马 CA3 区的高钾溶液刺激诱发谷氨酸释放水平分别增高 4 和 7 倍,并显著降低谷氨酸清除效率。而相应地,负责囊泡谷氨酸填充的囊泡谷氨酸转运体含量上升,以及负责清除胞外谷氨酸的海马区谷氨酸转运体 1 含量下降^[107]。而黄卫华实验室则发现与 AD 相关的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体可以显著降低体外培养的海马神经终末处的谷氨酸量子水平^[108]。以上研究使人们对 Tau 蛋白与 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体在 AD 发病过程中的作用有了更深的理解。

5 总结与展望

近年来,应用于中枢神经系统谷氨酸检测评估的电化学技术在检测原理、传感器设计与制备以及应用等方面都获得了长足的进展。目前,新型纳米材料与新型生物酶的开发以及晶体管技术在生物传感器领域的应用都大力推动了谷氨酸检测原理的多元化发展,尤其是以谷氨酸合成酶逆反应检测、非酶检测以及受体介导检测等为代表的新方向,有望在不远的未来用于下一代谷氨酸传感器的制备。随着光刻与印刷技术的推广应用,以及酶固定与隔绝膜材料使用策略的深入

验证, 谷氨酸传感器的制备工艺已得到极大的完善, 可在活体脑组织、胞外液与体液, 以及细胞层面进行神经兴奋毒性相关谷氨酸浓度的检测。出于对患者和动物疾病模型的病理机制与治疗过程进行更为全面深入评估的需求, 将谷氨酸与其他物质进行联合检测, 或将电化学检测方法与其他研究手段(如电生理技术、光遗传学技术)相结合, 成为这一领域的新热点。基于以上方法学进展, 电化学技术已广泛应用于严重脑疾病中谷氨酸所致脑损伤的机制研究。这些研究对制定合理有效的治疗方案、脑保护策略, 以及研发新药等领域都具有重大而深远的意义。

随着近年来活体人脑电化学研究的进步, 相信谷氨酸电化学检测也将于不久的将来突破现有的技术与伦理等方面的限制, 而最终应用于人脑。这一突破将有利于脑内病灶位置的精确判定、神经干预方案的参数选择与调整等方面的发展。而考虑到临床电化学应用在安全性、稳定性、低损伤性等多方面的要求, 未来面向临床应用的谷氨酸电化学传感器也需要在材料、制备工艺、微型化、外形设计以及相应的植入方法等方面作为重要的落脚点, 开展新一阶段的研发工作。

参 考 文 献

- [1] Volk L, Chiu SL, Sharma K, et al. Glutamate synapses in human cognitive disorders [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 2015, 38: 127-149.
- [2] Gécz J. Glutamate receptors and learning and memory [J]. *Nature Genetics*, 2010, 42(11): 925-926.
- [3] Sinnamon JR, Waddell CB, Nik S, et al. Hnrpab regulates neural development and neuron cell survival after glutamate stimulation [J]. *RNA*, 2012, 18(4): 704-719.
- [4] Danbolt NC. Glutamate uptake [J]. *Progress in Neurobiology*, 2001, 65(1): 1-105.
- [5] Riveros N, Fiedler J, Lagos N, et al. Glutamate in rat brain cortex synaptic vesicles: influence of the vesicle isolation procedure [J]. *Brain Research*, 1986, 386(1-2): 405-408.
- [6] Hamdan SK, Mohd Zain A. *In vivo* electrochemical biosensor for brain glutamate detection: a mini review [J]. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 2014, 21(special issue): 12-26.
- [7] da Silva-Candal A, Perez-Diaz A, Santamaria M, et al. Clinical validation of blood/brain glutamate grabbing in acute ischemic stroke [J]. *Annals of Neurology*, 2018, 84(2): 260-273.
- [8] Pichumani K, Mashimo T, Vemireddy V, et al. Measurement of ^{13}C turnover into glutamate and glutamine pools in brain tumor patients [J]. *FEBS Letters*, 2017, 591(21): 3548-3554.
- [9] Jakaria M, Park SY, Haque ME, et al. Neurotoxic agent-induced injury in neurodegenerative disease model: focus on involvement of glutamate receptors [J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 307.
- [10] Vishnoi S, Raisuddin S, Parvez S. Glutamate excitotoxicity and oxidative stress in epilepsy: modulatory role of melatonin [J]. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2016, 35(4): 365-374.
- [11] Li L, Liu ZL, Yang HY, et al. Investigation of novel *de novo* *KCNC2* variants causing severe developmental and early-onset epileptic encephalopathy [J]. *Seizure*, 2022, 101: 218-224.
- [12] Magi S, Piccirillo S, Amoroso S. The dual face of glutamate: from a neurotoxin to a potential survival factor-metabolic implications in health and disease [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(8): 1473-1488.
- [13] Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate [J]. *Science*, 1969, 164(3880): 719-721.
- [14] Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular

- mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009, 30(4): 379-387.
- [15] Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(11): 1382-1402.
- [16] Cheung NS, Pascoe CJ, Giardina SF, et al. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones [J]. *Neuropharmacology*, 1998, 37(10-11): 1419-1429.
- [17] Park E, Lee GJ, Choi S, et al. Correlation between extracellular glutamate release and neuronal cell death in an eleven vessel occlusion model in rat [J]. *Brain Research*, 2010, 1342: 160-166.
- [18] Marini AM, Spiga G, Mocchetti I. Toward the development of strategies to prevent ischemic neuronal injury. *In vitro* studies [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1997, 825: 209-219.
- [19] Khanna S, Briggs Z, Rink C. Inducible glutamate oxaloacetate transaminase as a therapeutic target against ischemic stroke [J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2015, 22(2): 175-186.
- [20] Park JY, Lee SK, Kim JY, et al. A new micro-computed tomography-based high-resolution blood-brain barrier imaging technique to study ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45(8): 2480-2484.
- [21] Audebert HJ, Fiebich JB. Brain imaging in acute ischemic stroke—MRI or CT? [J]. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2015, 15(3): 1-6.
- [22] Nakibuuka J, Nyakoojo WB, Namale A, et al. Utility of transthoracic echocardiography and carotid doppler ultrasound in differential diagnosis and management of ischemic stroke in a developing country [J]. *Journal of Cardiology & Clinical Research*, 2013, 1(2): 1012-1016.
- [23] Cavus I, Romanyshyn JC, Kennard JT, et al. Elevated basal glutamate and unchanged glutamine and GABA in refractory epilepsy: microdialysis study of 79 patients at the yale epilepsy surgery program [J]. *Annals of Neurology*, 2016, 80(1): 35-45.
- [24] Marvin JS, Borghuis BG, Tian L, et al. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(2): 162-170.
- [25] Patel AV, Kawai T, Wang LP, et al. Chiral measurement of aspartate and glutamate in single neurons by large-volume sample stacking capillary electrophoresis [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(22): 12375-12382.
- [26] Qin S, Van der Zeyden M, Oldenzienl WH, et al. Microsensors for *in vivo* measurement of glutamate in brain tissue [J]. *Sensors (Basel)*, 2008, 8(11): 6860-6884.
- [27] Marini D, Balestrieri F, Pollino G. HPLC analysis of miokamycin and its principle impurities [J]. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 1986, 125(6): 193-196.
- [28] Tolia CM, Richards DA, Bowery NG, et al. Extracellular glutamate in the brains of children with severe head injuries: a pilot microdialysis study [J]. *Child's Nervous System*, 2002, 18(8): 368-374.
- [29] Rollema H, Wilson GG, Lee TC, et al. Effect of co-administration of varenicline and antidepressants on extracellular monoamine concentrations in rat prefrontal cortex [J]. *Neurochemistry International*, 2011, 58(1): 78-84.
- [30] Takikawa K, Asanuma D, Namiki S, et al. High-throughput development of a hybrid-type fluorescent glutamate sensor for analysis of synaptic transmission [J]. *Angewandte Chemie*, 2014, 53(49): 13439-13443.
- [31] Kawai T, Ota N, Okada K, et al. Ultrasensitive single cell metabolomics by capillary electrophoresis-mass spectrometry with a thin-walled

