

www.pibb.ac.cn



# 阿尔茨海默病体外诊断纳米技术\*

宋诗洁<sup>1,2)</sup> 朱 凌<sup>1)</sup> 王 琛<sup>1,2)\*\*</sup> 杨延莲1,2)\*\* (<sup>1)</sup> 国家纳米科学中心,北京 100190;<sup>2)</sup> 中国科学院大学中丹学院,北京 101400)

摘要 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种最常见的神经退行性疾病。AD的精准诊断技术,特别是早期诊断技术 是临床亟需的。近年来,以生物标志物为基础的非侵入性体外诊断技术发展迅速,特别是利用纳米材料和纳米技术的高表 面活性、独特的光电特性、生物相容性好、易于表面修饰、小型化、集成化等特点,发展了新型的AD体外检测和诊断的纳 米技术,大大提升了AD检测的灵敏度和准确性,并且具有简便快速等特点,在AD疾病的早期诊断、预后判断以及疗效评 估等方面发挥着重要的作用。本文综述了AD蛋白质类生物标志物检测纳米技术的研究进展,介绍了纳米材料在生物标志物 富集方面发挥的重要作用,阐述了以纳米材料为基础的光电信号转导技术以及增强检测信号和提高检测灵敏度的方法。除 此之外,还简要介绍了AD纳米检测技术在临床诊断、预后和疗效评估方面的应用前景,总结了AD体外诊断技术的优势及 面临的挑战,为AD精准诊疗研究提供参考信息。

关键词 阿尔茨海默病,生物标志物,纳米技术,体外诊断,生物传感器 中图分类号 R592, R74 DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0296

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是 一种最常见的神经退行性疾病。最新数据显示,目 前全球大约有包括AD患者在内的5000万痴呆患 者,预计到2050年,这一数字将达到1.52亿<sup>[1]</sup>。 在20世纪初,德国神经学家Alois Alzheimer首次 发现一种疾病,其主要特征是认知的进行性和不可 逆转的衰退<sup>[2]</sup>,这种疾病后来被命名为AD。该疾 病的主要病理特征表现为: a.β淀粉样蛋白 (amyloid beta peptide, Aß) 过度沉积形成老年 斑<sup>[3]</sup>; b. 过度磷酸化的 tau 蛋白聚集形成神经原纤 维缠结<sup>[4]</sup>。Aβ和tau蛋白的积累会导致大脑中与记 忆相关的突触和神经元的大规模损伤,进而造成严 重的记忆丧失和认知丧失。

AD从发生到出现临床症状耗时长达15~25 年<sup>[1]</sup>。美国国立衰老研究所(National Institute of Aging, NIA)和阿尔茨海默病协会(Alzheimer's Association, AA)提出的诊断标准认为, AD的发 展是一个连续进展的过程<sup>[5]</sup>。该诊断标准将AD的 进展分为3个阶段。a. 临床前期 (preclinical): 蛋 白质错误折叠、聚集并开始在大脑中的积累,神经 元的活性有所降低但是并没有出现临床症状; b. 轻

度认知障碍 (mild cognitive impairment, MCI): 与记忆形成相关的海马体功能受损并且出现脑萎缩 和认知损伤等症状: c. 痴呆 (dementia): 记忆力 严重损伤并伴随全身性损伤,患者日常生活不能 自理[6]。

目前, AD的临床诊断主要通过认知测试、影 像学检查以及脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF) 分析来实现<sup>[7]</sup>。认知测试往往会受到主观因素的 影响,因而诊断准确率不高。相比之下,影像学检 查是一种更直观的检查手段。AD诊断常用的医学 影像技术有用于海马体成像的磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 以及评估 Aβ 在大脑皮层沉积的正电子发射型计算机断层显像 (positron emission computed tomography, PET) 技

<sup>\*</sup>中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSW-SLH048),中 国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB36000000),国家自然 科学基金 (51861135103, 31971295, 21773042) 和中国科学院青 年创新促进会(2018048)资助项目。

<sup>\*\*</sup> 通讯联系人。

王琛 Tel: 010-82545561, E-mail: wangc@nanoctr.cn 杨延莲 Tel: 010-82545559, E-mail: yangyl@nanoctr.cn 收稿日期: 2021-09-30, 接受日期: 2021-12-08

术<sup>[89]</sup>。然而,这些影像学诊断方法价格昂贵,检测成本偏高。CSF分析则具有侵入性,给患者带来极大的痛苦。因此迫切地需要一种具有非侵入性、操作简单的低成本诊断方法。

目前发展的以血液为基础的体外诊断技术,在 AD早期诊断方面突显优势。近年来,质谱(mass spectrometry, MS)分析技术已经应用于AD生物 标志物的筛选<sup>[10]</sup>和检测<sup>[11]</sup>,成为以体液为基础的 AD早期诊断的有用工具<sup>[12]</sup>。为了获得小型化、便 携式的AD体外诊断工具,研究者们积极发展基于 纳米技术的AD生物标志物的检测平台。纳米材料 和纳米技术的高表面活性、独特的光电特性、生物 相容性好、易于表面修饰、小型化、集成化等特 点,使得研发具有更高灵敏度、选择性和稳定性的 AD体外诊断技术成为可能。本文分别从生物标志 物的富集、信号的转导与增强、灵敏度的提高以及 临床价值等方面介绍纳米技术在伏安/阻抗检测、 电导检测、表面等离激元共振检测、表面增强拉曼 散射检测以及电化学发光检测等AD传感检测平台 中的应用(图1)。



 Fig. 1
 Schematic illustration of sensing platform for detection of AD biomarkers

 图1
 用于检测AD生物标记物的传感平台示意图

# 1 生物标志物

蛋白质错误折叠、聚集以及积累是AD等神经 退行性病的主要病理特征<sup>[13-15]</sup>。尽管这些蛋白质的 序列、结构、大小以及功能各异,但在患者的大脑 中都经历了由单体聚集形成小的寡聚体,再到大的 原纤维、纤维的过程<sup>[16]</sup>(图2)。起初,研究者们 认为在大脑中大量沉积的蛋白质具有神经毒性,但 有越来越多的证据表明,由蛋白质错误折叠产生的 可溶性寡聚体才是造成神经毒性的关键因素<sup>[17-19]</sup>。 错误折叠的聚集体小到二聚体,大到由数百个单体 组成的原纤维<sup>[20-21]</sup>,这些异常变化的蛋白质聚集体



 Fig. 2 Amyloidogenic proteins aggregate via multiple pathways into different assembly structures<sup>[16]</sup>
 图2 淀粉样蛋白通过多种途径聚集成不同的组装结构<sup>[16]</sup>

