

• 综 述 •

阿尔茨海默病外周血早期生物标志物及其分析方法研究进展*

祁 艳 综述, 张臻昊, 刘 玉, 刘欣梦, 陈娜娜, 劳可静[△] 审校
(西安医学院/基础与转化医学研究所, 陕西 西安 710000)

[摘要] 阿尔茨海默病(AD)是一种起病隐匿、病理复杂的神经退行性疾病。AD 患者临床确诊时通常已发展到中晚期。蛋白标志物在 AD 发展极早期即从脑脊液穿越血脑屏障进入外周循环。外周血标志物检测具有采集方便、创伤小的特点,有望成为最具潜力的早期筛查和随诊手段。然而传统免疫分析方法无法实现外周血中超微量蛋白标志物的精准定量分析,近年来发展的免疫分析新技术被广泛应用于超微量蛋白标志物分析。该文就 AD 早期外周血生物标志物的研究进展及其分析方法进行了综述。

[关键词] 阿尔茨海默病; 早期诊断; 血液生物标志物; 免疫分析方法; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2024.08.017 **中图分类号:**R749.16

文章编号:1009-5519(2024)08-1337-07

文献标识码:A

Current advances in early peripheral blood biomarkers and their analysis methods for Alzheimer's disease*

QI Yan, ZHANG Zhenhao, LIU Yu, LIU Xinmeng, CHEN Nana, LAO Kejing[△]
(Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medicine University, Xi'an, Shaanxi 710000, China)

[Abstract] Alzheimer's disease(AD) is a neurodegenerative disease with a hidden onset and complex pathology. The clinical diagnosis of AD has probably developed to the middle or late stage. The relative protein biomarkers in the cerebrospinal fluid can pass through the blood-brain barrier and participate the peripheral circulation in the very early stage of AD. Peripheral blood biomarker detection has the characteristics of convenient collection and minimal trauma, and is expected to become the most promising early screening and follow-up method. However, the traditional immunoassay methods cannot meet the demand for the accurate quantitative analysis of ultra-trace protein biomarkers in peripheral blood. In recent years, the newly developed immunoassay techniques in recent years have been widely applied in the analysis of ultra trace protein biomarkers. The paper reviews the recent research progress and analysis methods of early peripheral blood biomarkers of AD.

[Key words] Alzheimer's disease; Early detection; Blood-derived biomarkers; Immunoassay; Review

阿尔茨海默病(AD)是一种起病隐匿、病理复杂的神经退行性疾病,临床特征包括不可逆脑损伤、认知障碍、日常生活自理能力下降,最终可发展为痴呆和死亡。据统计,AD 已发展为最常见的痴呆和世界范围内老年人残疾增加的主要原因^[1]。目前,AD 临床诊断主要依靠影像学技术结合认知测试^[2-3],通常确诊时已发展到中晚期。虽然 AD 尚无有效的治疗方法,但早期诊断和干预仍有利于减少神经损伤,延缓病情进展,从而提高患者的生活质量。

AD 患者的病理学特征主要为 β 淀粉样蛋白(A β)在大脑中细胞外沉积形成老年斑, Tau 蛋白的过度磷酸化造成脑神经细胞内的神经元纤维缠结^[4-5]。

在 AD 极早期,脑脊液(CSF)中某些蛋白标志物 A β 40、A β 42、总 Tau 蛋白(T-tau)、过度磷酸化 Tau 蛋白(P-tau)等水平会发生改变^[6]。然而,临床上为了实现 CSF 中标志物的检测,常需要通过腰椎穿刺获取 CSF。但该方式为有创操作,对患者伤害较大,且价格昂贵,患者可接受度有限,不利于 AD 的早期诊断。MONTAGNE 等^[7]研究发现,AD 患者血脑屏障存在损伤,导致 CSF 中某些蛋白标志物能够在疾病早期穿越血脑屏障,进入外周血循环,从而使得血液蛋白标志物水平在发病极早期就发生很明显变化。因此,外周血中 AD 蛋白标志物的无创检测技术因样本采集方便、创伤小,成为最具潜力的早期筛查和随诊手段。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(22104122);陕西省教育厅专项科研计划资助项目(21JK0895);陕西省卫生健康科研基金资助项目(2021D046);陕西省自然科学基金基础研究计划资助项目(2023-JC-QN-0137);陕西省科学技术协会青年人才托举计划资助项目(20220610)。

[△] 通信作者, E-mail: laokejing@126.com。

为 AD 早期诊断带来了新希望^[8]。然而 AD 蛋白标志物在外周血中水平极低,传统免疫分析方法无法实现其水平的精准定量分析。近年来发展的一些免疫分析新技术,其灵敏度大大提高,被广泛应用于超微量蛋白标志物的分析^[9-11]。本文对 AD 早期外周血生物标志物及其检测技术的研究进展进行了综述。