- tapered emitter and large-volume dual sample preconcentration [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(16): 10564-10572.
- [32] Tucci S, Pinto C, Goyo J, et al. Measurement of glutamine and glutamate by capillary electrophoresis and laser induced fluorescence detection in cerebrospinal fluid of meningitis sick children [J]. *Clinical Biochemistry*, 1998, 31(3): 143-150.
- [33] Cortès-Saladelafont E, Molero-Luis M, Cuadras D, et al. Gamma-aminobutyric acid levels in cerebrospinal fluid in neuropaediatric disorders [J]. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 2018, 60(8): 780-792.
- [34] Dong Q, Jin WR, Shan JH. Analysis of amino acids by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection [J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(4): 559-564.
- [35] Skrutková Langmajerová M, Pelcová M, Vedrová P, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a tool for the noninvasive target metabolomic analysis of underivatized amino acids for evaluating embryo viability in assisted reproduction [J]. *Electrophoresis*, 2022, 43(5-6): 679-687.
- [36] Chen PH, Shen XF, Zhao SN, et al. Measurement of intact quantal packet of transmitters released from single nerve terminal by loose-patch amperometry [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 181: 113143.
- [37] Hascup KN, Rutherford EC, Quintero JE, et al. Second-by-second measures of L-glutamate and other neurotransmitters using enzyme-based microelectrode arrays [M]. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007.
- [38] Dey RS, Bera RK, Raj CR. Nanomaterial-based functional scaffolds for amperometric sensing of bioanalytes [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(11): 3431-3448.
- [39] Unnikrishnan B, Palanisamy S, Chen SM. A simple electrochemical approach to fabricate a glucose biosensor based on graphene-glucose oxidase biocomposite [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 39(1): 70-75.
- [40] Chen XM, Wu GH, Chen JM, et al. Synthesis of “clean” and well-dispersive Pd nanoparticles with excellent electrocatalytic property on graphene oxide [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(11): 3693-3695.
- [41] Zhao SN, Liu ZL, Chen PH, et al. Non-enzymatic fructose sensing by platinum decorated graphene oxide nanocomposite [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2019, 845: 106-110.
- [42] Chen XM, Su BY, Wu GH, et al. Platinum nanoflowers supported on graphene oxide nanosheets: their green synthesis, growth mechanism, and advanced electrocatalytic properties for methanol oxidation [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22(22): 11284-11289.
- [43] Wu GH, Song XH, Wu YF, et al. Non-enzymatic electrochemical glucose sensor based on platinum nanoflowers supported on graphene oxide [J]. *Talanta*, 2013, 105: 379-385.
- [44] Ali SMU, Nur O, Willander M, et al. A fast and sensitive potentiometric glucose microsensor based on glucose oxidase coated ZnO nanowires grown on a thin silver wire [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010, 145(2): 869-874.
- [45] Hasanzadeh M, Karimzadeh A, Shadjou N, et al. Graphene quantum dots decorated with magnetic nanoparticles: synthesis, electrodeposition, characterization and application as an electrochemical sensor towards determination of some amino acids at physiological pH [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2016, 68: 814-830.
- [46] Jamal M, Xu J, Razeeb KM. Disposable biosensor based on immobilisation of glutamate oxidase on Pt nanoparticles modified Au nanowire array electrode [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, 26(4): 1420-1424.
- [47] Dalkiran B, Erden PE, Kilic E. Graphene and