逐渐被作为生物标志物应用于AD的早期诊断。

Aβ是一类最重要的早期诊断生物标志物。在 正常人体内, 淀粉样蛋白前体 (amyloid precursor protein, APP) 被α和γ蛋白酶切割, 产生不具有 神经毒性的多肽片段。在AD患者体内, APP 在 $\beta$ 和γ蛋白酶的作用下分解成具有39~43个氨基酸的 多肽,其中Aβ42和Aβ40这两个片段与AD疾病的 发生发展密切相关<sup>[2, 22]</sup>。大量 Aβ聚集形成的寡聚 体会产生神经毒性,导致大脑内的神经元和突触受 损,从而影响患者的记忆和认知<sup>[23]</sup>。最近,有观 点认为在众多AB聚集体中,AB二聚体是最主要的 毒性蛋白形式<sup>[24]</sup>,这可能开启AD研究的新阶段。 近年来,纳米技术的发展使得 AD 患者 CSF 中 Aβ 的微量变化能够被获取<sup>[25]</sup>,因此逐渐发展了众多 基于CSF中Aβ检测的早期诊断技术。CSF分析成 本高,取样困难,给患者带来极大的痛苦。2018 年,Nakamura等<sup>[26]</sup>提出血浆Aβ与CSF中Aβ浓度 存在相关性,并且检测结果与PET的诊断结果吻 合度达到90%,这意味着血液检测有望成为替代 CSF 分析的新方法。随后,逐渐发展了以血液标志 物为基础的检测技术。

tau蛋白是一种结合在微管上的蛋白质,其正常功能是维持微管的稳定性,降低微管蛋白分子的解离。从微管上脱落的tau蛋白在脑部聚集,形成的神经纤维缠结被认为是AD病理特征之一<sup>[27]</sup>。 有研究者还发现,AD患者脑部tau蛋白会出现过 度磷酸化的现象<sup>[28-29]</sup>,过度磷酸化会导致 tau 正常 生物活性的丧失,引起微管解体和轴突运输功能的 破坏<sup>[30]</sup>。另外,Aβ能够加速 tau 蛋白的过度磷酸 化<sup>[31]</sup>以及配对螺旋样纤维(paired helical fibers, PHF)<sup>[32]</sup>的形成,并且能够促进 tau 蛋白的聚集和 扩散<sup>[33-34]</sup>。

tau蛋白中有 85个潜在的磷酸化位点,在AD 大脑内检测出了约45个特异磷酸化位点<sup>[35]</sup>,其中 CSF 中 p-tau181 (phosphorylated tau181)<sup>[36]</sup> 以及 p-tau217 (phosphorylated tau217)<sup>[37]</sup> 被认为与 AD 病理相关。近期,研究者比较了 p-tau217 与 p-tau181作为 AD 生物标志物的有效性,PET 结果 显示 p-tau217能够更准确地区分 AD 和其他神经退 行性疾病<sup>[38]</sup>。越来越多的结果证明<sup>[39-41]</sup>,血浆中 磷酸化的 tau,尤其是 p-tau217,与 AD 疾病进展密 切相关。

目前已报道了许多新型的AD早期检测生物标 志物<sup>[42]</sup>,除了有构成神经元细胞骨架的神经丝蛋 白L (neurofilament light, NFL)<sup>[43]</sup>、与tau mRNA 代谢相关的交互反应 DNA 结合蛋白 43 (transactive response DNA binding protein 43, TDP-43)<sup>[44]</sup>、影响 Aβ 生成的去整合素金属蛋白酶 10 metalloprotease (a disintegrin and 10, ADAM10)<sup>[45]</sup>,还有与炎症和神经元损伤相关的髓 系细胞触发受体2(triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)<sup>[46]</sup>、人几丁质酶3样蛋 白-1 (chitinase 3-like 1 protein CHI3L1)<sup>[47]</sup> 以及视 锥蛋白样蛋白1 (visinin-like protein 1, VLP-1)<sup>[48]</sup> 等。国际工作组(International Working Group, IWG) 仅将 A β 和 tau 蛋白纳入诊断标准之中, 目前 关于AD早期诊断的研究也主要集中于Aβ、tau蛋 白以及与之相关的蛋白质。最新的AD诊断标准<sup>[1]</sup> 认为,只有临床表型阳性以及Aβ和tau蛋白生物标 志物同时表现为阳性才可以确诊为AD,因此未来 多靶点检测的方法将成为AD早期检测的重要手 段。由于生物标志物阳性患者的异质性特点,目前 依然无法给出一个确定的阳性判断值,这进一步限 制了生物标志物检测方法在临床上的应用。

# 2 纳米技术在AD体外诊断中的应用

以纳米技术为基础的AD体外诊断技术是目前 较为先进的检测技术。纳米技术不仅能够实现低浓 度生物标志物的富集,还能够将生物反应转化为光 电信号并且将这些信号进一步放大,因此利用纳米 材料或者纳米技术构建的纳米生物传感器平台能够 在常规检测技术无法检测的浓度范围内定量分析 CSF和血液中AD相关的生物标志物。

尽早地识别AD有利于后续的治疗,因此早期 诊断成为AD研究领域一个备受关注的问题。目前 AD的早期诊断迫切需要灵敏、精准、便捷、经济 的检测技术,AD的纳米体外诊断技术在早期诊 断、预后判断以及疗效评估等方面展现了极大临床 应用潜力。

#### 2.1 生物标志物的富集

通常情况下,目标蛋白在体液中的含量极低。 例如,在CSF和血液中,Aβ和tau蛋白的浓度低至 皮摩尔级别<sup>[49]</sup>。另外,复杂的体液环境为目标蛋 白的检测增加了难度。因此,许多检测技术需要在 检测目标蛋白之前对其进行预富集和分离。

免疫捕获是一种依靠抗原-抗体相互作用实现 蛋白质、多肽等生物分子捕获和浓缩的富集技 术<sup>[50]</sup>。免疫磁珠(immunomagnetic beads, IMB) 是目前最常用的免疫捕获新型生物纳米材料。IMB •75·

实质上是一种表面覆盖高分子或者化学小分子的磁性纳米颗粒,表面修饰的氨基、羧基、巯基等能够与抗体偶联,磁性纳米颗粒的超顺磁性使其能够在外加磁场的作用下定向移动。目前,免疫磁珠已经可以用于细胞<sup>[51]</sup>、细胞外囊泡<sup>[52]</sup>、蛋白质<sup>[53]</sup>以及基因<sup>[54]</sup>的富集、分离和提纯。

目前报道的许多 AD 相关生物标志物的检测技 术都使用 IMB 对目标蛋白进行预富集。ADAM10 是 APP 的α分泌酶,能够通过裂解 APP 来阻止 Aβ 的生成。研究表明,ADAM10的活性降低与 AD病 理相关<sup>[45]</sup>。在此基础上,Faria等<sup>[55]</sup>研制了一种 用于 CSF 和血浆中 ADAM10 检测的微流控平台 (图 3)。研究者首先使用羧基活化的免疫磁珠偶联 抗体,捕获血浆样本中的 ADAM10,然后使用磁 分离的方法将富含 ADAM10 的免疫磁珠从血浆中 分离出来,用于后续的检测工作。与传统的酶联免 疫吸附法(enzyme-linked immune sorbent assays, ELISA)相比,使用该检测方法能够获得更低的检 出限(limit of detection, LOD)。



Fig. 3 Immunomagnetic capture of ADAM10 in a plasma sample and the detection using disposable microfluidic platform<sup>[55]</sup>

#### 图3 血浆样品中ADAM10的免疫磁性捕获及一次性微流控平台<sup>[55]</sup>

(a) MBs与HRP和Ab2结合;(b) 样品中的ADAM10免疫磁捕获;(c) 微流控系统设置及瞬态电流信号。MB: 磁性纳米颗粒; HRP: 辣根 过氧化物酶; Ab2: 去整合素金属蛋白酶抗体。

