

阿尔茨海默病潜在的生物流体标记物

叶芷晨, 许茹, 鲁明涵, 刘佩涵, 李冀宏*, 彭亚会*

(哈尔滨医科大学生物化学与分子生物学教研室, 哈尔滨 150086)

摘要: 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人群中最常见的神经退行性疾病, 给家庭和社会带来了巨大的负担。目前AD的临床诊断主要依赖于有创性的脑脊液检测和昂贵的影像学检查(如PET), 因此亟需易获得、成本低且灵敏度高的生物流体标记物来弥补现有的诊断方法。该文将唾液、泪液、尿液生物流体标记物和脑脊液进行了比较, 发现唾液乳铁蛋白对AD具有适当的临床诊断价值, 因其无创性和经济效益可在未来作为AD预测性的生物标记物。此外, 唾液中的 β 淀粉样蛋白、tau蛋白以及泪液中的溶菌酶C和尿液中的异前列腺素均具有AD潜在的诊断前景。

关键词: 阿尔茨海默病; 生物流体; 唾液生物标记物; 泪液生物标记物; 尿液生物标记物

Potential biofluids-markers for Alzheimer's disease

YE Zhichen, XU Ru, LU Minghan, LIU Peihan, LI Jihong*, PENG Yahui*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease in the elderly population, which brings a huge burden to the family and society. Currently, the clinical diagnosis of AD mainly relies on invasive cerebrospinal fluid tests and expensive imaging examinations (such as PET). Therefore, it is urgent to find a biofluid marker that is easily available, low-cost and highly sensitive to complement existing diagnostic methods. In this paper, by comparing the cerebrospinal fluid with saliva, tears and urine biofluid markers, we have found that saliva lactoferrin has been proved to have an appropriate diagnostic value in clinical detection of Alzheimer's disease, and it can be used as a predictive biomarker of AD in the future because of its non-invasive and economic benefits. In addition, amyloid- β , tau proteins, lactoferrin found in saliva and lysozyme C in tears and isoprostandin in urine that all have potential diagnosis of AD.

Key Words: Alzheimer's disease; biofluid maker; salivary biomarkers; tears biomarkers; urine biomarkers

随着人口老龄化现象愈发严重, 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)现已成为老年人群中最常见的神经退行性疾病。中国是世界上老年人口最多的国家, 也是AD病患人数最多的国家, 预测2050年AD患病数量将上升至4250万^[1]。值得注意的是, 中国未治疗的AD患者大约占AD人群的

90%, 预测我国的AD患者治疗的总费用到2030年将为2487.1亿美元, 2050年为1.89万亿美元, 给家庭和社会带来巨大的经济负担^[1]。

AD早期不易被察觉, 这使得该病的防治成为医学界的一个重大难题^[2]。患者常常是在记忆障碍、失语、失认等症状对生活和工作造成障碍时

收稿日期: 2022-03-16

基金项目: 黑龙江省大学生创新创业项目(S202110226080)

第一作者: E-mail: 469907489@qq.com

*通信作者: 彭亚会, E-mail: pyhui7856@163.com; 李冀宏, E-mail: lijihong@126.com

才去检查, 这时脑部已经发生不可逆转的变化, 疾病也发展至晚期, 已经来不及采取有效的预防或治疗措施^[3]。在药物治疗方面, 目前只有5种药物被批准用于治疗AD, 这些药物只能延缓症状而不能改变病程, 且在疾病的早期阶段药物治疗才更加有效^[3]。而且这些药物没有纳入国家医保, 患者购买治疗AD的药物花费金额巨大。所以AD的早期确诊对延缓疾病的进程和减少该病的负担是非常重要的, 但其早期又缺乏明确临床诊断指标。因此, 聚焦于人体体液生物标记物, 如唾液、泪液和尿液中潜在的AD生物标记物, 将对AD的早期诊断具有一定意义。

