

阿尔兹海默症生物标志物和早期诊断新技术

李莹¹, 钱美齐¹, 邱雪^{1,2*}

(1. 中国海洋大学 海洋药物教育部重点实验室, 医药学院, 山东 青岛 266003; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋药物与生物制品功能实验室, 山东 青岛 266237)

摘要: 阿尔兹海默症是当今世界面临的最严重的神经退行性疾病之一。阿尔兹海默症患者的大脑表现出两种主要的神经病理改变: 老年斑和神经纤维缠结, 其典型临床症状包括记忆丧失、情绪改变、认知能力下降、说话、写作、行走困难等。阿尔兹海默症的早期诊断对通过早期干预策略延缓疾病或改变疾病进程甚至预防疾病都至关重要。该文综述了与阿尔兹海默症相关的蛋白、基因、miRNA、补体系统、激肽系统以及金属离子等生物标志物, 总结了现阶段阿尔兹海默症的临床诊断方法和检测试剂盒。由于目前临床诊断方法的有创性和高昂的费用, 迫切需要简单快速、创伤性小的分子诊断技术。该文列举了基于免疫反应、荧光、探针成像、电化学、纳米材料和miRNA等发展的新型检测技术, 这些分析手段为阿尔兹海默症的早期诊断提供了强有力的技术支持。

关键词: 阿尔兹海默症; β -淀粉样蛋白; tau蛋白; 新型生物标志物; 分子诊断

中图分类号: O629.7; R392.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)04-0553-09

Biomarkers and Early Diagnostics of Alzheimer's Disease

LI Ying¹, QIAN Mei-qi¹, QIU Xue^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Marine Drug, Ministry of Education, School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Laboratory for Marine Drugs and Bioproducts of Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266237, China)

Abstract: Alzheimer's disease is one of the most serious neurodegenerative diseases in the world. The brain of Alzheimer's patient after death showed two main neuropathological changes, i. e. senile plaques and neurofibrillary tangles, while the typical clinical symptoms of Alzheimer's disease include memory loss, mood swings, cognitive decline, and difficulty in speaking, writing and walking. Early diagnosis is essential for the prevention or treatment of Alzheimer's disease by introducing proper intervention. Biomarkers associated with Alzheimer's disease such as proteins, genes, miRNAs, complement system, kinin system and metal ions are reviewed in this paper, and the current clinical diagnostic methods and kits for Alzheimer's disease are also summarized. There is an urgent need to develop simple, rapid, and less invasive diagnostic techniques due to the invasion and high cost of the current methods. Meanwhile, the novel emerging detection methods based on immunoassay, fluorescence, bio-imaging, electrochemistry, nanotechnology and miRNAs are also presented, which have pushed forward the way of early diagnostics of Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's disease; amyloid β -protein; tau protein; novel biomarkers; molecular diagnostics

阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种渐进性痴呆症, 目前影响全球超过5 000万人, 预计到2050年将影响1.5亿人^[1]。由于AD的致病机理尚未被完全阐明, 针对AD的上市药物主要为症状缓解类, 疾病修正类药物极少, 因此目前人类尚无治愈AD的方法, 其中一个很重要的原因在于我们尚未检测到疾病时, 它已发生不可逆进展, 并产生明显的记忆丧失和神经功能下降。疾病早期诊断的生物标志物对通过早期干预策略延缓疾病或改变疾病进程甚至预防疾病都至关重要^[2-5]。本文将总结经典的和近年来新发现的AD生物标志物, 并调研针对这些生物标志物发展的新的检测技术。

收稿日期: 2021-12-30; 修回日期: 2022-01-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82104120)

* 通讯作者: 邱雪, 博士, 教授, 研究方向: 疾病早期分子诊断, E-mail: qiuxue@ouc.edu.cn

1 AD 核心标志物

1.1 β -淀粉样蛋白

β -淀粉样蛋白(Amyloid β -protein, $A\beta$)是由淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)经 β -分泌酶和 γ -分泌酶介导裂解产生的肽,有 37 ~ 43 个氨基酸残基,是一个非常古老的、保守的分子序列^[6-8]。 $A\beta$ 是一种无序的蛋白,缺乏稳定的三维结构,其分子的生命周期为从单体到低聚形式到原纤维^[9]。

$A\beta$ 的生理效应表现为浓度依赖性,即生理浓度下有助于记忆巩固;但病理浓度时会抑制记忆功能^[9]。 $A\beta$ 单体通过激活烟碱乙酰胆碱受体来调节突触功能,因此 $A\beta$ 单体稳态对正常的突触功能至关重要。超过一个临界浓度(纳摩尔范围)时,单体开始聚集成不同的 $A\beta$ 聚集体^[10]。普遍认为 $A\beta$ 的合成与清除之间的不平衡导致 $A\beta$ 的积累,引发了AD。从AD患者的脑脊液中共鉴定出26种 $A\beta$ 蛋白形态,其中分别含有40和42个氨基酸残基的 $A\beta$ 1-40和 $A\beta$ 1-42是累积的 $A\beta$ 的主要成分。 $A\beta$ 1-42具有更大的疏水性从而更易聚集^[11],被认为是脑内老年斑起始的罪魁祸首。 $A\beta$ 1-42水平或比例的增加会诱导 $A\beta$ 淀粉样纤维形成,积累的 $A\beta$ 淀粉样纤维发展为脑内老年斑,并导致神经毒性^[12]。 $A\beta$ 聚集体能够激活半胱氨酸蛋白酶,该酶能够切割tau蛋白,使正常的tau蛋白构象发生变化,导致tau蛋白不能与微管结合而聚集,诱导tau蛋白病理的产生而引发AD^[13]。

目前测定大脑中 $A\beta$ 的常用方法是脑脊液分析和正电子发射断层扫描技术(Positron emission computed tomography, PET),但这两种技术的侵入性和昂贵的费用限制了其应用。因此,通过外周体液研究 $A\beta$ 受到广泛关注^[14]。 $A\beta$ 单体可以通过多种方式从大脑清除到血液,例如血脑屏障清除系统和脑脊液吸收清除循环系统等^[14-15]。但是由于血浆中 $A\beta$ 1-42的浓度较低,不同的检测技术之间的灵敏度不同导致结果之间存在较大的差异^[16]。