- tricobalt tetraoxide nanoparticles based biosensor for electrochemical glutamate sensing [J]. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 2017, 45(2): 340-348.
- [48] Maity D, Kumar RTR. Highly sensitive amperometric detection of glutamate by glutamic oxidase immobilized Pt nanoparticle decorated multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs)/polypyrrole composite [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 130: 307-314.
- [49] McLamore ES, Mohanty S, Shi J, et al. A self-referencing glutamate biosensor for measuring real time neuronal glutamate flux [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2010, 189(1): 14-22.
- [50] Campos-Beltran D, Konradsson-Geuken A, Quintero JE, et al. Amperometric self-referencing ceramic based microelectrode arrays for D-serine detection [J]. *Biosensors (Basel)*, 2018, 8(1): e20.
- [51] Miller EM, Quintero JE, Pomerleau F, et al. Simultaneous glutamate recordings in the frontal cortex network with multisite biomorphic microelectrodes: new tools for ADHD research [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2015, 252: 75-79.
- [52] Salazar P, Martin M, O'Neill RD, et al. Glutamate microbiosensors based on Prussian Blue modified carbon fiber electrodes for neuroscience applications: *in-vitro* characterization [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 235: 117-125.
- [53] Oldenzien WH, Westerink BH. Improving glutamate microsensors by optimizing the composition of the redox hydrogel [J]. *Analytical Chemistry*, 2005, 77(17): 5520-5528.
- [54] Batra B, Pundir CS. An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 47: 496-501.
- [55] Hou HG, Khan N, Gohain S, et al. Dynamic EPR oximetry of changes in intracerebral oxygen tension during induced thromboembolism [J]. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2017, 75(3-4): 285-294.
- [56] Özel RE, Ispas C, Ganesana M, et al. Glutamate oxidase biosensor based on mixed ceria and titania nanoparticles for the detection of glutamate in hypoxic environments [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 52: 397-402.
- [57] O'Neill RD, Rocchitta G, McMahon CP, et al. Designing sensitive and selective polymer/enzyme composite biosensors for brain monitoring *in vivo* [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(1): 78-88.
- [58] Liang B, Zhang S, Lang QL, et al. Amperometric L-glutamate biosensor based on bacterial cell-surface displayed glutamate dehydrogenase [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2015, 884: 83-89.
- [59] Wu F, Yu P, Yang XT, et al. Exploring ferredoxin-dependent glutamate synthase as an enzymatic bioelectrocatalyst [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(40): 12700-12704.
- [60] Hwang DW, Lee S, Seo M, et al. Recent advances in electrochemical non-enzymatic glucose sensors—a review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1033: 1-34.
- [61] Heli H, Hajjizadeh M, Jabbari A, et al. Fine steps of electrocatalytic oxidation and sensitive detection of some amino acids on copper nanoparticles [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 388(1): 81-90.
- [62] Jamal M, Hasan M, Mathewson A, et al. Disposable sensor based on enzyme-free Ni nanowire array electrode to detect glutamate [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 40(1): 213-218.
- [63] Elhaleem SMA, Ateya BG. Cyclic voltammetry of copper in sodium hydroxide solutions [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 1981, 117(2): 309-319.
- [64] Nie HG, Yao Z, Zhou XM, et al. Nonenzymatic electrochemical detection of glucose using well-