Tao 等<sup>[56]</sup> 在使用滚环扩增电化学发光分析法 检测血浆中的 Aβ40 和 Aβ42 时,也使用了 IMB 对 目标蛋白进行预富集。在进行电化学分析之前,使 用抗体功能化的IMB捕获血浆样本中的Aβ。该方 法获得的Aβ40和Aβ42的LOD分别是1.99 ng/L和 3.14 ng/L。此外,免疫捕获还可以应用于目标蛋白 的荧光检测。Li等<sup>[57]</sup>使用氨基功能化的磁性纳米 颗粒和磁性纳米棒偶联不同抗体,分别捕获CSF 中的Aβ42以及tau蛋白。在进行荧光分子标记后, 用全内反射荧光显微镜的电子倍增电荷耦合器件 (electron-multiplying charge-coupled device, EMCCD)成像系统采集荧光信号,对CSF中的 Aβ42和tau蛋白进行定量分析。IMB的使用实现了 对Aβ42和tau蛋白的预富集和纯化,减少了CSF中 其他成分对检测信号的干扰,这大大提高了检测的 灵敏性和准确性。

#### 2.2 纳米生物传感器的信号转导与增强

生物传感器是能够将生物反应转化为可测量信 号的装置,因其具有分析速度快、成本低、操作简 便等优势,成为生物医学领域十分有前景的疾病诊 断辅助工具<sup>[58]</sup>。纳米技术的发展促进了生物传感 器的构成和性能提升<sup>[59]</sup>。纳米材料和纳米技术不 仅可以促进生物信号转换为可以量化的光电信号, 而且可以凭借自身优异的理化性质来提高生物传感 器的灵敏度,进而降低检测极限。纳米技术与生物 传感器的融合为AD生物标志物的检测提供了更灵 敏、更精准、更稳定的检测平台。

# 2.2.1 电信号调控

电化学传感器是生物传感器领域的一个重要分 支。电极与导电溶液接触时会发生生物化学反应, 电化学工作站通过监测该过程的电流、阻抗和电导 率的变化对分析物进行定量检测<sup>[2]</sup>。

循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)是一 种最常用的电化学分析方法。该方法主要是通过监 测溶液中发生的氧化还原反应实现对分析物的检 测,在AD早期生物标志物的检测中也有实用价 值。例如,Costa-García等<sup>[60]</sup>在金纳米颗粒(gold nanoparticles,AuNPs)修饰的丝网印刷碳电极上 通过链霉亲和素-生物素偶联Aβ42,随后加入Aβ 42和Aβ42抗体的混合溶液。由于抗体的结合位点 有限,溶液中的Aβ42和电极上的Aβ42参与竞争反 应。当反应达到平衡后,加入碱性磷酸酶耦合IgG 抗体(Anti-IgG-AP)以及3-吲哚基磷酸盐与银离 子的混合物(3-IP/Ag<sup>+</sup>)。在碱性磷酸酶催化作用 下,溶液中发生酶促银沉积反应,Ag<sup>+</sup>被还原成 Ag<sup>0</sup>。此时进行CV扫描,溶液中的氧化还原反应 会引起峰值电流的变化,峰值电流的强度即可反映 溶液中Aβ42的浓度。研究结果表明,该免疫传感 器在为0.5~500 μg/L范围内可以对Aβ42进行有效 检测,LOD为0.1 μg/L。

电化学阻抗谱(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)是另一个应用比较广泛的电化 学分析方法。Qin等<sup>[61]</sup>制备了一种基于姜黄素的 非酶电化学传感器检测Aβ寡聚体(Aβ oligomer, AβO)。该工作利用姜黄素-镍配合物修饰电极,镍 的存在增加了姜黄素的导电性。AβO能够阻碍电 极表面的电子传递,导致电子转移电阻明显增加。 实验结果表明,在0.001~5 nmol/L的范围内,姜黄 素传感器阻抗响应与AβO的浓度呈现良好的线性 对应关系。

方 波 伏 安 法 (square-wave voltammetry, SWV) 是一种快速、灵敏的电化学定量分析方法。 SWV可以用于 AD 生物标志物 tau441 的灵敏检测。 Guo 等<sup>[62]</sup>使用化学剥离的单层还原氧化石墨烯 (reduced graphene oxide, rGO) 修饰的电极进行 tau 蛋白抗体功能化,随后用于检测 AD 患者血清 样本中的 tau441。tau441 与电极表面抗体结合从而 阻断了电子的传递,因此随着 tau 蛋白浓度增加, SWV 峰值电流逐渐降低。该电化学传感器在 0.08 ~80 pmol/L 的浓度范围内与 tau441 的浓度有良好的 线性关系,LOD 为 75 fmol/L。

差 分 脉 冲 伏 安 法 (differential pulse voltammetry, DPV) 在物质痕量检测分析中有着 广泛的应用。因其能够降低背景的电流信号,表现 出更高的灵敏度和更低的检出限。Guo 等<sup>[63]</sup> 研发 了一种基于 tau 蛋白抗体功能化金电极的电化学传 感器,用于检测 AD 患者血清样本中的 tau381。为 了实现信号的进一步放大,研究者还制备了一种基于 AuNPs 的生物偶联体,从而形成抗体-蛋白质-生物偶联体的三明治结构。AuNPs 增加了电极表面 的电子转移效率,从而提高了 DPV 电流峰值,进 而 起 到 信 号 放 大 的 作 用 。 该 传 感 器 在 0.5~100 μmol/L 范围内能够实现对 tau381 的灵敏检测,LOD 为 0.42 pmol/L。

2.2.2 光信号转化

光学生物传感器能够将生物反应转化为吸收、 反射、散射和荧光等可量化的光学信号<sup>[2]</sup>。目前 已经发展了基于不同光学传感技术的生物传感器, 用于检测蛋白质、核酸和胆固醇等生物分子。表面 等离激元共振(surface plasmon resonance, SPR) 是一种重要的光学检测技术,其工作原理是基于折 射率(refractive index, RI)的变化来实现生物分 子间相互作用的分析<sup>[64]</sup>。当生物分子与 SPR 传感 芯片有结合时,芯片表面的质量增加引起 RI 的变 化,进而 SPR 角也随之发生变化。因此 SPR 角的 动态变化即可反映生物分子间相互作用的特异性信 号。SPR 具有高通量、高灵敏度、无标记和实时监 测等优点<sup>[65]</sup>,因此其在生物传感检测方面具有广 泛的应用。金纳米薄膜和银纳米薄膜是制备 SPR 传 感芯片的常用材料,它们在近红外和可见光范围内 能够产生强烈的等离激元共振<sup>[66]</sup>。由于金纳米薄 膜具有很好的化学稳定性和生物相容性,因此在 SPR 传感器中更为常见。

借助金纳米薄膜基底的 SPR 传感芯片, Homola课题组<sup>[67]</sup>实现了对CSF中tau-Aβ复合物的 灵敏检测。首先,端基为COOH-和OH-的硫醇分 子在金基底上形成混合自组装单分子膜(selfassembled monolayer, SAM),然后通过氨基偶联 的方法将 tau 蛋白抗体修饰在 SAM 上制备 SPR 传感 芯片。为了放大传感器的检测信号,研究者引入了 AuNPs,实验结果显示,AuNPs能够显著增加不同 浓度 tau-Aβ 样本的信号差异。该传感器对 CSF 中 tau-Aβ 复合物检测的 LOD 为 0.1 pmol/L。