1.2 tau 蛋白

tau蛋白是大脑中最常见的微管蛋白,在中枢神经系统中表达,在远端轴突中以六种亚型存在于人类脑中,是轴突细胞骨架的重要结构元件^[17-18]。tau蛋白的翻译后修饰包括磷酸化、硝化、乙酰化、泛素化、甲基化等,这些翻译后修饰与AD的发病机制相关^[19]。tau蛋白包含多个磷酸化位点,目前已通过质谱鉴定出超过47个磷酸化位点,主要位于其C端和脯氨酸结构域^[19-20]。细胞内磷酸化tau蛋白(Phosphorylated tau, p-tau)形成的聚集体将导致微管功能、轴突运输功能损伤和神经细胞骨架破坏以及神经元病变^[21]。激酶和磷酸化酶可分别诱导tau蛋白磷酸化和去磷酸化,tau蛋白磷酸化受多种蛋白激酶和磷酸化酶的调控^[20]。磷酸化和蛋白质去磷酸化之间的失衡将导致该蛋白与微管的结合受损,以及神经原纤维缠结的形成。p-tau蛋白的结构还可能受到 $A\beta$ 、氧化应激、神经炎症等的影响^[22]。

脑脊液(Cerebrospinal fluid, CSF)中总tau蛋白(Total-tau, t-tau)和p-tau蛋白升高是AD的明确标志^[23]。可溶性p-tau181和t-tau的浓度在显性遗传性AD和散发性AD的症状出现前就开始增加^[24]。脑脊液中的t-tau蛋白、p-tau蛋白和 $A\beta$ 1-42可以预测轻度认知障碍(Mild cognitive impairment, MCI)和早期AD,具有较高的敏感性和特异性^[25]。与脑源性血清外泌体相关的t-tau蛋白和p-tau蛋白可以更准确地区分轻度AD和MCI^[26]。此外还发现,这些血清外泌体相关蛋白的水平升高可以预测长期的认知能力下降^[21]。

2 AD 新型生物标志物

2.1 载脂蛋白E基因

载脂蛋白(Apolipoprotein, Apo)是血浆脂蛋白中的蛋白质成分,主要有A、B、C、D、E五大类,能够结合和运输脂质到机体各组织进行代谢及利用,在神经元的生长、修复、重组和保护中也具有重要作用。研究表明,与AD关系最为紧密的是载脂蛋白E(ApoE),ApoE 112位和158位两个氨基酸的不同使之可形成3种ApoE亚型:ApoE ϵ 2、ApoE ϵ 3、ApoE ϵ 4,分别由3个常见的等位基因(ϵ 2、 ϵ 3、 ϵ 4)编码。其中,ApoE ϵ 4可显著增加患AD的风险,这使得携带ApoE ϵ 4等位基因的AD患者发病年龄更早,并且倾向于有更明显的神经纤维缠结和淀粉样斑块聚集^[27],然而ApoE ϵ 4对AD风险的潜在机制尚不明确;ApoE ϵ 3等位基因是最常见的基因变体,可能会导致长期炎症反应;ApoE ϵ 2等位基因与降低AD的

发病风险相关,可以减少神经纤维缠结和淀粉样斑块的积累。总的来说,ApoE对AD患者大脑有调节作用^[28]。进一步的研究结果表明,大脑中的TOMM40-APOE基因座在调控ApoE水平和AD神经病理学方面具有复杂的作用^[29]。研究者通过分析脑脊液的ApoE水平与ApoE的基因变异和临床特征,发现脑脊液ApoE水平具有性别特异性,表明脑脊液ApoE可能以性别特异性的方式参与AD病理的发病机制^[30-31]。在ApoE ϵ 2对AD的预防作用方面,有研究表明ApoE ϵ 2已被确定为长寿基因,其对衰老过程具有系统性影响,然而ApoE ϵ 2并非完全有益,其携带者患某些脑血管疾病的风险显著增加^[32]。

2.2 β -分泌酶1

β -分泌酶1(Beta-site app cleaving enzyme 1, BACE1),即 β -淀粉样前体蛋白裂解酶1,是在外周神经细胞中形成髓鞘的一种重要的天冬氨酸蛋白酶,亦是促进A β 形成的关键酶,是一个包含两个活性位点的跨膜蛋白,可在细胞外形成二聚体。在AD患者脑脊液中,BACE1蛋白浓度和活性均升高,并且其升高程度与海马体体积缩小相关。此外,在MCI向AD转化的患者脑脊液中也发现BACE1的活性升高,已经达到AD患者中BACE1活性的同等水平。研究人员发现,MCI时期患者的组织中BACE1的活性与对照组相比显著增加27%,但优于AD现有的临床诊断指标,可能是AD神经功能障碍或病变的早期指标,也可能作为治疗AD的靶标^[33]。此外,有研究发现在最终转化为AD的MCI患者血液中BACE1酶的活性更高,而未转化为AD的MCI患者血液中的BACE1活性相对较低,表明检测血液中BACE1的活性可在MCI阶段预测AD的发生及发展^[34]。

2.3 早老素

早老素(Presenilin, PSEN)有两个亚型,即PSEN1和PSEN2,是两个同源的多跨膜蛋白,有约67%的同源序列,其同源序列为 γ -分泌酶的催化核心。Braggin等^[35]报告了早发性AD病例中一种罕见的PSEN2移码变体(PSEN2 p. K115Efs*11),其 γ 分泌酶活性异常,表明PSEN2 K115Efs*11可能是与AD相关的致病性变体,提示了PSEN变异可能是AD发病的潜在机制。PSEN1和PSEN2基因突变是家族性早发型AD最常见的原因,特别是PSEN1基因。这两个基因的突变通常会引起 γ -分泌酶活性的破坏,可促使APP形成有致病性的A β ,进而导致A β 1-42过度产生或A β 1-40产生不足,或者两种情况同时存在,最终导致A β 1-42和A β 1-40之间的比值增加^[36]。研究发现,大脑中的神经元信号,特别是钙离子(Ca²⁺)信号受PSEN调节,并受其基因突变的影响,而细胞内的Ca²⁺信号不仅控制神经元的活动,还影响基因的表达模式、细胞骨架的结构功能、突触的信号传导;此外PSEN对AD的细胞氧化应激和细胞活力也有一定的调节作用^[37-38]。