1 外周血中 AD 相关生物标志物

1.1 A β A β 由淀粉样前体蛋白经过 β -分泌酶和 γ -分泌酶连续裂解形成,最常见的是包含 40 个氨基酸的 A β 40 与 42 个氨基酸的 A β 42^[12]。在健康人脑组织中,A β 的生成与清除处于动态平衡状态;在 AD 患者脑组织中,A β 表达水平过量,清除作用减弱,导致其在细胞膜外逐渐沉积形成老年斑,对神经元产生毒性作用,使得神经元变性,最终导致 AD 的发生^[4,12]。

最初的研究结果显示,AD 组和对照组血液 A β 42 水平无显著差异,提示血液 A β 42 水平主要反映外周的情况,而非脑中的 A β 水平。在最近几项研究中,研究者将免疫沉淀反应质谱分析^[13-14]及 Elecsys 免疫分析^[15]等高灵敏度分析技术用于血液中 A β 的检测,由于这些检测平台具有更高的精度,并且可以在同一时间内测定同一样品中 A β 42 和 A β 40 水平,使得血液 A β 42/A β 40 比值在临床上展示出广阔的应用前景。如使用免疫沉淀质谱测定血液中 A β 水平,可以准确预测基于正电子发射体层摄影(PET)成像的轻度认知障碍(MCI)和 AD 患者脑淀粉样蛋白状态^[14]。淀粉样 PET 阴性但血液 A β 42/A β 40 比值异常的患者,在未来有很大风险会发展为 PET 阳性,说明血液 A β 42/A β 40 比值可用于预测和筛选淀粉样 PET 阳性个体及 AD 的早期初步筛查^[13]。此外,基于 Elecsys 免疫分析测定血液中 A β 水平的研究同样表明,在 AD 发展的各阶段,血液 A β 42/A β 40 水平在预测 A β 状态时表现出较高的准确性^[15]。以上研究结果均表明,血液 A β 在预测患者脑淀粉样蛋白状态及 AD 早期诊断方面具有广阔的应用前景。

1.2 Tau 蛋白及 P-tau Tau 蛋白是一种微管相关蛋白,通过与微管蛋白相互作用来维系神经元骨架系统的稳定^[5]。AD 发病机制的另一主流假说是,Tau 蛋白的过度磷酸化造成的脑神经细胞内神经元纤维缠结(NFTs)。研究表明,AD 患者脑神经细胞内 NFTs 的大量形成会导致神经元退化,从而释放 Tau 蛋白,使得 CSF 中 Tau 水平增加,其水平与 MCI 向 AD 的发展密切相关^[16]。

相比 CSF 中 Tau 蛋白水平,穿越血脑屏障进入血液中的 Tau 水平非常低,由于检测手段受限及大量队列研究的缺乏,在早期研究中,有关血液 Tau 蛋白水平作为 AD 诊断标志物的报道较少见。近年来,由于检测技术的快速发展,研究者将单分子阵列(Simoa)和基于电化学发光技术的 MSD 检测系统用于 AD 患者血液中 P-tau181、P-tau231 和 P-tau217 的分析^[17-21],使得血液 P-tau 蛋白水平作为 AD 早期诊断

标志物的研究成为热点方向。一项研究表明,患者在临床上被诊断为 AD 前,血液 P-tau181 水平就开始升高,在 MCI 和痴呆期进一步升高,且血液 P-tau181 水平与 CSF P-tau181 水平及 Tau PET 呈正相关^[17]。有研究表明,至少在患者死亡前 8 年,血液 P-tau181 就能准确预测 AD 的病理特征^[19]。研究表明,AD 患者血液 P-tau181 水平较对照组升高 3.5 倍左右,且可以有效地将 AD 与其他神经退行性疾病(如额颞叶痴呆病区)分开^[18]。一项针对 3 个选定的队列共 1 402 例患者的研究发现,与其他血液标志物和核磁共振成像相比,P-tau217 水平可以更好地将 AD 和其他神经退行性疾病区分开,其准确性与 PET 成像结果无显著差异^[20]。在该项研究中,队列 3 为 PSEN1 突变携带者,研究发现在不溶性 Tau 聚集物未被 Tau-PET 检测到即 AD 极早期时,血液 P-tau217 水平已经在 AD 患者中增加了大约 7 倍,甚至在认知障碍出现前 20 年,P-tau217 水平就开始上升。最近的一项研究表明,血液 P-tau231 和 P-tau217 水平与 AD 患者脑中早期 A β 沉积最为相关,可以作为临床前 AD 患者 A β 病理学状态的生物标志物,其能够在患者大脑出现明显 A β 斑块前,更好地捕捉大脑 A β 的变化^[21]。以上研究结果表明,Tau 蛋白尤其是特定位点 P-tau 蛋白是具有广阔发展前景的 AD 早期诊断标志物。