为了提高受体与标志物的亲和力,进而提高传 感器的特异性,近年来逐渐发展了抗体的替代品。 例如,Yang课题组<sup>[68]</sup>使用类肽纳米片层修饰的表 面等离激元共振成像(SPR imaging,SPRi)传感 器实现对血清和血浆中Aβ的高灵敏高特异性检测。 具有识别环的类肽分子在外力作用下形成紧密堆积 的纳米片层(图4),该纳米片层能够模拟抗体的 功能,纳米片层起到支撑作用,表面的识别环能够 与Aβ发生特异性结合,从而产生SPR响应信号。 与抗体识别相比,类肽纳米片层具有更高的稳定性 和更低的成本,并且在区分对照组和AD组血液样 本时,二者的信号差异更为显著。实验结果证明, 该传感器在区分对照组、MCI与AD组样本时具有 良好的效果,LOD低至皮摩尔级别。





图4 环状类肽纳米片结合表面等离子体共振成像(SPRi)检测血清或血浆中Aβ42的示意图<sup>[68]</sup>

纳米技术的发展为传感器性能优化奠定了基础。近年来,在SPR技术的基础之上,逐渐发展了 另一种具有更高灵敏度的检测技术,局域表面等离激元共振(localized surface plasmon resonance, LSPR)技术<sup>[69]</sup>。与SPR类似的,该方法主要是通 过检测金属纳米结构上RI的变化引起共振波的偏 移来检测生物分子<sup>[70]</sup>。与SPR不同,LSPR传感芯 片表面不是金属薄层,而是均匀分布的金属纳米结 构,例如金纳米球<sup>[71]</sup>、金纳米星<sup>[72]</sup>和金纳米 棒<sup>[73]</sup>等纳米结构。由于金属纳米结构和周围介质 之间界面处的 RI 变化会引起共振波长更大的偏 移<sup>[70]</sup>,因此LSPR具有更高的灵敏度。

以均匀分散的AuNPs单层为基底,Ly等<sup>[74]</sup>制 备了一种LSPR传感平台,用来检测AD生物标志 物蛋白Aβ42。在链霉亲和素的帮助下,生物素功 能化的Aβ42单克隆抗体被固定在AuNPs的 Langmuir-Blodgett(LB)膜上,用于捕获Aβ42。 该传感器能够检测到CSF中微量的Aβ42,低至  $1~\mu g/L_{\,\circ}$ 

除了使用单一形状的 AuNPs,根据纳米颗粒 的形状不同,LSPR 还可以对不同的生物标志物进 行识别和检测。在此基础上,Kim等<sup>[75]</sup>制备了一 种形状编码的LSPR生物传感器,用于检测模拟血 浆中的Aβ40、Aβ42以及 tau 蛋白。3种不同形状的 AuNPs分别对Aβ40、Aβ42以及 tau 蛋白的抗体功 能化,用于捕获溶液中相应的生物标志物。随后, 研究者以不同的转速对混合溶液进行离心,将分离 产物分别进行LSPR分析。该传感器对 3种生物标 志物检测的LOD都达到了飞摩尔级别。

与LSPR类似, 拉曼光谱也是一种可以用于 AD生物标志物检测的光学传感技术。拉曼散射效 应本身的信号很弱, 仅占整个散射光的千分之几, 因此很难将其直接应用。有研究者发现, 粗糙表面 能够将其表面分子的拉曼光谱信号提高 10<sup>2</sup>~10<sup>6</sup> 倍<sup>[76]</sup>,这种效应被称为表面增强拉曼(surfaceenhanced Raman spectroscopy, SERS) 效 应。 SERS 包含分子的拉曼散射信息,通常称之为"拉 曼指纹"<sup>[77]</sup>。"拉曼指纹"可以用来识别目标蛋白, 拉曼信号的强度则可以实现目标蛋白的定量分析。

SERS 是一种很有前途的生物分析传感平台, 研究者已经将 SERS 应用于 AD 早期生物标志物的 检测。为了进一步提高 SERS 的检测性能,通过利 用特殊纳米结构来增加表面粗糙度,进而提高 SERS 信号增强因子是一种有效途径。Kim等<sup>[78]</sup> 使用一种银纳米间隙(silver nanogaps, AgNGs) 作为纳米探针,通过 SERS 来检测血液中的 Aβ40 和 Aβ42。在进行 AD 生物标志物检测时,首先构 建免疫磁珠-目标蛋白-AgNGs 的三明治结构,利用 免疫磁珠将其从血清样本中分离出来,而后进行 SERS 分析。研究结果表明,AgNGs增加了原本银 纳米颗粒(silver nanoparticle, AgNPs)的表面粗 糙度,使 SERS 信号强度增强高达 7个数量级,该 传感器的LOD可以低至 0.25 μg/L。

仅靠肉眼观察来区分正常人、AD患者以及其 他痴呆患者的SERS 谱图是不可靠的。近几年,人 工智能的迅速发展为提高 AD 早期诊断的准确性带 来了新的希望。例如,Lednev 等<sup>[79]</sup> 报道了一种 SERS 与多元统计分析相结合的方法,借助人工神 经网络(artificial neural network, ANN)对 AD 患 者血清样本进行 SERS 谱的分析和分类,诊断灵敏 度可以达到98%。

此外, 电化学发光技术也可以实现 AD 生物标

志物的灵敏检测。电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 是在氧化还原反 应中,发光基团通过电化学诱导产生光的过程<sup>[80]</sup>。 ECL 传感器可以通过数值变化来反映电极上的电 荷转移,从而定量分析待检测物的浓度。钉(Ru) 配合物是一种重要的电致发光材料,在光电传感器 中有广泛的应用。Da等<sup>[81]</sup>将其应用于Aβ42聚集 体的免疫检测,开发了一种无标签的纸基生物传感 器。在该传感器中, [Ru(phen),dppz]<sup>2+</sup>与Aβ42聚 集体键合后与溶液中的三丙胺发生氧化还原反应, 导致电化学发光,最终的光信号由纸基双电极电化 学发光检测系统采集输出,该方法可检测到 100 pmol/L Aβ42。石墨氮化碳纳米片 (graphitic carbon nitride nanosheet, g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NSs) 具有良好的 ECL 性质,并且具有比表面积大、导电性好和生 物相容性高的优点,在ECL传感器领域有良好的 应用前景<sup>[82]</sup>。 Deng 等<sup>[83]</sup> 以 AgNPs 改性的 g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>NSs和Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>掺杂的TiO<sub>2</sub>纳米颗粒为发 光元件(图5),制备了一种用于检测Aβ42的双波 长比率电化学发光传感器。两组发光元件分别在不 同波长表现出稳定的ECL 信号,使用两个信号的 比率作为检测信号有利于排除外部的干扰,进而提 高检测的可靠性。该传感器检测 Aβ42 的线性范围 为1×10<sup>-5</sup>至200 µg/L, LOD为2.6 ng/L。

#### 2.3 检测灵敏度的提高

碳纳米材料,例如石墨烯 (graphene)、碳纳 米管 (carbon nanotubes, CNTs)、碳纳米纤维 (carbon nanofibers, CNFs)等,具有良好的光学、 电学以及力学性能,在能源、检测和药物递送等领 域具有重要的应用价值<sup>[84]</sup>。其中,石墨烯是一种 极具影响力的碳材料,它是由单层碳原子排列成六 角形或蜂窝状晶格的二维碳纳米材料,具有比表面 积大、生物相容性好以及易于表面功能化等优 点<sup>[85]</sup>,对于提高检测灵敏度非常有利,因此在纳 米生物传感器领域有很大的实用价值。