2.4 小胶质细胞受体(CD33)

CD33是一种介导细胞-细胞相互作用的细胞表面受体,为唾液酸结合受体跨膜蛋白家族中的一种,是细胞生长和存活的重要受体,也是网格蛋白非依赖性内吞途径以及先天性和适应性免疫系统功能的关键受体^[39],其基因多态性与晚发型AD有关^[40],有证据表明小胶质细胞中CD33的表达情况和淀粉样斑块负荷与认知功能相关^[41]。另有研究显示,CD33的多态性可通过使脑组织中海马回和海马旁回的神经元变性而增加AD发病的风险^[42]。然而CD33唾液酸结合域的表达下调可降低AD发生的风险,因此抑制CD33是一种有效的抑制AD病情发展的途径,CD33上的唾液酸结合位点是一个有前景的药效团^[40]。

2.5 神经丝轻链蛋白

神经丝轻链蛋白(Neurofilament light chain, NfL)是细胞骨架蛋白的一种,其主要功能是维持轴突功能和稳定的神经传导,是轴突损伤的非特异性标志物。正常生理条件下轴突释放少量的NfL,但在病理条件下NfL的释放量显著增加,脑脊液和血液中的NfL浓度与神经病变程度密切相关。临床研究表明具有患AD风险的人群在发病之前有比正常情况下更高的NfL水平,而且血液和脑脊液中的NfL水平早在这些患者开始出现神经病变症状之前(疾病发作前16年)就开始上升^[43]。研究结果显示在有遗传风险的非痴呆个体中,血浆NfL水平、认知能力和tau病理学三者之间存在关联,这些个体可能会发展为AD^[44]。然而NfL水平在许多神经退行性疾病中均会升高,并不具有疾病特异性,因此是否可将其作为AD诊断的标志物尚待考究,但其在判断疾病分期、预测疾病进展和疾病预后中仍有一定的价值^[44]。

2.6 补体系统与激肽系统

AD 与突触缺失密切相关, 而补体系统已被证明参与突触的清除。一些研究指出 AD 与补体系统之间存在关联。与未发展为 AD 的 MCI 相比, AD 患者脑脊液中补体 C3 和补体 C4 的水平升高, 这些结果表明异常的补体水平可影响 AD 的发展过程, 故可将其作为 AD 诊断的生物标志物^[45]。此外 $A\beta$ 蛋白可激活血浆的激肽系统, 导致激肽释放酶介导的完整的高分子量激肽原(HKi)被切割成裂解的高分子量激肽原(HKc), 可通过 Western blot 观察到 AD 患者血浆的 HKi 分裂增加, HKc 浓度升高^[46]。

2.7 microRNA

microRNA(miRNA)是一类内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA, 参与转录后基因表达调控。异常的 miRNA 水平通过调控 AD 相关病理蛋白影响 AD 的疾病发展过程, 不同类别的 miRNA 水平上调或下调均会影响 AD 的发展过程, 进而可影响 AD 患者体内 $A\beta$ 或 tau 蛋白的水平。miRNA 主要通过调控 APP 的表达、剪切以及相应酶的活性改变 $A\beta$ 水平。相关研究显示, 与对照组相比, MCI 和 AD 组的 miR-193b、miR-101、miR-124 的水平降低, 与 $A\beta$ 水平呈负相关, 这些 miRNA 的表达水平降低可使 APP 表达增加或者促进 APP 外显子剪切, 进而影响患者体内 $A\beta$ 的水平^[47-49]; 此外, 影响 BACE1 活性和表达量的 miRNA 表达水平改变也会影响 $A\beta$ 的合成, miR-29c、miR-195、miR-124 基因表达的下调可通过调节 BACE1 蛋白水平、促进 $A\beta$ 合成及细胞损伤等途径促进 $A\beta$ 斑块的形成^[50-52]。已有研究表明 miRNA 也会通过影响 tau 蛋白的合成进而影响 AD 的发生、发展, 其中, miR-219 表达水平下调可抑制 tau 的合成, miR-132/212 水平下调将增加 tau 的表达和磷酸化, miR-34a 水平上调会促进内源性 tau 表达, miR-128 水平上调则促进 tau 的降解和聚集, miR-125b 表达水平上调可促进 tau 的磷酸化^[53-56]。除此之外, 外周血中多种 miRNAs 水平显著变化也可作为 AD 的诊断指标, 但其诊断价值未被大规模临床研究证实。

2.8 金属离子

2.8.1 铁离子 铁是大脑中含量最丰富的过渡金属, 参与神经递质合成(如血清素、去甲肾上腺素和多巴胺)、髓鞘生成、神经元发育等生理过程。然而, 铁在 AD 患者大脑中的积累和在皮质中的异常分布被认为是 AD 的致病因素, 研究者已经确认铁蓄积的程度与脑组织中 $A\beta$ 斑块的数量、tau 病理学以及 AD 疾病分期相关^[57-58]。铁异常分布导致的铁稳态失调是 AD 的一个特征, 铁可以通过促氧化剂分子(例如羟基自由基等)与 AD 病理学蛋白(淀粉样前体蛋白和 tau 蛋白)相互作用, 进一步促进蛋白聚集; 铁还可以与 AD 中的 tau 蛋白结合, 通过与神经原纤维缠结的相互作用增强 tau 蛋白的毒性, 并诱导这些缠结的积累, 这些病理变化与 AD 的发展和认知能力下降有关^[59-60]。

2.8.2 铜离子 铜既是氧化剂又是抗氧化剂, 在机体内主要起催化作用。许多含铜金属酶作为氧化酶, 参与体内氧化还原过程, 已被证实在人体中有重要的生理功能。铜离子对 AD 的发生发展具有一定的作用, 在 AD 患者脑组织中, 铜离子的稳态失调对 $A\beta$ 和 tau 蛋白的生理活性有一定的影响; 此外, AD 患者脑内铜离子水平和定位会发生较大变化, 淀粉样沉积物中有铜离子的积累, 而一些脑组织区域的铜离子水平则不足。APP 和 $A\beta$ 均具有铜离子结合位点, 可通过与铜离子发生相互作用产生活性氧导致神经毒性; 此外, AD 患者的铜代谢会发生系统性变化, 脑内铜离子水平的改变也可能影响 AD 的神经炎症过程^[61]。