1.3 神经丝轻链蛋白(NFL) NFL 是一种中间丝蛋白,主要表达于粗有髓轴突中,具有维持神经元结构稳定和调节轴突直径的作用。当轴突损伤时,NFL 将释放到细胞空间外,导致 CSF 中 NFL 水平增加^[22]。

在 AD 患者大脑中,神经元变性的发生会加速 NFL 向 CSF 和血液释放^[22]。研究发现,CSF 中 NFL 水平和血液中 NFL 水平相关,MCI 和具有 A β 病理特征的 AD 患者血液 NFL 水平均高于健康对照组,且 CSF 和血液中 NFL 水平升高与认知能力下降、脑萎缩及脑代谢减退有关^[23]。最近一项同时针对认知未受损(CU)、MCI 和 AD 患者的研究发现,MCI 和 AD 患者 CSF 和血液 NFL 水平均升高^[24]。但在具有 A β 病理特征的 CU 患者中,只有 CSF 中 NFL 水平增加,血液中 NFL 水平没有变化,且在 AD 转基因小鼠模型中,随着 A β 病理特征的发展,CSF 中 NFL 水平增加要先于血清。因此,对 CU 个体来说,与血液 NFL 相比,CSF 中 NFL 可能更适合作为生物标志物进行早期诊断。此外,一项足够数量的队列研究结果表明,虽然 AD 患者血液和 CSF 中 NFL 水平增加,但其增加的特异性并不高,NFL 水平在很多其他神经退行性疾病的血液和 CSF 中同样会升高,尤其是额颞叶痴呆、肌萎缩性侧索硬化症和非典型帕金森病^[25]。

总之,CSF 和血液中 NFL 水平升高与 AD 的发展密切相关,NFL 虽然不是 AD 特异性的生物标志物,但仍然可能在 AD 早期筛查、预测病情发展及药物试验预后监测中起到不可替代的作用。

1.4 外泌体 外泌体是一种长径在 100 nm 左右的

细胞外囊泡,其中携带大量特异性蛋白、脂质、RNA、microRNAs、DNA 等其他生物活性物质。在大脑中,外泌体可以来自包括神经元、小胶质细胞和星形胶质细胞在内的所有细胞,在细胞通信及细胞功能调节中发挥关键作用,外泌体可以通过 CSF 广泛传播至整个大脑,且可以通过血脑屏障释放到外周血中^[26]。

研究表明,外周血中神经元和星形胶质细胞来源的外泌体可以作为生物标志物反映 AD 患者的病理特征,并可用于 AD 早期诊断^[27]。此外,神经源性外泌体中的多种特异性蛋白同样可以作为生物标志物反映 AD 的发展过程。SARDAR SINHA 等^[28]发现,AD 患者大脑分泌的外泌体中 A β 寡聚体水平明显增加,且通过阻断脑源性外泌体的形成、分泌或摄取,减少 A β 寡聚体的扩散并降低其毒性。有研究团队发现,AD 患者血液中神经源性外泌体内 p-S396-tau、p-T181-tau 及 A β 42 水平均明显升高,其水平不仅可以在患者出现症状 10 年前预测 AD 的发生,还可以准确预测患者从 MCI 发展为 AD 的过程^[29-30]。最近,一项针对外周血中神经源外泌体 A β 42、T-tau、P-tau181 的研究发现,外周血神经源性外泌体中 A β 42、T-tau 和 P-tau181 水平均可以反映 AD 患者大脑的病理变化,AD 患者 A β 42、T-tau 和 P-tau181 水平均明显高于 MCI 患者和对照组患者,且外泌体中 3 种蛋白水平与其在 CSF 中的水平高度相关,二者表现出相同的诊断能力^[30-31]。该团队的另一项研究发现,通过联合检测血液外泌体中突触生长相关蛋白 43、神经粒素、突触小体相关蛋白 25 和 synaptotagmin 1 水平^[32],可以在患者产生认知障碍 5~7 年前预测 AD 的发生。

1.5 其他生物标志物 除上述几大类主要生物标志物外,其他标志物如胶质细胞炎症反应标志物^[33-38],氧化应激(OS)生物标志物^[39-42],血液中 microRNA^[43-47] 等同样有望作为新型生物标志物进行 AD 早期诊断。