借助石墨烯的优良性质, Hwang等<sup>[86]</sup>制备了 一种氧化石墨烯场效应晶体管 (graphene oxide field effect transistor, gFET) 生物传感器, 对血浆 中的Aβ42和tau蛋白进行超灵敏和多重检测。还原 氧化石墨烯 (reduced graphene, rGO) 为抗体的固 定提供了大量结合位点,这大大增强了传感器捕获 Aβ42和t-tau (总tau蛋白) 的能力,进而提高了检 测的灵敏度。Awan等<sup>[87]</sup> 报道了另外一种用于检 测 AD 的重要生物标志物凝聚素 (clusterin) 的



Fig. 5Schematic illustration of preparation of dual-wavelength ratiometric electrochemiluminescence sensor图5双波长比率电化学发光传感器制备示意图<sup>[83]</sup>

gFET。该研究使用1-戊二酸丁二酰亚胺酯作为连接分子,将凝聚素抗体连接在退火石墨烯表面。实验结果表明,该传感器的最低检出限为4 fmol/L。

CNTs是由石墨烯卷曲形成的管状结构,可分 为单壁碳纳米管(single-walled carbon nanotubes, SWCNTs)和多壁碳纳米管(multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs)。碳纳米管拥有与石墨烯类 似的性质,已经被用于 AD 早期生物标志物的检 测。例如,Park等<sup>[88]</sup>研制了一种基于 SWCNTs 薄 膜的生物传感器,用于同时检测人体血浆中t-tau、 p-tau181、Aβ42和Aβ404种 AD 核心生物标志物。 首先使用 LB 膜方法制备了单层碳纳米管薄膜,通 过反复施加外力让所获得的单层碳纳米管薄膜,通 过反复施加外力让所获得的单层碳纳米管紧密堆 积,单向排列(图6)。紧密堆积的 SWCNTs 结构 为抗体的偶联提供了更多有效活性位点,与随机排 列的碳纳米管相比,可以将传感器的检测灵敏度提 高1.88倍。

MWCNTs也可以应用于 AD 生物标志物的检测。Yu 等<sup>[89]</sup>设计了一种用夹心法检测 Aβ分子的高灵敏度的生物传感器。该方法是以 MWCNTs 和 AuNPs 为基础,依靠明胶蛋白来捕获 AD 大鼠 CSF 和 脑 组 织 中 可 溶 性 Aβ40 和 Aβ42。一方 面, MWCNTs 能够加速电子的转移;另一方面,巨大的比表面积为明胶蛋白提供更多的附着位点,这大

大提高了检测灵敏度。数据结果显示,使用碳纳米 管能够将电信号响应至少提高1倍<sup>[90]</sup>。

# 2.4 AD纳米检测技术的临床价值

AD生物标志物检测平台的构建以及性能优化 最终是为了满足临床应用的需求。临床价值的体现 是众多传感检测平台面临的巨大挑战。近年来,以 纳米技术为基础的检测平台,在AD的预后判断、 疗效评估以及早期诊断等方面都显现了实际应用 价值。

2.4.1 疾病的预后判断和疗效评估

以纳米科学为基础的体外诊断技术具有操作简 单和便于携带的优点,能够实现对生物标志物的实 时监测。例如,Singh等<sup>[91]</sup>开发了一种用于同时 检测Aβ40和Aβ42的生物传感芯片。该芯片连接了 便携式读取器并且将其与移动手机应用程序相结 合,用于数据的分析和采集。尽管该设备并没有应 用于真实样本的分析,但是提供了一种可视化AD 生物标志物的实时监测方法,可能用于药物疗效的 评估。

尽管 AD 治疗药物的研发工作<sup>[92-95]</sup> 从未停止, 但目前依然没有能够治疗 AD 的特效药物。目前已 有 AD 治疗药物的有效成分主要都是乙酰胆碱酯酶 抑 制 剂 (acetylcholinesterase inhibitors, AChEIs)<sup>[96]</sup>,因此,检测药物对乙酰胆碱酯酶



 Fig. 6
 Schematic illustration of a densely aligned CNT sensor array for AD biomarkers<sup>[88]</sup>

 图6
 AD生物标志物密集排列的CNT传感器阵列示意图<sup>[88]</sup>

(acetylcholinesterase, AChE)的抑制效果在药物 的研发过程中至关重要。rGO的能带结构中,其布 里渊区边界的高对称点上存在具有线性色散关系的 上下锥形结构,这些锥形结构的顶点称之为狄拉克 点。狄拉克点的位移变化可以用来评估rGO表面 发生的化学反应。在此基础上,Hwang等<sup>[97]</sup>制备 了一种 AChE 功能化的gFET。AChE 与乙酰胆碱 (acetycholine, ACh)之间的酶催化反应会引起狄 拉克点位移,从而可以推断溶液中 ACh 的浓度。 作者使用该设备验证了两种常见的 AChE 抑制剂, 多奈哌齐和卡巴拉汀对 AChE 有明显的抑制效果。 该工作提供了一种乙酰胆碱的检测方法,并在药疗 效评估方面具有一定的应用价值。

# 2.4.2 疾病的早期诊断

到目前为止,由于AD的致病机理尚不清晰,临床上针对AD的治疗方法只能延缓而不能阻止AD的发生。如果能够在MCI期甚至临床前期识别AD风险人群,将对后续的治疗有重要的指导意义。

由于rGO具有良好的稳定性和生物相容性, 常被用于构建生物传感器,对AD血液样本进行分析。Hwang等<sup>[98]</sup>制备了一种依赖于电阻变化的 rGO传感器。为了评估传感器的检测性能,作者应 用该传感器检测血浆分离细胞外囊泡中的Aβ42, 结果表明rGO传感器在区分AD患者和正常对照组 的临床样本时显示出显著的信号差异(*P*<0.001), 这说明该传感器在AD诊断方面具有临床应用 潜力。

基于 SWCNTs 的生物传感器也可以用于 AD 患者血液样本的分析。Kim 等<sup>[88]</sup>借助紧密堆积的SWCNTs 薄膜生物传感器,提供了一种基于血液样本的多靶点检测方法。通过测量血液样本中 t-tau/ Aβ42、p-tau181/Aβ42和 Aβ42/Aβ40 的检测信号值,该传感器能够实现临床诊断中 AD 患者与健康对照组的区分。该传感器的平均灵敏度为90.0%,选择性为90.0%,平均准确率为88.6%。

目前已经有许多纳米检测技术应用于临床样本的分析,要想应用于对临床样本进行AD疾病进展的判断,早日实现AD的早期诊断,还需要进一步提高检测器灵敏度、准确性等检测性能。

# 3 总结与展望

尽管人们对AD致病机制进行了长达近百年的

探索,目前依然无法对 AD 有一个透彻清晰的认 识。这也是阻碍 AD 特效药物研发的一个关键因 素。已经获得批准的 AD 治疗药物主要是用来延缓 AD 疾病进展,而不能从根本上阻止 AD 进展,因 此,AD 的早期诊断显得至关重要。在众多检测方 法中,纳米体外诊断技术具有显著的优势。纳米技 术不仅能够将检测信号转换成光学、电学等易于检 测的信号,而且还能通过纳米材料本身的性质优化 检测设备的性能。