2.8.3 锌离子 锌是人体中枢神经系统(Central nervous system, CNS)中第二丰富的微量元素, 老年人和 AD 患者存在锌稳态受损的情况^[62]。越来越多的证据表明, 锌离子可以导致大脑中的 $A\beta$ 沉积和老年斑形成, 因此大脑中的锌离子水平亦可作为 AD 的病理特征指标^[63]。

3 检测方法

3.1 临床诊断方法

现阶段对于 AD 的临床诊断大多基于四个方面, 分别为基于量表的认知功能评估、PET、脑脊液诊断以及危险基因 ApoE 检测。老年痴呆诊断测试量表常用 Mini-Mental State Examination, 即 MMSE, 可评估记忆和其他认知功能, 是目前最具影响的认知缺损筛选工具之一。MMSE 置信度良好, 总分与患者 CT 的脑萎缩呈正相关; PET 显像属于分子显像和功能显像范畴, 可通过向病人体内注射成像剂(如

18F-FDG、18F-FDDNP、11C-PBBB3、11C-PIB3等),直观地显示患者的神经元突触功能、 $A\beta$ 沉积、tau蛋白磷酸化程度、多种神经递质和受体变化情况;脑脊液诊断是一种有创性检查,通过腰椎穿刺,从脊椎骨间隙抽取一定量的脑脊液进行检测,AD患者脑脊液中的 $A\beta_{42}$ 水平明显低于正常人,小于550 pg/mL,而tau蛋白水平明显高于正常人,一般大于375 pg/mL,结合检测脑脊液的 $A\beta_{42}$ 和tau水平可诊断无症状AD,准确率可达90%左右^[64];ApoE危险基因检测是通过检测患者体内ApoE基因的表达情况预测和推断病人患AD的风险,ApoE基因检测结果分为一般风险型、较低风险型和较高风险型3类,可反映受试者患AD的风险情况。

3.2 临床诊断试剂盒

现有的临床诊断试剂盒大多以 $A\beta_{42}$ 和tau蛋白作为诊断标志物,少有基于其他新型生物标志物开发的诊断试剂盒,国内外临床诊断公司均有生产和开发AD检测试剂盒。

国内的诊断公司主要包括先声诊断、豪思生物、贝格尔生物等多家生物公司。先声诊断提供两款AD诊断试剂盒,其一为运用ELISA方法进行脑脊液中4种生物标志物($A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ 、t-tau、p-tau181)的检测,其二为利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱,通过受试者外周血基因型分析进行ApoE基因高风险人群鉴别。而豪思生物正在研发的AD诊断试剂盒是采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)技术检测受试者血浆中的8种AD相关生物标志物,该试剂盒希望通过外周血测试帮助临床医生进行AD的早期诊断、疾病分期,监测痴呆疾病进程和评价治疗效果。贝格尔生物公司正在与海外科研团队合作研究基于血清外泌体的AD诊断技术,与PET- $A\beta$ 等临床诊断“金标准”结果相比,AD相关血清外泌体生物标志物显示出较好的灵敏度与特异性^[65]。该公司正在进行大规模临床样品测试。可以看出,国内的生物公司对于AD检测试剂盒的研发尚处于起步阶段,简便、高效、准确的检测试剂盒有待开发。

海外生物公司生产的AD诊断试剂盒也主要基于传统的生物标志物,其中拜尔公司开发的试剂盒通过检测脑脊液中的 $A\beta_{1-42}$ 、t-tau和p-tau水平进行AD诊断;德国欧蒙公司以及Fujirebio公司的检测项目为脑脊液中的 $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ 、p-tau181、t-tau等;Quanterix公司的试剂盒可通过患者脑脊液或血液样本测定 $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ 、p-tau181、t-tau的含量,进而进行AD的临床诊断;而Seebio公司可检测组织上清液、组织匀浆、脑脊液、血浆等样品,但其测量只限于科研用途,不用做临床诊断,其检测的生物标志物主要为 $A\beta_{1-42}$ 。

3.3 新型检测技术研究进展

3.3.1 基于免疫反应的AD早期诊断 Chen等^[66]通过单分子阵列(Single-molecule array, Simoa)免疫法检测血清、血浆和CSF中的p-tau181,其灵敏度比ELISA高出1 000倍以上。该技术直接将蛋白质检测技术带入到单分子、数字化检测时代,能够进行超低丰度蛋白质的检测^[43]。通过单克隆抗体捕获p-tau181,再加入生物素标记的tau蛋白抗体进行检测,发现AD患者血浆中的p-tau181水平是对照组的2倍,脑脊液中的p-tau181水平是对照组的10倍。

Budde等^[67]开发了一种可重复使用的表面免疫红外传感器,用于检测人脑脊液中的 $A\beta$ 和tau蛋白。该传感器的关键元件是表面具有化学修饰的衰减全反射(Attenuated total reflectance, ATR)晶体,可将生物标志物从体液中捕获出来。传感器表面用免疫球蛋白结合蛋白A或蛋白G共价包被,蛋白A和蛋白G能够与IgG抗体Fc恒定区发生高亲和力相互作用,该相互作用与常规N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)偶联相比具有更强的特异性,并且可通过化学处理(例如pH值变化)逆转。蛋白A和蛋白G可用于抗体的非共价结合和抗原的分析,因此这种免疫平台可以与蛋白A和G的所有抗体联合使用。这种检测方法为快速分析AD患者血液和CSF样本提供了一个可逆平台。

Kim等^[68]将一种具有Tau-381亚型特异性的DNA适配体和抗体应用于表面等离子体共振平台上(Surface plasmon resonance platform, SPR)进行人血浆中Tau-381亚型的浓度分析,检测限为10 fmol/L。通过与商品化的ELISA试剂盒进行比较发现,该检测方法的性能增强了1 000倍,同时还能够测量ELISA无法测量到的2 pmol/L的浓度。