神经炎症在 AD 早期发病机制中起重要作用^[48-49]。研究表明,小胶质细胞表达的 II 型髓系细胞触发受体 (TREM2),与 AD 患者小胶质细胞激活和先天性免疫反应有关,可以作为 AD 早期谱系神经炎症的潜在标志物^[34]。在 AD 早期,CSF 中可溶性水解产物 TREM2(sTREM2)水平升高。另一项研究表明,CSF 中 sTREM2 水平与神经元变性和 Tau 病理学标志物相关,在 T-tau 阳性个体及具有 AD 病理学特征的 T-tau 阴性个体 CSF 中,sTREM2 水平随时间增加^[35]。此外,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)同样与 AD 的发生密切相关。研究表明,血液 MCP-1 水平在 AD 早期与神经解剖学具有相关性,较高的 MCP-1 水平与较差的情景记忆力有关^[36]。CSF 中 MCP-1 水平升高可能会加剧 AD 早期的病理进程^[37],MCP-1 水平高的 AD 患者认知能力下降更快。在 MCI 队列中,联合检测 CSF 中 MCP-1、Tau、P-tau、A β 可以用来预测 MCI 发展为 AD 的可能性。除此之外,其他多项研究表明,CSF 中白细胞介素(IL)-1 α 、IL-6、肿瘤坏死因子

α 、C-反应蛋白^[33,38] 等炎性细胞因子均有可能作为潜在生物标志物预测 AD 的发生。

过度 OS 产生的自由基,尤其是活性氧(ROS)的过度积累会损坏细胞核、线粒体、蛋白质和核酸等,从而损伤细胞^[50]。在 AD 早期,A β 沉积及 Tau 蛋白过度磷酸化造成的神经原纤维缠结会导致过度 OS 反应,激活 AD 相关信号通路^[51],损伤中枢神经,加速 AD 的进程^[52]。常见的 OS 标志物有同型半胱氨酸(Hcy)^[39]、NADPH 氧化酶^[42]、8-羟基脱氧鸟苷^[40-41] 等。Hcy 水平的升高会导致线粒体内 ROS 增加。有研究发现,在平均随访 9.5 年的 7 274 例受试者中,最终发展为 AD 与未发展为 AD 的个体相比,Hcy 水平显著升高,较高的 Hcy 水平会增加老年人患 AD 的风险^[39]。NADPH 氧化酶是 ROS 的主要来源。有研究表明,NADPH 氧化酶与个体认知状态之间存在很强的相关性,酶活性增加会导致认知下降,与健康人相比,MCI 队列中 NADPH 氧化酶的活性增加,并在 AD 队列中保持升高^[42]。

microRNA 是一类内源性、非蛋白编码的微小 RNA,其通过与靶标信使 RNA 结合,导致信使 RNA 降解或抑制信使 RNA 的翻译,从而调控基因的表达^[53]。大量研究表明,miRNA 的异常表达与 AD 的发生密切相关。如 AD 患者血清 miR-29c-3p、miR-19b-3p^[43]、miR-501-3p^[44]、miR-223^[45] 水平下调,miR-455-3p^[46]、miR-519^[45] 水平上调。此外,有研究表明,血浆 miR-411^[47] 水平随着 AD 的发展明显升高,其可以有效区分 MCI 与轻度、中度和重度 AD 患者。

2 AD 蛋白标志物的高灵敏度分析技术

在 AD 早期,只有少量蛋白标志物能够从 CSF 穿越血脑屏障进入外周循环,其在血液中丰度极低(fM 级),传统免疫分析方法无法实现精准定量分析^[54-55]。因此,如何在 AD 发病早期,实现血液中超微量蛋白标志物的精准定量分析,是目前利用血液蛋白标志物进行 AD 无创早期诊断面临的关键挑战。近年来发展的一些蛋白标志物分析新技术,其灵敏度大大提高,被广泛应用于神经疾病研究领域。

2.1 单分子免疫技术 Quanterix 公司基于单分子免疫阵列技术的 Single-Molecule Arrays(Simoa)系统是最具有代表性的超灵敏蛋白检测方法^[56],其主要原理是以每个微珠为独立的反应单元,依据泊松分布,在每个微珠表面负载一个或零个免疫复合物,将微珠分散装载到飞升级别的微孔阵列中,每个微孔只能容纳一个微珠,含有酶标记免疫复合物的微孔会发生单分子引发的酶促反应,产生局部高浓度的荧光产物,统计具有荧光信号的阳性微孔个数,即可实现数字式高灵敏度蛋白分子的定量分析^[9]。