近年来报道的检测方法主要聚焦于检测灵敏度 的提高,要想在CSF和血浆这样成分复杂的体系中 实现 AD 生物标志物的精准检测,提高检测灵敏度 仍然是一个值得关注的话题。越来越多的研究结果 表明,对单一生物标志物的检测无法实现对AD进 展的准确判断。为了提高检测的准确度,目前的研 究方向逐渐从仅针对单一靶点的检测过渡到多个靶 点的同时检测。另外,要想在CSF和血液等复杂的 体液中准确定量生物标志物,受体的特异性识别能 力也是影响检测性能的关键因素。目前已经发展了 多肽、类肽、核酸适配体等可替代抗体的受体识别 分子。未来还需要开发更多特异性更强的受体识别 元件。同时,在进行复杂体液的检测工作中,传感 器的信号稳定性、重现性有待进一步研究。为了将 目前的检测技术早日应用于AD的临床诊断,除了 提高检测灵敏度之外,诊断灵敏度也是一个值得关 注的因素。人工智能的兴起,提供了一种更为准确 的AD诊断辅助工具。为了更好地实现AD的预后 判断,实时追踪 AD 药物的治疗效果,小型化、集 成化的传感芯片有待开发。纳米技术、微流控技 术、芯片制造技术和人工智能技术等的有机结合将 推动 AD 体外诊断技术的快速发展, AD 早期诊断 有望成为现实。

#### 参考文献

- Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease. Lancet, 2021, 397(10284): 1577-1590
- [2] Brazaca L C, Sampaio I, Zucolotto V, et al. Applications of biosensors in Alzheimer's disease diagnosis. Talanta, 2020, 210: 120644
- [3] Fang F, Hu H. Recent progress on mechanisms of human cognition and brain disorders. Sci China Life Sci, 2021, **64**(6): 843-846
- [4] Huang Y, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. Cell, 2012, 148(6): 1204-1222
- [5] Sperling R A, Aisen P S, Beckett L A, et al. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association

workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers Dement, 2011, 7(3): 280-292

- [6] Petersen R C, Wiste H J, Weigand S D, et al. NIA-AA Alzheimer's disease framework: clinical characterization of stages. Ann Neurol, 2021, 89(6): 1145-1156
- [7] Porsteinsson A P, Isaacson R S, Knox S, et al. Diagnosis of early Alzheimer's disease: clinical practice in 2021. J Prev Alzheimer's Dis, 2021, 8(3): 371-386
- [8] Sheng J, Wang L, Cheng H, et al. Strategies for multivariate analyses of imaging genetics study in Alzheimer's disease. Neurosci Lett, 2021, 762:136147
- [9] Femminella G D, Thayanandan T, Calsolaro V, et al. Imaging and molecular mechanisms of Alzheimer's disease: a review. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 3702
- [10] Janelidze S, Pannee J, Vanderstichele H, et al. P4-226: CSF Aβ42/ 40 and Aβ42/38 ratios by prm mass spectrometry or elisa: improved biomarkers of Alzheimer's disease. Alzheimers Dement, 2015, 11(7S\_Part\_19, Supplement): P866
- [11] Bijttebier S, Theunis C, Jahouh F, et al. Development of immunoprecipitation - two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry methodology as biomarker read-out to quantify phosphorylated tau in cerebrospinal fluid from Alzheimer disease patients. J Chromatogr A, 2021, 1651:462299
- [12] Grasso G. Mass spectrometry is a multifaceted weapon to be used in the battle against Alzheimer's disease: amyloid beta peptides and beyond. Mass Spectrom, 2019, 38(1): 34-48
- [13] Nguyen P H, Ramamoorthy A, Sahoo B R, et al. Amyloid oligomers: a joint experimental/computational perspective on Alzheimer's disease, Parkinson's disease, type II diabetes, and amyotrophic lateral sclerosis. Chem Rev, 2021, 121(4): 2545-2647
- [14] Goedert M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: the prion concept in relation to assembled Abeta, tau, and alpha-synuclein. Science, 2015, 349(6248): 1255555
- [15] Candelise N, Scaricamazza S, Salvatori I, et al. Protein aggregation landscape in neurodegenerative diseases: clinical relevance and future applications. Int J Mol Sci, 2021, 22(11): 6016
- [16] Willbold D, Strodel B, Schroder G F, et al. Amyloid-type protein aggregation and prion-like properties of amyloids. Chem Rev, 2021, 121(13): 8285-8307
- [17] Kayed R, Head E, Thompson J L, et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science, 2003, 300(5618): 486-489
- [18] Li S, Selkoe D J. A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble Aβ oligomers from Alzheimer's brain. J Neurochem, 2020, 154(6): 583-597
- [19] Komleva Y K, Lopatina O L, Gorina Y V, et al. Early changes in hyppocampal neurogenesis induced by soluble Aβ1-42 oligomers. Biomed Khim, 2018, 64(4): 326-333
- [20] Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic Aβ oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. Nat Neurosci, 2012, 15(3): 349-357
- [21] Breydo L, Uversky VN. Structural, morphological, and functional

diversity of amyloid oligomers. FEBS Lett, 2015, 589(19 Pt A): 2640-2648

- [22] Sun B L, Chen Y, Fan D Y, et al. Critical thinking on amyloid-betatargeted therapy: challenges and perspectives. Sci China Life Sci, 2021, 64(6): 926-937
- [23] Bystrenova E, Bednarikova Z, Barbalinardo M, et al. Amyloid fragments and their toxicity on neural cells. Regen Biomater, 2019, 6(2): 121-127
- [24] Brinkmalm G, Hong W, Wang Z, *et al.* Identification of neurotoxic cross-linked amyloid- β dimers in the Alzheimer's brain. Brain, 2019, **142**(5): 1441-1457
- [25] Sunderland T, Linker G, Mirza N, et al. Decreased β-amyloid1-42 and increased Tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. JAMA, 2003, 289(16): 2094-2103
- [26] Nakamura A, Kaneko N, Villemagne V L, et al. High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease. Nature, 2018, 554(7691): 249-254
- [27] Harrison T M, La Joie R, Maass A, et al. Longitudinal tau accumulation and atrophy in aging and alzheimer disease. Ann Neurol, 2019, 85(2): 229-240
- [28] Drummond E, Pires G, Macmurray C, et al. Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain. Brain, 2020, 143(9): 2803-2817
- [29] Mielke M M, Aakre J A, Algeciras-Schimnic A, et al. Comparison of CSF phosphorylated tau 181 and 217 for cognitive decline. Alzheimers Dement, 2021, doi: 10.1002/al2.12415
- [30] Musi N, Valentine J M, Sickora K R, et al. Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. Aging Cell, 2018, 17(6): e12840
- [31] Hurtado D E, Molina-Porcel L, Iba M, et al. Aβ accelerates the spatiotemporal progression of Tau pathology and augments Tau amyloidosis in an Alzheimer mouse model. AJP, 2010, 177(4): 1977-1988
- [32] Ferrari A, Hoerndli F, Baechi T, *et al.* β-Amyloid induces paired helical filament-like Tau filaments in tissue culture. J Biol Chem, 2003, 278(41): 40162-40168
- [33] Dore V, Krishnadas N, Bourgeat P, et al. Relationship between amyloid and tau levels and its impact on tau spreading. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2021, 48(7): 2225-2232
- [34] Bennett R E, Devos S L, Dujardin S, *et al.* Enhanced Tau aggregation in the presence of amyloid beta. Am J Pathol, 2017, 187(7): 1601-1612
- [35] Noble W, Hanger D P, Miller C C J, et al. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. Front Neurol, 2013,4:83
- [36] 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. Nat Med, 2020, 26(3): 379-386
- [37] Mattsson-Carlgren N, Janelidze S, Palmqvist S, et al. Longitudinal plasma p-tau217 is increased in early stages of Alzheimer's disease. Brain, 2020, 143(11): 3234-3241