- distributed nickel nanoparticles on straight multi-walled carbon nanotubes [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2011, 30(1): 28-34.
- [65] Lee H, Hong YJ, Baik S, et al. Enzyme-based glucose sensor: from invasive to wearable device [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(8): e1701150.
- [66] Maeda T, Shimoshige Y, Mizukami K, et al. Patch sensor detection of glutamate release evoked by a single electrical shock [J]. *Neuron*, 1995, 15(2): 253-257.
- [67] Li YT, Jin X, Tang LN, et al. Receptor-mediated field effect transistor biosensor for real-time monitoring of glutamate release from primary hippocampal neurons [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(13): 8229-8236.
- [68] Zhao CZ, Man TX, Cao Y, et al. Flexible and implantable polyimide aptamer-field-effect transistor biosensors [J]. *American Chemical Society Sensors*, 2022, 7(12): 3644-3653.
- [69] Zhou Y, Liu BZ, Lei YM, et al. Acupuncture needle-based transistor neuroprobe for *in vivo* monitoring of neurotransmitter [J]. *Small*, 2022, 18(52): e2204142.
- [70] Zhao CZ, Cheung KM, Huang IW, et al. Implantable aptamer-field-effect transistor neuroprobes for *in vivo* neurotransmitter monitoring [J]. *Science Advances*, 2021, 7(48): eabj7422.
- [71] Hughes G, Pemberton RM, Fielden PR, et al. The design, development and application of electrochemical glutamate biosensors [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 79: 106-113.
- [72] Vasylieva N, Marinesco S, Barbier D, et al. Silicon/SU8 multi-electrode micro-needle for *in vivo* neurochemical monitoring [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2015, 72: 148-155.
- [73] Nguyen TNH, Nolan JK, Park H, et al. Facile fabrication of flexible glutamate biosensor using direct writing of platinum nanoparticle-based nanocomposite ink [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 131: 257-266.
- [74] Li XH, Xian YZ, Xie ZH, et al. Amperometric sensor based on neutral red-doped silica nanoparticles coupled with microdialysis for the measurement of glutamate in the rat striatum [J]. *Chinese Journal of Chemistry*, 2007, 25(7): 953-957.
- [75] Yu YY, Sun Q, Zhou TS, et al. On-line microdialysis system with poly(amidoamine)-encapsulated Pt nanoparticles biosensor for glutamate sensing *in vivo* [J]. *Bioelectrochemistry*, 2011, 81(1): 53-57.
- [76] Niwa O, Torimitsu K, Morita M, et al. Concentration of extracellular L-glutamate released from cultured nerve cells measured with a small-volume online sensor [J]. *Analytical Chemistry*, 1996, 68(11): 1865-1870.
- [77] Van Gompel JJ, Chang SY, Goerss SJ, et al. Development of intraoperative electrochemical detection: wireless instantaneous neurochemical concentration sensor for deep brain stimulation feedback [J]. *Neurosurgical Focus*, 2010, 29(2): E6.
- [78] Zhao F, Shi GY, Tian Y. Simultaneous determination of glutamate and calcium ion in rat brain during spreading depression and ischemia processes [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(3): 347-354.
- [79] Tseng TTC, Monbouquette HG. Implantable microprobe with arrayed microsensors for combined amperometric monitoring of the neurotransmitters, glutamate and dopamine [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2012, 682: 141-146.
- [80] Dorozhko EV, Korotkova EI, Shabaeva AA, et al. Electrochemical determination of L-glutamate on a carbon-containing electrode modified with gold by voltammetry [J]. *Procedia Chemistry*, 2015, 15: 365-370.
- [81] Budai D, Vizvari AD, Bali ZK, et al. A novel carbon tipped single micro-optrode for combined optogenetics and electrophysiology [J]. *PLoS One*,