与基于检测整个反应体系输出的模拟信号的传统酶联免疫吸附试验(ELISA)检测模式相比,数字式 ELISA 检测模式克服了传统模式在靶标蛋白水平很低时,检测信号被大量扩散和稀释,检测信号无法被

有效辨识、方法灵敏度受到显著限制的缺点^[57]。即使待测样本中靶标蛋白水平极低,只要蛋白分子被微孔捕获并引发单分子酶促反应,阳性荧光微孔就可被识别统计。Simoa 技术可以实现低水平蛋白标志物的灵敏准确分析,其灵敏度比传统 ELISA 提升了 1 000 倍以上,且结果更加准确。因此该系统常被用于超微量蛋白标志物的准确灵敏检测,尤其是神经系统疾病血液标志物的分析^[58]。

此外,基于单分子检测技术(SMC)的 Erenna 单分子免疫检测平台在检测低丰度蛋白标志物时也体现出广阔的应用前景^[59-60]。SMC 技术基于传统的三明治夹心免疫分析方法,在磁珠表面形成免疫复合物,经过洗脱步骤,将荧光标记的检测抗体洗脱下来。激光的聚焦效应会形成一个非常狭小的检测空间“爱里斑”。这个空间集中了多达 84% 的激光能量,当洗脱下来的荧光标记的检测抗体通过高能量“爱里斑”时,超过阈值的荧光信号被共聚焦成像系统统计为阳性信号,通过计数阳性信号,可以实现靶标蛋白的数字式高灵敏度分析。该技术融合了独特的洗脱步骤和可靠的数字计数,与传统免疫检测技术相比,信噪比有了显著的改善,大大提高了检测灵敏度,被广泛用于超微量蛋白标志物的灵敏检测。

2.2 Meso Scale Discovery (MSD) 基于电化学发光的 MSD 技术也被广泛用于超高灵敏度蛋白标志物分析^[61]。该技术的主要原理如下:在石墨电极微孔板里包被捕获抗体,加入靶标蛋白和钉复合物标记的检测抗体,形成免疫复合物,钉复合物能够在氧化电极上产生电化学信号,从而实现靶标蛋白的定量分析^[10]。该技术的样本用量只需 25 μL ,不仅可以实现低至 0.05 pg/mL 检测限的高灵敏度蛋白分析,还可以通过点阵技术,在石墨电极板里实现每孔同时检测 10 个指标、4 个数量级的宽动态检测范围^[62]。因此,MSD 技术常用于检测血液中的微量蛋白质生物标志物^[63]。

2.3 免疫沉淀联合质谱分析技术(IP-MS) IP-MS 在分析外周血 AD 生物标志物中表现出广阔的应用前景^[13-14]。该方法首先通过免疫沉淀技术,利用抗体的特异性亲和力,从丰富的血浆蛋白中分离和富集靶标蛋白及内标蛋白,然后利用质谱仪检测靶标蛋白水平,对质谱结果的内标蛋白信号进行归一化处理,最终换算得到靶标蛋白水平。如在 SCHINDLER 等^[13] 研究中,利用 IP-MS 实现了血浆 $\text{A}\beta$ 的高灵敏度分析,其具体原理如下:来源于人体内的天然 $\text{A}\beta$ 含有 ^{14}N 同位素标记的氨基酸,将一定浓度 ^{15}N 标记的内标 $\text{A}\beta$ 加入待测血浆中,利用免疫沉淀分离富集靶标蛋白 $\text{A}\beta$,然后利用质谱仪检测靶标蛋白 $\text{A}\beta$,得到 $\text{A}\beta$ 同工型($\text{A}\beta_{38}$ 、 $\text{A}\beta_{40}$ 和 $\text{A}\beta_{42}$)的每个同位素(^{14}N 和 ^{15}N)的质谱图,对所选靶标蛋白的离子峰面积进行求和。 $\text{A}\beta_{42}$ 水平计算公式为: ^{14}N 同位素标记的 $\text{A}\beta_{42}$ 离子峰面积总和除以 ^{15}N 同位素标记的 $\text{A}\beta_{42}$

离子峰面积总和乘以 ^{15}N 标记的内标 $\text{A}\beta_{42}$ 水平,用同样的方法计算 $\text{A}\beta_{40}$ 水平。最终得到的 $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ 比值可用于脑淀粉样变性的预测。

3 小 结

本文探讨了一系列存在于外周血中的 AD 早期标志物及其高灵敏度分析方法。在众多生物标志物中,研究最广泛且最有可能成为未来 AD 早期诊断发展方向的标志物有 $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ 、特定位点 P-tau 蛋白(P-tau181、P-tau217、P-tau231)及 NFL。其中, $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ 可以很好地反映大脑中淀粉样蛋白状态,特定位点 P-tau 蛋白在区分 AD 和其他神经退行性疾病上具有独特的优势,NFL 在预测病情发展及药物试验预后监测中具有很好的诊断效果。此外,近年来超灵敏蛋白分析技术的快速发展,使得外周血中多种极低含量生物标志物的准确联合检测成为可能,这对于实现 AD 早期诊断具有非常重要的临床意义。