- [38] Janelidze S, Stomrud E, Smith R, et al. Cerebrospinal fluid ptau217 performs better than p-tau181 as a biomarker of Alzheimer's disease. Nat Commun, 2020, 11(1): 1683
- [39] Palmqvist S, Tideman P, Cullen N, et al. Prediction of future Alzheimer's disease dementia using plasma phospho-tau combined with other accessible measures. Nat Med, 2021, 27(6): 1034-1042
- [40] Brickman A M, Manly J J, Honig L S, et al. Plasma p-tau181, ptau217, and other blood-based Alzheimer's disease biomarkers in a multi-ethnic, community study. Alzheimers Dement, 2021, 17(8): 1353-1364
- [41] Palmqvist S, Janelidze S, Quiroz Y T, et al. Discriminative accuracy of plasma phospho-tau217 for Alzheimer disease vs other neurodegenerative disorders. JAMA, 2020, 324(8): 772-781
- [42] Park S A, Han S M, Kim C E. New fluid biomarkers tracking nonamyloid-beta and non-tau pathology in Alzheimer's disease. Exp Mol Med, 2020, 52(4): 556-568
- [43] Ou Y N, Hu H, Wang Z T, et al. Plasma neurofilament light as a longitudinal biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. BSA, 2019, 5(2): 94-105
- [44] Zhang N, Gu D, Meng M, et al. TDP-43 is elevated in plasma neuronal-derived exosomes of patients with Alzheimer's disease. Front Aging Neurosci, 2020, 12:166
- [45] Nakamura M, Li Y, Choi B-R, *et al.* GDE2-RECK controls ADAM10 α-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein. Sci Transl Med, 2021, 13(585): eabe6178
- [46] Knapskog A B, Henjum K, Idland A V, et al. Cerebrospinal fluid sTREM2 in Alzheimer's disease: comparisons between clinical presentation and AT classification. Sci Rep, 2020, 10(1): 15886
- [47] Paweł M, Magdalena G, Agnieszka K P, et al. YKL-40 as a potential biomarker and a possible target in therapeutic strategies of Alzheimer's disease. Curr Neuropharmacol, 2017, 15(6): 906-917
- [48] Hu X, Yang Y, Gong D. A meta-analysis of cerebrospinal fluid visinin-like protein-1 in Alzheimer's disease patients relative to healthy controls and mild cognitive impairment patients. Neuroscience, 2017, 22(2): 94-101
- [49] De Wolf F, Ghanbari M, Licher S, et al. Plasma tau, neurofilament light chain and amyloid-beta levels and risk of dementia; a population-based cohort study. Brain, 2020, 143(4): 1220-1232
- [50] Van Thanh Nguyen N, Taverna M, Smadja C, et al. Recent electrokinetic and microfluidic strategies for detection of amyloid beta peptide biomarkers: towards molecular diagnosis of Alzheimer's disease. Chem Rec, 2021, 21(1): 149-161
- [51] Rao L, Meng Q F, Huang Q, et al. Platelet-leukocyte hybrid membrane-coated immunomagnetic beads for highly efficient and highly specific isolation of circulating tumor cells. Adv Funct Mater, 2018, 28(34): 1803531
- [52] Niu F, Chen X, Niu X, et al. Integrated immunomagnetic beadbased microfluidic chip for exosomes isolation. Micromachines (Basel), 2020, 11(5): 503
- [53] Zheng H, Zhang W, Yang H, et al. An immunomagnetic bead

Prog. Biochem. Biophys.

- [54] Ngo H T, Gandra N, Fales A M, et al. Sensitive DNA detection and SNP discrimination using ultrabright SERS nanorattles and magnetic beads for malaria diagnostics. Biosens Bioelectron, 2016, 81:8-14
- [55] De Oliveira T R, Erbereli C R, Manzine P R, et al. Early diagnosis of Alzheimer's disease in blood using a disposable electrochemical microfluidic platform. ACS Sens, 2020, 5(4): 1010-1019
- [56] Wang D, Dai Y, Wang X, et al. Determination of plasma betaamyloids by rolling circle amplification chemiluminescent immunoassay for noninvasive diagnosis of Alzheimer's disease. Mikrochim Acta, 2021, 188(1):24
- [57] Chan H N, Xu D, Ho S L, et al. Highly sensitive quantification of Alzheimer's disease biomarkers by aptamer-assisted amplification. Theranostics, 2019, 9(10): 2939-2949
- [58] Carneiro P, Morais S, Do Carmo Pereira M. Biosensors on the road to early diagnostic and surveillance of Alzheimer's disease. Talanta, 2020, 211:120700
- [59] Li F, Wang D, Zhou J, et al. Design and biosynthesis of functional protein nanostructures. Sci China Life Sci, 2020, 63(8): 1142-1158
- [60] Rama E C, González-García M B, Costa-García A. Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructurated Screen-Printed Carbon Electrodes. Sens Actuators B Chem, 2014, 201:567-571
- [61] Qin J, Park J S, Jo D G, *et al.* Curcumin-based electrochemical sensor of amyloid- $\beta$  oligomer for the early detection of Alzheimer's disease. Sens Actuators B Chem, 2018, **273**: 1593-1599
- [62] Ye M, Jiang M, Cheng J, et al. Single-layer exfoliated reduced graphene oxide-antibody Tau sensor for detection in human serum. Sens Actuators B Chem, 2020, 308: 127692
- [63] Shui B, Tao D, Cheng J, et al. A novel electrochemical aptamerantibody sandwich assay for the detection of tau-381 in human serum. Analyst, 2018, 143(15): 3549-3554
- [64] Yi R M, Zhang Z, Liu C X, et al. Gold-silver alloy film based surface plasmon resonance sensor for biomarker detection. Mater Sci Eng C, 2020, 116: 111126
- [65] Kim S, Lee H J. Direct detection of alpha-1 antitrypsin in serum samples using surface plasmon resonance with a new aptamerantibody sandwich assay. Anal Chem, 2015, 87(14): 7235-7240
- [66] Zhu J, Li X, Li J J, et al. Enlarge the biologic coating-induced absorbance enhancement of Au-Ag bimetallic nanoshells by tuning the metal composition. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2018, 189: 571-577
- [67] Špringer T, Hemmerová E, Finocchiaro G, *et al.* Surface plasmon resonance biosensor for the detection of tau-amyloid β complex. Sens Actuators B Chem, 2020, **316**: 128146
- [68] Gao H, Liu M, Zhao Z, et al. Diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease by the plasma and serum amyloid-beta 42 assay through highly sensitive peptoid nanosheet