- 2018, 13(3): e0193836.
- [82] Dernick G, Gong LW, Tabares L, et al. Patch amperometry: high-resolution measurements of single-vesicle fusion and release [J]. *Nature Methods*, 2005, 2(9): 699-708.
- [83] Li ZY, Song YL, Xiao GH, et al. Bio-electrochemical microelectrode arrays for glutamate and electrophysiology detection in hippocampus of temporal lobe epileptic rats [J]. *Analytical Biochemistry*, 2018, 550: 123-131.
- [84] Sirca D, Vardeu A, Pinna M, et al. A robust, state-of-the-art amperometric microbiosensor for glutamate detection [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 61: 526-531.
- [85] Liu Y, Wang MK, Zhao F, et al. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2005, 21(6): 984-988.
- [86] Shi WT, Lin NS, Song YL, et al. A novel method to directionally stabilize enzymes together with redox mediators by electrodeposition [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014, 51: 244-248.
- [87] Vasylieva N, Maucler C, Meiller A, et al. Immobilization method to preserve enzyme specificity in biosensors: consequences for brain glutamate detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(4): 2507-2515.
- [88] Burmeister JJ, Davis VA, Quintero JE, et al. Glutaraldehyde cross-linked glutamate oxidase coated microelectrode arrays: selectivity and resting levels of glutamate in the CNS [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2013, 4(5): 721-728.
- [89] Vasylieva N, Barnych B, Meiller A, et al. Covalent enzyme immobilization by poly (ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDE) for microelectrode biosensor preparation [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(10): 3993-4000.
- [90] Wahono N, Qin S, Oomen P, et al. Evaluation of permselective membranes for optimization of intracerebral amperometric glutamate biosensors [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 33(1): 260-266.
- [91] Kirwan SM, Rocchitta G, McMahon CP, et al. Modifications of poly (*o*-phenylenediamine) permselective layer on Pt-Ir for biosensor application in neurochemical monitoring [J]. *Sensors*, 2007, 7(4): 420-437.
- [92] Mendelowitsch A, Sekhar LN, Wright DC, et al. An increase in extracellular glutamate is a sensitive method of detecting ischaemic neuronal damage during cranial base and cerebrovascular surgery. An *in vivo* microdialysis study [J]. *Acta Neurochirurgica*, 1998, 140(4): 349-355.
- [93] Bhowmick S, Moore JT, Kirschner DL, et al. Acidotoxicity via ASIC1a mediates cell death during oxygen glucose deprivation and abolishes excitotoxicity [J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2017, 8(6): 1204-1212.
- [94] Borisova T, Kucherenko D, Soldatkin O, et al. An amperometric glutamate biosensor for monitoring glutamate release from brain nerve terminals and in blood plasma [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1022: 113-123.
- [95] Del Castillo J, Katz B. Quantal components of the end-plate potential [J]. *The Journal of Physiology*, 1954, 124(3): 560-573.
- [96] Heuser JE, Reese TS. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1973, 57(2): 315-344.
- [97] Heuser JE, Reese TS, Dennis MJ, et al. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1979, 81(2): 275-300.
- [98] Wang YM, Fathali H, Mishra D, et al. Counting the number of glutamate molecules in single synaptic vesicles [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(44): 17507-17511.
- [99] Qiu QF, Zhang FL, Tang Y, et al. Real-time monitoring of exocytotic glutamate release from single neuron by amperometry at an enzymatic

- biosensor [J]. *Electroanalysis*, 2018, 30(6): 1054-1059.
- [100] Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *The Lancet Global Health*, 2013, 1(5): e259-e281.
- [101] Caragine LP, Park HK, Diaz FG, et al. Real-time measurement of ischemia-evoked glutamate release in the cerebral cortex of four and eleven vessel rat occlusion models [J]. *Brain Research*, 1998, 793(1-2): 255-264.
- [102] Dehghani N, Peyrache A, Telenczuk B, et al. Dynamic balance of excitation and inhibition in human and monkey neocortex [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23176.
- [103] During MJ, Spencer DD. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain [J]. *The Lancet*, 1993, 341(8861): 1607-1610.
- [104] Stephens ML, Williamson A, Deel ME, et al. Tonic glutamate in CA1 of aging rats correlates with phasic glutamate dysregulation during seizure [J]. *Epilepsia*, 2014, 55(11): 1817-1825.
- [105] Chan KY, Wang W, Wu JJ, et al. Epidemiology of Alzheimer's disease and other forms of dementia in China, 1990-2010: a systematic review and analysis [J]. *The Lancet*, 2013, 381(9882): 2016-2023.
- [106] Roberson ED, Halabisky B, Yoo JW, et al. Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic, network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2011, 31(2): 700-711.
- [107] Hunsberger HC, Rudy CC, Batten SR, et al. P301L Tau expression affects glutamate release and clearance in the hippocampal trisynaptic pathway [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2015, 132(2): 169-182.
- [108] Yang XK, Tang Y, Qiu QF, et al. $A\beta_{1-42}$ oligomers induced a short-term increase of glutamate release prior to its depletion as measured by amperometry on single varicosities [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(23): 15123-15129.