3.3.2 基于荧光的AD早期诊断 Zhang等^[69]首次以丁酰胆碱酯酶(Butyrylcholinesterase, BChE)和活性氧(Reactive oxygen species, ROSs)为双靶点,亚甲蓝作为荧光指示剂进行AD的早期诊断。环丙基甲酸

酯是 BChE 的特异性反应位点, 而水解之后暴露的羧基碳酰胺则作为 ROS 氧化还原的基团。此探针使 BChE 催化的酶水解反应与 ROS 诱导的氧化还原反应发生偶联, 在酶水解和氧化还原两个因素的共同作用下, 亚甲蓝产生荧光。该双靶点探针还可避免假阳性反应。

Zhang 等^[70]开发了一种四价十字形 DNA 纳米结构介导的级联催化发夹结构扩增反应, 用于 A β 低聚物的检测。两个 DNA 纳米结构的末端分别被修饰上带有荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 供受体探针的 DNA 发夹结构, 作为整个检测的信号放大部分。他们还设计了一个能够识别 A β 低聚物的 DNA 识别发夹和一个在打开后能够释放与 DNA 纳米结构结合的 DNA 单链的激活发夹。当 A β 低聚物存在时, 识别发夹与激活发夹结合释放出激活发夹的 DNA 链, 该链能够触发 DNA 纳米结构中的发夹打开, 产生 FRET 信号, 对 A β 低聚物的检测限为 0.69 pmol/L。

3.3.3 基于探针成像的 AD 早期诊断 发射波长在近红外范围内的荧光探针允许光穿透组织, 同时可以避免生物自发荧光。近红外荧光 (Near-infrared fluorescence, NIRF) 已经成为光学成像的首选工具。Seo 等^[71]设计了一种近红外荧光探针, 该探针以不同的构象与 tau 聚集物、A β 聚集物结合, 且只有与 tau 聚集物识别时的构象可以产生荧光。同时该探针表现出分子转子特性, 随着溶液黏度的增加, 探针的荧光强度增加。

Ge 等^[72]设计了一种荧光寿命探针, 该探针以两个锌吡啶胺作为识别单元, 可以与 p-tau 的磷酸化位点特异性结合, 通过光致电子转移机制 (Photoinduced electron transfer mechanism, PET) 实现神经元细胞内 p-tau 蛋白的荧光寿命成像。

3.3.4 基于电化学的 AD 早期诊断 Duan 等^[73]通过多孔 11-巯基十一碳酸 (Mercapto undecanoic acid, MUA) 修饰的 Au 电极上覆盖平面双层脂质膜 (Bilayer lipid membrane, BLM) 构建了电化学生物传感器, 根据可溶性低聚 A β 1-42 (Low-mass, soluble oligomers, L-A β 42O) 和可溶性低聚 A β 40 (L-A β 40O) 诱导 BLM 损伤的动态差异, 基于电化学阻抗谱 (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS) 实现了两者的选择性测定。Au 电极上的 MUA 层放大了与膜损伤相对应的抗阻信号, 提高了检测灵敏度。BLM 的弱电荷表面可以降低 CFS 中其他蛋白的非特异性吸附。该传感器可在 20 min 内实现 L-A β 42O 的测定, 线性范围为 5 ~ 500 pmol/L, 检测限为 3 pmol/L; 可在 60 min 内测定 L-A β 40O, 线性范围为 60 pmol/L ~ 6.0 nmol/L, 检测限为 26 pmol/L。

3.3.5 基于纳米材料的 AD 早期诊断 Hadjimetriou 等^[74]使用纳米粒获得血浆中的蛋白冠, 监测了血浆蛋白质组随 AD 进展的变化。由于纳米粒与体液孵育时, 可以自发在表面捕获数百种蛋白质形成蛋白冠, 因此可通过蛋白冠深入分析血浆蛋白质组。通过 LC-MS 对所得的蛋白冠进行分析, 发现在 A β 斑块形成前, AD 患者血浆蛋白质组的丰度开始出现波动, 并可以根据丰度变化确定疾病分期。

Iglesias-Mayor 等^[75]将双功能 Au@Pt/Au 核@壳纳米粒作为电化学免疫传感的新型标签, 基于水氧化反应过程产生的催化电流的变化检测 p53 的构象变化, 方法在血浆中的检测限为 66 nmol/L。构象改变的 p53 在轻度认知障碍患者中表达, 并与认知障碍的进展呈正相关^[76]。在 Au@Pt 纳米粒表面的 Au 突起使纳米粒更易与抗体进行生物偶联, 且 Au 与 Pt 在纳米粒表面的协同作用可提高催化活性, 进而提高检测的灵敏度。

Vilela 等^[77]开发了一种基于上转换纳米颗粒-石墨烯氧化物的光学传感器, 可特异性检测与 AD 相关的 miRNA。该传感器将近红外光上转换与低背景光子计数相结合, 能够可靠地检测 fmol/L 范围内的少量小寡核苷酸序列。即使在血浆和细胞裂解液等复杂介质中, 该传感器对特定靶标同样具有高度的选择性。

Zhang 等^[78]构建了一个多路复用的表面增强拉曼散射 (Surface-enhanced Raman scattering, SERS) 生物传感器, 用于检测 A β 1-42 低聚物和 tau 蛋白。他们将一段用于靶标识别的适配体和一段用于修饰在金纳米粒子 (AuNPs) 表面的 polyA 偶联, 当靶蛋白与适配体特异性结合后, polyA 寡核苷酸会偏离 AuNPs, 破坏溶液中纳米偶联物的稳定性, 引发相邻 AuNPs 之间的等离子体共振耦合效应, 进而实现蛋白质生物标志物的 SERS 检测。该生物传感器能够在 15 min 内完成检测, 并可以同时检测 tau 蛋白和 A β 1-42 低聚物。

3.3.6 基于 miRNA 检测的 AD 早期诊断 Dong 等^[79]首先采用高通量 Solexa 测序筛选 AD 血清 miRNA 的

全基因组表达谱,然后采用个体水平的多重RT-qPCR检测确定AD的特异性miRNA谱。与对照组相比,AD患者血清中有4种miRNA(miR-31、miR-93、miR-143和miR-146a)显著减少,MCI中的miR-93和miR-146a显著升高,可作为通过外周血进行AD诊断的依据。