虽然有关 AD 患者外周血中生物标志物的研究已经取得了一系列成果,但仍存在一些亟须解决的问题:(1)由于样本数量受限,部分研究中生物标志物的准确性还未被广泛充分验证,仍需要扩大样本量继续进行研究验证;(2)部分研究时间不够,需要继续密切关注患者疾病发展情况,进行多年纵向研究;(3)需要更多的研究来确定如何最优地结合多种生物标志物进行综合分析,如 $\text{A}\beta_{42}/\text{A}\beta_{40}$ 、P-tau、NFL 及其他生物标志物或结合个体突变基因、认知测试进行系统分析;(4)每个实验室所使用的血液样本处理操作程序和标志物检测手段不同,需要统一操作程序和检测方法,提高研究结果的重复性和可靠性。

外周血中 AD 相关生物标志物研究正在朝着临床应用发展,但明确 AD 不同发展阶段、各个生物标志物的临床诊断临界值,并应用于 AD 早期诊断仍有很长一段路要走。相信随着 AD 生物标志物研究的更加深入及检测技术和评估方案的进一步提升,AD 血液生物标志物在 AD 早期诊断和干预、抗 AD 药物研发、预后等方面将体现出广阔的应用前景。

参考文献

- [1] PATTERSON C. World Alzheimer report, 2018 [EB/OL]. (2019-02-01)[2023-10-11]. [https://www.alz.co.uk/research/World Alzheimer Report](https://www.alz.co.uk/research/World%20AlzheimerReport).
- [2] LEUZY A, CHIOTIS K, LEMOINE L, et al. Tau PET imaging in neurodegenerative tauopathies-still a challenge [J]. *Mol Psychiatry*, 2019, 24(8):1112-1134.
- [3] RABINOVICI G D, GATSONIS C, APGAR C, et al. Association of amyloid positron emission tomography with subsequent change in clinical management among Medicare beneficiaries with mild cognitive impairment or dementia [J]. *JA-*

- MA, 2019, 321(13):1286-1294.
- [4] DUYCKAERTS C, DELATOUR B, POTIER M C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(1):5-36.
- [5] WEGMANN S, BIERNAT J, MANDELKOW E. A current view on Tau protein phosphorylation in Alzheimer's disease[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2021, 69:131-138.
- [6] MOLINUEVO J L, BLENNOW K, DUBOIS B, et al. The clinical use of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: A consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative [J]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(6):808-817.
- [7] MONTAGNE A, BARNES S R, SWEENEY M D, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus[J]. *Neuron*, 2015, 85(2):296-302.
- [8] LEUZY A, CULLEN N C, MATTSSON-CARLGREN N, et al. Current advances in plasma and cerebrospinal fluid biomarkers in Alzheimer's disease[J]. *Curr Opin Neurol*, 2021, 34(2):266-274.
- [9] RISSIN D M, KAN C W, CAMPBELL T G, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations[J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(6):595-599.
- [10] GUGLIELMO-VIRET V, THULLIER P. Comparison of an electrochemiluminescence assay in plate format over a colorimetric ELISA, for the detection of ricin B chain(RCA-B) [J]. *J Immunol Methods*, 2007, 328(1/2):70-78.
- [11] GILBERT M, LIVINGSTON R, FELBERG J, et al. Multiplex single molecule counting technology used to generate interleukin 4, interleukin 6, and interleukin 10 reference limits[J]. *Anal Biochem*, 2016, 503:11-20.
- [12] FINDER V H, GLOCKSHUBER R. Amyloid-beta aggregation[J]. *Neurodegener Dis*, 2007, 4(1):13-27.
- [13] SCHINDLER S E, BOLLINGER J G, OVOD V, et al. High-precision plasma β -amyloid 42/40 predicts current and future brain amyloidosis[J]. *Neurology*, 2019, 93(17):e1647-e1659.
- [14] NAKAMURA A, KANEKO N, VILLEMAGNE V L, et al. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2018, 554(7691):249-254.
- [15] PALMQVIST S, JANELIDZE S, STOMRUD E, et al. Performance of fully automated plasma assays as screening tests for Alzheimer Disease-Related β -Amyloid status[J]. *JAMA Neurol*, 2019, 76(9):1060-1069.
- [16] BLOM E S, GIEDRAITIS V, ZETTERBERG H, et al. Rapid progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease in subjects with elevated levels of tau in cerebrospinal fluid and the APOE epsilon4/epsilon4 genotype [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2009, 27(5):458-464.
- [17] JANELIDZE S, MATTSSON N, PALMQVIST S, et al. Plasma p-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia[J]. *Nat Med*, 2020, 26(3):379-386.
- [18] THIJSEN E H, LA JOIE R, WOLF A, et al. Diagnostic value of plasma phosphorylated tau181 in Alzheimer's disease and frontotemporal lobar degeneration[J]. *Nat Med*, 2020, 26(3):387-397.
- [19] LANTERO RODRIGUEZ J, KARIKARI T K, SU? REZ-CALVET M, et al. Plasma p-tau181 accurately predicts Alzheimer's disease pathology at least 8 years prior to post-mortem and improves the clinical characterisation of cognitive decline [J]. *Acta Neuropathol*, 2020, 140(3):267-278.
- [20] PALMQVIST S, JANELIDZE S, QUIROZ Y T, et al. Discriminative accuracy of plasma phospho-tau217 for Alzheimer disease vs other neurodegenerative disorders[J]. *JAMA*, 2020, 324(8):772-781.
- [21] MILÁ-ALOMÁ M, ASHTON N J, SHEKARI M, et al. Plasma p-tau231 and p-tau217 as state markers of amyloid- β pathology in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Nat Med*, 2022, 28(9):1797-1801.
- [22] FYFE I. Neurofilament light chain - new potential for prediction and prognosis[J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(10):557-557.
- [23] MATTSSON N, ANDREASSON U, ZETTERBERG H, et al. Association of plasma neurofilament light with neurodegeneration in patients with Alzheimer disease [J]. *JAMA Neurol*, 2017, 74(5):557-566.
- [24] ANDERSSON E, JANELIDZE S, LAMPINEN B, et al. Blood and cerebrospinal fluid neurofila-