sensor. ACS Appl Mater Interfaces, 2020, 12(8): 9693-9700

- [69] Jo S, Lee W, Park J, et al. Localized surface plasmon resonance aptasensor for the highly sensitive direct detection of cortisol in human saliva. Sens Actuators B Chem, 2020, 304: 127424
- [70] Mayer K M, Hafner J H. Localized surface plasmon resonance sensors. Chem Rev, 2011, 111(6): 3828-3857
- [71] Yockell-Lelièvre H, Lussier F, Masson J F. Influence of the particle shape and density of self-assembled gold nanoparticle sensors on LSPR and SERS. J Phys Chem C, 2015, 119(51): 28577-28585
- [72] Park Y I, Im H, Weissleder R, *et al.* Nanostar clustering improves the sensitivity of plasmonic assays. Bioconjug Chem, 2015, 26(8): 1470-1474
- [73] Huang Y, Zhang X, Ringe E, et al. Tunable lattice coupling of multipole plasmon modes and near-field enhancement in closely spaced gold nanorod arrays. Sci Rep, 2016, 6(1):23159
- [74] Ly T N, Park S. High performance detection of Alzheimer's disease biomarkers based on localized surface plasmon resonance. J Ind Eng Chem, 2020, 91:182-190
- [75] Kim H, Lee J U, Song S, *et al.* A shape-code nanoplasmonic biosensor for multiplex detection of Alzheimer's disease biomarkers. Biosens Bioelectron, 2018, **101**:96-102
- [76] Das R S, Agrawal Y K. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. Vib Spectrosc, 2011, 57(2):163-176
- [77] Nie S, Emory S R. Probing Single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. Science, 1997, 275(5303): 1102-1106
- [78] Yang J K, Hwang I J, Cha M G, et al. Reaction kinetics-mediated control over silver nanogap shells as surface-enhanced Raman scattering nanoprobes for detection of Alzheimer's disease biomarkers. Small, 2019, 15(19): e1900613
- [79] Ryzhikova E, Ralbovsky N M, Halámková L, *et al.* Multivariate statistical analysis of surface enhanced Raman spectra of human serum for Alzheimer's disease diagnosis. Appl Sci, 2019, 9(16): 3256
- [80] Zhao W, Chen H Y, Xu J J. Electrogenerated chemiluminescence detection of single entities. Chem Sci, 2021, 12(16): 5720-5736
- [81] Liu H, Zhou X, Shen Q, et al. Paper-based electrochemiluminescence sensor for highly sensitive detection of amyloid-beta oligomerization: toward potential diagnosis of Alzheimer's disease. Theranostics, 2018, 8(8): 2289-2299
- [82] Jian X, Li Y, Zhao C, *et al.* Introducing graphitic carbon nitride nanosheets as supersandwich-type assembly on porous electrode for ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensing. Analytica Chimica Acta, 2020, **1097**: 62-70
- [83] Qin D, Meng S, Wu Y, et al. Design of a dual-wavelength ratiometric electrochemiluminescence immunosensor for sensitive detection of amyloid-β protein in human serum. ACS Sustain Chem Eng, 2021, 9(22): 7541-7549
- [84] Yang C, Denno M E, Pyakurel P, et al. Recent trends in carbon nanomaterial-based electrochemical sensors for biomolecules: a review. Analytica Chimica Acta, 2015, 887:17-37

- [85] Geim A K, Novoselov K S. The rise of graphene. Nat Mater, 2007, 6(3): 183-191
- [86] Park D, Kim J H, Kim H J, et al. Multiplexed femtomolar detection of Alzheimer's disease biomarkers in biofluids using a reduced graphene oxide field-effect transistor. Biosens Bioelectron, 2020, 167: 112505
- [87] Bungon T, Haslam C, Damiati S, et al. Graphene FET sensors for Alzheimer's disease protein biomarker clusterin detection. Front Mol Biosci, 2021, 8: 651232
- [88] Kim K, Kim M J, Kim D W, et al. Clinically accurate diagnosis of Alzheimer's disease via multiplexed sensing of core biomarkers in human plasma. Nat Commun, 2020, 11(1): 119
- [89] Yu Y, Zhang L, Li C, *et al.* A method for evaluating the level of soluble beta-amyloid(1-40/1-42) in Alzheimer's disease based on the binding of gelsolin to beta-amyloid peptides. Angew Chem Int Ed Engl, 2014, 53(47): 12832-12835
- [90] Xu T, Geng Z. Strategies to improve performances of LSPR biosensing: structure, materials, and interface modification. Biosens Bioelectron, 2021, 174:112850
- [91] Supraja P, Tripathy S, Singh R, et al. Towards point-of-care diagnosis of Alzheimer's disease: multi-analyte based portable chemiresistive platform for simultaneous detection of betaamyloid (1-40) and (1-42) in plasma. Biosens Bioelectron, 2021,

**186**: 113294

- [92] Brashear H R, Ketter N, Bogert J, et al. Clinical evaluation of amyloid-related imaging abnormalities in bapineuzumab phase III studies. J Alzheimer's Dis, 2018, 66:1409-1424
- [93] Mahase E. FDA approves controversial Alzheimer's drug despite uncertainty over effectiveness. BMJ, 2021, 373: n1462
- [94] Cummings J, Blennow K, Johnson K, et al. Anti-Tau trials for Alzheimer's disease: a report from the EU/US/CTAD task force. J Prev Alzheimer's Dis, 2019, 6(3): 157-163
- [95] Vaz M, Silvestre S. Alzheimer's disease: recent treatment strategies. Eur J Pharmacol, 2020, 887: 173554
- [96] Ahmed S, Khan S T, Zargaham M K, *et al.* Potential therapeutic natural products against Alzheimer's disease with reference of acetylcholinesterase. Biomed, 2021, 139: 111609
- [97] Chae M S, Yoo Y K, Kim J, *et al.* Graphene-based enzymemodified field-effect transistor biosensor for monitoring drug effects in Alzheimer's disease treatment. Sens Actuators B Chem, 2018, 272: 448-458
- [98] Chae M S, Kim J, Jeong D, et al. Enhancing surface functionality of reduced graphene oxide biosensors by oxygen plasma treatment for Alzheimer's disease diagnosis. Biosens Bioelectron, 2017, 92:610-617

# Nanotechnology for In vitro Diagnosis of Alzheimer's Disease\*

SONG Shi-Jie<sup>1,2)</sup>, ZHU Ling<sup>1)</sup>, WANG Chen<sup>1,2)\*\*</sup>, YANG Yan-Lian<sup>1,2)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>National Center for Nanoscience and Technology, Beijing 100190, China; <sup>2)</sup>Sino–Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101400, China)

**Abstract** Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative diseases. The accurate diagnosis of AD, especially the early diagnosis, is urgently needed in clinic. In recent years, the technology of non-invasive *in vitro* diagnosis based on biomarkers has developed rapidly. In particular, taking advantage of the high surface activity, unique optoelectronic properties, good biocompatibility, easy surface modification, miniaturization and integration of nanomaterials and nanotechnology, a new nanotechnology for *in vitro* detection and diagnosis of AD has been developed. This greatly improves the sensitivity and accuracy of AD detection, and has the characteristics of simplicity and rapidness, so it plays an important role in early diagnosis, prognosis and curative effect evaluation of AD. This paper reviews the research progress of detection nanotechnology for AD protein biomarker. Here, we introduce the important role of nanomaterials and the methods to enhance the detection signal and improve the detection sensitivity. In addition, we also briefly introduced the application prospect of AD nano-detection technology in clinical diagnosis, prognosis and curative effect evaluation, summarized the advantages and challenges of AD *in vitro* diagnosis technology. It may provide reference information for the research of precision diagnosis and treatment of AD.

**Key words** Alzheimer's disease, biomarkers, nanotechnology, *in vitro* diagnosis, biosensors **DOI**: 10.16476/j.pibb.2021.0296

<sup>\*</sup> This work was supported by grants from Key Research Program of Frontier Sciences (QYZDJ-SSW-SLH048), the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Science (XDB36000000), The National Natural Science Foundation of China (51861135103, 31971295, 21773042) and Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Science (2018048).

<sup>\*\*</sup> Corresponding author.

WANG Chen. Tel: 86-10-82545561, E-mail: wangc@nanoctr.cn

YANG Yan-Lian. Tel: 86-10-82545559, E-mail: yangyl@nanoctr.cn

Received: September 30, 2021 Accepted: December 8, 2021