Chandrasekaran等^[80]使用一种名为miRacles的技术进行AD相关RNA的检测。当识别目标miRNA后,DNA纳米结构由线型变成环状结构,由于线型结构和环状结构的电泳速率存在差异,因此能够通过电泳读数报告其开/关状态,实现miRNA的检测。该方法能够直接检测天然miRNA,不需要扩增、标记以及酶的催化。该研究筛选了56种与AD相关的miRNA,发现其中4种在AD患者脑中表达存在异常。该纳米开关对与AD相关的miR-107具有fmol/L级的灵敏度。

4 结 论

综上所述,现阶段被用于AD诊断的生物标志物,包括脑脊液tau蛋白和 β 淀粉样蛋白水平,以及能反映结构和功能的PET成像等。但在通过早期诊断来干预AD的发展中作用有限,因为这些方法侵入性高,费用昂贵,受众群体较小。基于外周血的生物标志物是更好的选择,但由于血脑屏障的存在,脑脊液中各种疾病相关蛋白的表达量与外周血中相关蛋白的表达量可能相差甚远,现阶段尚无满足AD的血清学早期诊断灵敏度和特异性需求的生物标志物供临床应用。但越来越多的生物标志物可用于AD的诊断,相关研究也日益深入,日后有望开发出新的便捷、灵敏、高效、准确的基于外周体液的AD分子诊断方法,以实现无创、伤害性小的辅助诊断。发掘疾病相关性高的外周体液生物标志物并开发相应的高效灵敏检测方法是未来重要的研究方向,通过对AD的疾病筛查和早期诊断以及后续及时的预防和干预手段,将大大降低阿尔兹海默症的疾病发病率,具有极为重要的临床价值和社会意义。

参考文献:

- [1] Philip S, Bart De S, Miia K, Henne H, Gael C, Charlotte E T, Jeffrey C, Van Der Flier W M. *Lancet*, **2021**, 397 (10284): 1577–1590.
- [2] Qiu X, Wegner K D, Wu Y T, Van Bergen En Henegouwen P M P, Jennings T L, Hildebrandt N. *Chem. Mater.*, **2016**, 28(22): 8256–8267.
- [3] Qiu X, Xu J Y, Guo J J, Yahia A A, Kapetanakis N-I, Duroux R I, Unterluggauer J J, Golob S N, Regeard C, Uzan C, Gouy S, Dubow M, Haybaeck J, Apparailly F, Busson P, Hildebrandt N. *Chem. Sci.*, **2018**, 9(42): 8046–8055.
- [4] Qiu X, Hildebrandt N. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **2019**, 19(9): 767–771.
- [5] Qiu X, Xu J Y, Cardoso Dos Santos M, Hildebrandt N. *Acc. Chem. Res.*, **2022**, 55(4): 551–564.
- [6] Masters C L, Simms G, Weinman N A, Thaupt G M, McDnald B L, Beyreuther K. *Med. Sci.*, **1985**, 82(4): 4245–4249.
- [7] Penke B, Bogar F, Paragi G, Gera J, Fulop L. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2019**, 20(6): 577–599.
- [8] Tharp W G, Sarkar I N. *BMC Genom.*, **2013**, 14(1): 290–304.
- [9] Penke B, Szucs M, Bogar F. *Molecules*, **2020**, 25(7): 1569–1597.
- [10] Dawkins E, Small D H. *J. Neurochem.*, **2014**, 129(5): 756–769.
- [11] Montalto M C, Farrar G, Hehir C T. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2007**, 1097: 239–258.
- [12] Kametani F, Hasegawa M. *Front. Neurosci.*, **2018**, 12: 25–36.
- [13] Butzlaff M, Ponimaskin E. *Opera Medica Et Physiologica*, **2016**, 2(9): 91–100.
- [14] Wang X N, Sun Y, Li T R, Cai Y N, Han Y. *J. Alzheimer's Dis.*, **2020**, 73(3): 819–832.
- [15] Tarasoff-Conway J M, Carare R O, Osorio R S, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, Axel L, Rusinek H, Nicholson C, Zlokovic B V, Frangione B, Blennow K, Menard J, Zetterberg H, Wisniewski T, De Leon M J. *Nat. Rev. Neurol.*, **2015**, 11(8): 457–470.
- [16] Lue L F, Sabbagh M N, Chiu M J, Jing N M, Snyder N L, Christopher S, Andre G, Belden C M, Chen T F, Yang C C. *Front. Aging Neurosci.*, **2017**, 9: 226–234.
- [17] Neve R L, Harris P, Kosik K S, Kurnit D M, Donlon T A. *Brain Res.*, **1986**, 1(3): 271–280.
- [18] Nukina N, Ihara Y. *J. Biochem.*, **1986**, 99(5): 1541–1544.
- [19] Guo T T, Zhang D H, Zeng Y Z, Huang T Y, Xiu H X, Zhao Y J. *Mol. Neurodegener.*, **2020**, 15(1): 1–37.
- [20] Tapia-Rojas C, Cabezas-Opazo F, Carol A D, Erick H V, Gail V W J, Quintanilla R A. *Prog. Neurobiol.*, **2019**, 175: 54–76.