- ment light differentially detect neurodegeneration in early Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Aging*, 2020, 95:143-153.
- [25] FORGRAVE L M, MA M, BEST J R, et al. The diagnostic performance of neurofilament light chain in CSF and blood for Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Alzheimer's Dementia*, 2019, 11:730-743.
- [26] ZHUANG X, XIANG X, GRIZZLE W, et al. Corrigendum: treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain[J]. *Mol Ther*, 2012, 20(1):1769-1779.
- [27] YIN Q Q, JI X J, LV R J, et al. Targetting exosomes as a new biomarker and therapeutic approach for alzheimer's disease[J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 15:195-205.
- [28] SARDAR SINHA M, ANSELL-SCHULTZ A, CIVITELLI L, et al. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers[J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 136(1):41-56.
- [29] WINSTON C N, GOETZL E J, AKERS J C, et al. Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile[J]. *Alzheimers Dement*, 2016, 3:63-72.
- [30] FIANDACA M S, KAPOGIANNIS D, MAPSTONE M, et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(6):600-7. e1.
- [31] JIA L F, QIU Q Q, ZHANG H, et al. Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid[J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15(8):1071-1080.
- [32] JIA L F, ZHU M, KONG C J, et al. Blood neuro-exosomal synaptic proteins predict Alzheimer's disease at the asymptomatic stage[J]. *Alzheimers Dement*, 2021, 17(1):49-60.
- [33] DARWEESH S K L, WOLTERS F J, IKRAM M A, et al. Inflammatory markers and the risk of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis[J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(11):1450-1459.
- [34] SUÁREZ-CALVET M, KLEINBERGER G, ARAQUE CABALLERO M Á, et al. sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers[J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(5):466-476.
- [35] RAUCHMANN B S, SCHNEIDER-AXMANN T, ALEXOPOULOS P, et al. CSF soluble TREM2 as a measure of immune response along the Alzheimer's disease continuum[J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 74:182-190.
- [36] BETTCHER B M, NEUHAUS J, WYNN M J, et al. Increases in a pro-inflammatory chemokine, MCP-1, are related to decreases in memory over time[J]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11:25.
- [37] GINSBERG S D, WESTIN K, BUCHHAVE P, et al. CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1):e30525.
- [38] CULJAK M, PERKOVIC M N, UZUN S, et al. The association between TNF-alpha, IL-1 alpha and IL-10 with Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2020, 17(11):972-984.
- [39] ZUIN M, CERVELLATI C, BROMBO G, et al. Elevated blood homocysteine and risk of Alzheimer's dementia: An updated systematic review and meta-analysis based on prospective studies[J]. *J Prev Alzheimers Dis*, 2021, 8(3):329-334.
- [40] NUNOMURA A, PERRY G. RNA and oxidative stress in Alzheimer's disease: Focus on microRNAs[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:2638130.
- [41] VALAVANIDIS A, VLACHOGIANNI T, FIOTAKIS C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis[J]. *J Environm Sci Health*, 2009, 27(2):120-139.
- [42] ANSARI M A, SCHEFF S W. NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1):171-178.
- [43] WU Y Q, XU J, XU J, et al. Lower serum levels of miR-29c-3p and miR-19b-3p as biomarkers for Alzheimer's disease [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2017, 242(2):129-136.
- [44] HARA N, KIKUCHI M, MIYASHITA A, et