- [21] Nam E, Lee Y B, Moon C, Chang K A. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(14): 5007 – 5026.
- [22] Rabbito A, Dulewicz M, Kulczyńska – Przybik A, Mroczko B. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(6): 1989 – 1999.
- [23] Park J C, Han S H, Yi D, Byun M S, Lee J H, Jang S, Ko K, Jeon S Y, Lee Y S, Kim Y K, Lee D Y, Jung I M. *Brain*, **2019**, 142(3): 771 – 786.
- [24] Barthélemy N R, Benzinger T L S, Li Y, Joseph – Mathurin N, Buckles V, Morris J C, Karch C M, Berman S B, Ikeuchi T, Xiong C, Mori H, Schofield P R, Gordon B A, Fagan A M, Allegri R, Shimada H, O’connor A, Fox N C, Levin J, Hassenstab J, Perrin R J, Mendez P C, Shoji M, Suzuki K, Noble J, Farlow M, Chhatwal J, Graff – Radford N R, Salloway S, Masters C L, Martins R N, Jucker M, Lehmann S, Sato C, Bateman R J. *Nat. Med.*, **2020**, 26(8): 398 – 407.
- [25] Lantero R J, Karikari T K, Suarez – Calvet M, Troakes C, King A, Emersic A, Aarsland D, Hye A, Zetterberg H, Blennow K, Ashton N J. *Acta Neuropathol.*, **2020**, 140(3): 267 – 278.
- [26] Roopkumar S, Jongsung K. *Trends Anal. Chem.*, **2018**, 105: 240 – 250.
- [27] Nikolac P M, Pivac N. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2019**, 1192: 27 – 52.
- [28] Lai M K, Tsang S W, Garcia – Alloza M, Minger S L, Nicoll J A, Esiri M M, Wong P T, Chen C P, Ramirez M J, Francis P T. *Neurobiol. Dis.*, **2006**, 22(3): 555 – 561.
- [29] Bezuch N, Bradburn S, Robinson A C, Pendleton N, Payton A, Murgatroyd C. *J. Alzheimer's Dis.*, **2021**, 5(1): 275 – 282.
- [30] Tulloch J, Leong L, Thomson Z, Chen S, Lee E G, Keene C D, Millard S P, Yu C E. *Brain Res.*, **2018**, 1698(7): 179 – 186.
- [31] Liu Y, Song J H, Xu W, Hou X H, Li J Q, Yu J T, Tan L, Chi S. *Front. Neurosci.*, **2021**, 15: 104 – 114.
- [32] Li Z H, Shue F, Zhao N, Shinohara M, Bu G J L. *Mol. Neurodegener.*, **2020**, 15(1): 1 – 19.
- [33] Cheng X, He P, Lee T, Yao H L, Li R N, Shen Y. *Am. J. Pathol.*, **2014**, 184(1): 141 – 147.
- [34] Shen Y, Wang H B, Sun Q Y, Yao H L, Keegan A P, Mullan M, Wilson J, Lista S, Leyhe T, Laske C, Rujescu D, Levey A, Wallin A, Blennow K, Li R N, Hampel H. *Biol. Psychiatry*, **2018**, 83(5): 447 – 455.
- [35] Braggin J E, Bucks S A, Course M M, Smith C L, Sopher B, Osnis L, Shuey K D, Domoto – Reilly K, Caso C, Kinoshita C, Scherpelz K P, Cross C, Grabowski T, Nik S H M, Newman M, Garden G A, Leverenz J B, Tsuang D, Latimer C, Gonzalez – Cuyar L F, Keene C D, Morrison R S, Rhoads K, Wijsman E M, Dorschner M O, Lardelli M, Young J E, Valdmanis P N, Bird T D, Jayadev S. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **2019**, 6(4): 762 – 777.
- [36] Vidal G A, Naresh A, Marrero L, Jones F E. *J. Biol. Chem.*, **2005**, 280(6): 19777 – 19783.
- [37] Duncan R S, Song B, Koulen P. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, 19(6): 1621 – 1631.
- [38] Galla L, Redolfi N, Pozzan T, Pizzo P, Greotti E. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(3): 770 – 792.
- [39] Naj A C, Jun G, Beecham G W, et al. *Nat. Genet.*, **2011**, 43(5): 436 – 441.
- [40] Miles L A, Hermans S J, Crespi G A N, Gooi J H, Doughty L, Nero T L, Markulic J, Ebnet A, Wroblowski B, Oehrich D, Trabanco A A, Rives M L, Royaux I, Hancock N C, Parker M W. *iScience*, **2019**, 19: 110 – 118.
- [41] Griciuc A, Serrano – Pozo A, Parrado A R, Lesinski A N, Asselin C N, Mullin K, Hooli B, Choi S H, Hyman B T, Tanzi R E. *Neuron*, **2013**, 78(4): 631 – 643.
- [42] Wang W Y, Liu Y, Wang H F, Tan L, Sun F R, Tan M S, Tan C C, Jiang T, Tan L, Yu J T. *Mol. Neurobiol.*, **2017**, 54(7): 1111 – 1118.
- [43] Preische O, Schultz S A, Apel A, Kuhle J, Kaeser S A, Barro C, Graber S, Kuder – Buletta E, Lafougere C, Laske C, Voglein J, Levin J, Masters C L, Martins R, Schofield P R, Rossor M N, Graff – Radford N R, Salloway S, Ghetti B, Ringman J M, Noble J M, Chhatwal J, Goate A M, Benzinger T L S, Morris J C, Bateman R J, Wang G, Fagan A M, Mcdade E M, Gordon B A, Jucker M. *Nat. Med.*, **2019**, 25(2): 277 – 283.
- [44] Jr Jack C R, Bennett D A, Blennow K, Carrillo M C, Dunn B, Haeberlein S B, Holtzman D M, Jagust W, Jessen F, Karlawish J, Liu E, Molinuevo J L, Montine T, Phelps C, Rankin K P, Rowe C C, Scheltens P, Siemers E, Snyder H M, Sperling R. *Alzheimer's Dement.*, **2018**, 14(4): 535 – 562.
- [45] Daborg J, Andreasson U, Pekna M, Lautner R, Hanse E, Minthon L, Blennow K, Hansson O, Zetterberg H. *J. Neural. Transm.*, **2012**, 119(7): 789 – 797.
- [46] Yamamoto – Imoto H, Zamolodchikov D, Chen Z L, Bourne S L, Rizvi S, Singh P, Norris E H, Weis – Garcia F, Strickland S. *Alzheimer's Dement.*, **2018**, 10(9): 480 – 489.
- [47] Liu C G, Song J, Zhang Y Q, Wang P C. *Mol. Med. Rep.*, **2014**, 10(5): 2395 – 2400.
- [48] Vilardo E, Barbato C, Ciotti M, Cogoni C, Ruberti F. *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(7): 18344 – 18351.
- [49] Smith P, Al Hashimi A, Girard J, Delay C, Hebert S S. *J. Neurochem.*, **2011**, 116(2): 240 – 247.
- [50] Lei X F, Lei L J, Zhang Z L, Zhang Z Q, Cheng Y. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **2015**, 8(2): 1565 – 1574.
- [51] Zhu H C, Wang L M, Wang M, Song B, Tan S, Teng J F, Duan D X. *Brain Res. Bull.*, **2012**, 88(5): 596 – 601.