- al. Serum microRNA miR-501-3p as a potential biomarker related to the progression of Alzheimer's disease[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2017, 5(1):10.
- [45] JIA L H, LIU Y N. Downregulated serum miR-223 serves as biomarker in Alzheimer's disease[J]. *Cell Biochem Funct*, 2016, 34(4):233-237.
- [46] KUMAR S, REDDY P H. MicroRNA-455-3p as a potential biomarker for Alzheimer's disease: An update[J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10:41.
- [47] ZIRNHELD A L, SHETTY V, CHERTKOW H, et al. Distinguishing mild cognitive impairment from Alzheimer's disease by increased expression of key circulating microRNAs[J]. *Curr Neurobiol*, 2016, 7(2):38-50.
- [48] BETTCHER B M, KRAMER J H. Longitudinal inflammation, cognitive decline, and Alzheimer's disease: A mini-review[J]. *Clin Pharmacol Thera*, 2014, 96(4):464-469.
- [49] OTT B R, JONES R N, DAIELLO L A, et al. Blood-Cerebrospinal fluid barrier gradients in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: relationship to inflammatory cytokines and chemokines [J]. *Front Aging Neurosci*, 2018, 10:245.
- [50] 刘军. 氧化应激在阿尔茨海默病病理发生中的作用机制与干预策略[J]. *中山大学学报*, 2020, 41(5):661-668.
- [51] 张立敏, 顾超, 安红梅. 氧化应激介导的细胞凋亡在阿尔茨海默病中的作用[J]. *医学综述*, 2021, 27(9):1685-1690.
- [52] 张泓娇, 杨玉超, 张晓琳. 阿尔茨海默病患者认知功能损害与氧化应激的关系分析[J]. *中国实用乡村医生杂志*, 2022, 29(9):70-73.
- [53] BARTEL D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2):215-233.
- [54] COHEN L, R. WALT D. Highly sensitive and multiplexed protein measurements [J]. *Chem Rev*, 2018, 119(1):293-321.
- [55] SHEN J W, LI Y B, GU H S, et al. Recent development of sandwich assay based on the nanobiotechnologies for proteins, nucleic acids, small molecules, and ions[J]. *Chem Rev*, 2014, 114(15):7631-7677.
- [56] COHEN L, WALT D R. Single-molecule arrays for protein and nucleic acid analysis[J]. *Annu Rev Anal Chem(Palo Alto Calif)*, 2017, 10(1):345-363.
- [57] GOODING J J, GAUS K. Single-molecule sensors: challenges and opportunities for quantitative analysis[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(38):11354-11366.
- [58] LI D N, MIELKE M M. An update on blood-based markers of Alzheimer's disease using the SiMoA platform[J]. *Neurol Ther*, 2019, 8(2):73-82.
- [59] TODD J, FREESE B, LU A, et al. Ultrasensitive flow-based immunoassays using single-molecule counting [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(11):1990-1995.
- [60] BING R, HENDERSON J, HUNTER A, et al. Clinical determinants of plasma cardiac biomarkers in patients with stable chest pain [J]. *Heart*, 2019, 105(22):1748-1754.
- [61] BAKER J R, MAHDI M, NICOLAU D V J, et al. Early Th2 inflammation in the upper respiratory mucosa as a predictor of severe COVID-19 and modulation by early treatment with inhaled corticosteroids: A mechanistic analysis [J]. *Lancet Respir Med*, 2022, 10(6):545-556.
- [62] DABITAO D, MARGOLICK J B, LOPEZ J, et al. Multiplex measurement of proinflammatory cytokines in human serum: comparison of the Meso Scale Discovery electrochemiluminescence assay and the Cytometric Bead Array[J]. *J Immunol Methods*, 2011, 372(1/2):71-77.
- [63] MIELKE M M, HAGEN C E, XU J, et al. Plasma phospho-tau181 increases with Alzheimer's disease clinical severity and is associated with tau- and amyloid-positron emission tomography [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(8):989-997.

(收稿日期:2023-10-16 修回日期:2024-01-25)