- [52] Fang M, Wang J, Zhang X, Geng Y, Hu Z, Rudd J A, Ling S, Chen W, Han S. *Toxicol. Lett.*, **2012**, 209(1): 94 – 105.
- [53] Santa – Maria I, Alaniz M E, Renwick N, Cela C, Fulga T A, Van Vactor D, Tuschl T, Clark L N, Shelanski M L, McCabe B D, Crary J F. *J. Clin. Invest.*, **2015**, 125(2): 681 – 686.
- [54] Smith P Y, Hernandez – Rapp J, Jolivet F, Lecours C, Bisht K, Goupil C, Dorval V, Parsi S, Morin F, Planel E, Bennett D A, Fernandez – Gomez F J, Sergeant N, Buee L, Tremblay M E, Calon F, Hebert S S. *Hum. Mol. Genet.*, **2015**, 24(23): 6721 – 6735.
- [55] Dickson J R, Kruse C, Montagna D R, Finsen B, Wolfe M S. *J. Neurochem.*, **2013**, 127(6): 739 – 749.
- [56] Banzhaf – Strathmann J, Benito E, May S, Arzberger T, Tahirovic S, Kretschmar H, Fischer A, Edbauer D. *EMBO J.*, **2014**, 33(15): 1667 – 1680.
- [57] van Duijn S, Bulk M, van Duinen S G, Nabuurs R J A, van Buchem M A, van Der Weerd L, Nettekoven R. *J. Alzheimer's Dis.*, **2017**, 60(12): 1533 – 1545.
- [58] Magaki S, Raghavan R, Mueller C, Oberg K C, Vinters H V, Kirsch W M. *Neurosci. Lett.*, **2007**, 418(1): 72 – 76.
- [59] Masaldan S, Belaidi A A, Ayton S, Bush A I. *Pharmaceuticals (Basel)*, **2019**, 12(2): 93 – 103.
- [60] Olsen I. *J. Alzheimer's Dis. Rep.*, **2021**, 5(1): 79 – 86.
- [61] Donnelly P S, Xiao Z, Wedd A G. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2007**, 11(2): 128 – 133.
- [62] Xie Z Y, Wu H G, Zhao J F. *Neurotoxicology*, **2020**, 80(9): 112 – 123.
- [63] Tian Z Y, Wang C Y, Wang T, Li Y C, Wang Z Y. *Aging Dis.*, **2019**, 10(4): 756 – 769.
- [64] Mulder C, Verwey N A, van Der Flier W M, Bouwman F H, Kok A, van Elk E J, Scheltens P, Blankenstein M A. *Clin. Chem.*, **2010**, 56(2): 248 – 253.
- [65] Lim C Z J, Zhang Y, Chen Y, Zhao H, Stephenson M C, Ho N R Y, Chen Y, Chung J, Reilhac A, Loh T P, Chung J, Shao H L. *Nat. Commun.*, **2019**, 10(1): DOI: 10.1038/s41467-019-09030-2.
- [66] Chen Y, Chang L, Blennow K, Zetterberg H, Ball A J. *Alzheimer's Dement.*, **2020**, 16(S4): e041238.
- [67] Budde B, Schartner J, Tonges L, Kotting C, Nabers A, Gerwert K. *ACS Sens.*, **2019**, 4(7): 1851 – 1856.
- [68] Kim S, Wark A W, Lee H J. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(15): 7793 – 7799.
- [69] Zhang P, Fu C X, Liu H H, Guo X J, Zhang Q, Gao J, Chen W J, Yuan W, Ding C F. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(8): 11337 – 11345.
- [70] Zhang Y Y, Zhao J W, Yang G M, He Y, Chen S H, Yuan R. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2021**, 13(8): 32013 – 32021.
- [71] Seo Y, Park K S, Ha T, Kim M K, Hwang Y J, Lee J, Ryu H, Choo H, Chong Y. *ACS Chem. Neurosci.*, **2016**, 7(11): 1474 – 1481.
- [72] Ge L H, Tian Y. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(5): 3294 – 3301.
- [73] Duan Y M, Chen J, Jin Y, Tu Q Y, Wang S H, Xiang J. *Anal. Chem.*, **2021**, 93(7): 3611 – 3617.
- [74] Hadjide metriou M, Rivers – Auty J, Papafilippou L, Eales J, Kellett K A B, Hooper N M, Lawrence C B, Kostarelos K. *ACS Nano*, **2021**, 15(4): 7357 – 7369.
- [75] Iglesias – Mayor A, Amor – Gutierrez O, Novelli A, Fernandez – Sanchez M T, Costa – Garcia A, de la Escosura – Muniz A. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(10): 7209 – 7217.
- [76] Picciarelli S, van Neste L, Fowler C, Masters C L, Fripp J, Doecke J D, Xiong C, Uberti D, Kinnon P. *medRxiv*, **2021**, <https://doi.org/10.1101/2021.08.23.21261848>.
- [77] Vilela P, El – Sagheer A, Millar T M, Brown T, Muskens O L, Kanaras A G. *ACS Sens.*, **2017**, 2(4): 52 – 56.
- [78] Zhang X, Liu S, Song X D, Wang H W, Wang J F, Wang Y, Huang J D, Yu J H. *ACS Sens.*, **2019**, 4(9): 2140 – 2149.
- [79] Dong H, Li J L, Huang L, Chen X, Li D H, Wang T, Hu C Y, Xu J, Zhang C N, Zen K, Xiao S F, Yan Q, Wang C, Zhang C Y. *Dis. Markers*, **2015**, 2015(9): 625659.
- [80] Chandrasekaran A R, Halvorsen K. *ACS Sens.*, **2021**, 6(9): 3176 – 3181.

(责任编辑: 盛文彦)