1 AD的病理特征及临床症状

AD主要临床表现是记忆力丧失、认知能力下降、语言及行为改变, 进而导致病人独立生活能力的迅速下降。该病的重要病理表征包括 β -淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)斑块的积累和tau蛋白的过度磷酸化形成神经纤维缠结, 进而引起神经元发生功能障碍和死亡^[4]。A β 为脑内的正常产物, 但AD患者脑内A β 比例失衡, 表现为A β 42/43增多。增多的A β 42/43在神经细胞内沉积, 造成神经细胞的炎症反应^[5]。此外, 过度磷酸化的tau蛋白会在神经细胞内聚集, 导致神经原纤维缠绕^[5]。最终, 两者导致神经元的减少和胶质的增生。随着病情进一步发展, 患者出现明显认知功能障碍以及精神状态改变, 最终导致全面痴呆, 生活不能自理, 严重影响老年人身心健康及生活质量^[6]。

2 AD目前的诊断方法

AD诊断的主要依据仍然是临床评估, 基于患者的病史, 并结合形态学和脑功能显像。在疾病早期, 有典型的顶枕部萎缩, 而海马相对较少出现临床病理变化。顶颞联合区、扣带后部和楔前叶氟代脱氧葡萄糖(fludeoxyglucose, 18F-FDG)正电子发射计算机断层显像(positron emission tomography, PET)低代谢有助于诊断AD。目前PET已用于临床检测, 其中使用AV1451等示踪剂的tau PET成像是较近的研究发展^[6]。然而, PET的高成本及其辐射性使其很难应用于AD的早期诊断, 这在一定程度上限制了其进一步的普及

应用。

现在已有很多的临床研究数据支持脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)的核心生物标记物A β 42、总tau(T-tau)和磷酸化tau(P-tau)反映AD的病理生理学。AD患者脑脊液的典型表现为A β 42水平低, T-tau和P-tau水平升高^[7]。脑脊液也因此被认为是AD生物标记物的重要来源。其中, A β 42降低和T-Tau和P-Tau升高被认为是AD的特异性标记物^[8]。除A β 42, Tau等核心标记物外, AD患者脑脊液中还存在许多潜在的生物标记物, 如神经丝蛋白。有研究表明, AD人群脑脊液中神经丝的浓度是正常对照组的2.35倍^[9], 提示该生物标记物是区分2个组人群较好的指标; β -分泌酶1(β -site amyloid cleavage enzyme 1, BACE1)在尸检确认的AD患者中蛋白水平升高^[10], 在临床AD患者中其活性也增高, 轻度认知障碍(mild cognitive impairment, MCI)中随访变为AD者活性升高, 其他MCI未见AD组活性高于对照组^[11]; 干扰素- γ 诱导蛋白10(IP-10), 其表达水平升高同时伴随着T-tau和P-tau水平升高^[12]; 脂肪酸结合蛋白3(fatty acid-binding protein 3, FABP3), AD患者的FABP3水平高于健康人群, 而且FABP3与AD患者典型的早期脑结构改变(内嗅皮质萎缩)有关^[13]。

脑脊液检测多应用于AD的中晚期, 获取手段为腰椎穿刺, 但是由于腰椎穿刺是一种侵入性手段, 需要专业人员操作, 且患者主要为高龄者, 反复收集对其心理和生理都有很大的创伤, 限制了其在常规临床测试和随访评估中的实用性^[3,7]。因此, 找到一种简单、安全、廉价、无创的生物标记物是至关重要的。

3 AD潜在的生物流体标记物

3.1 唾液作为AD生物流体标记物的样本来源

理想的AD潜在生物标记物在临床诊断应具有较高的敏感性和特异性, 满足可靠、可重复、使用简单、成本低、无创性等特点^[14]。唾液作为一种新的检测方式, 满足了上列要求。首先唾液是一种容易获取且稳定的体液。其次, 唾液属于无创收集, 无需培训练习并且没有副作用。在口腔中, 唾液为唾液腺、下颌下腺、腮腺和舌下腺共

同分泌,其中舌下腺和下颌下腺受面神经支配,腮腺受舌咽神经支配^[15]。所以唾液腺分泌唾液是受自主神经系统调节,从而中枢神经系统相关蛋白可以被分泌进入唾液中^[16],这是唾液作为潜在诊断标记物的良好来源的最佳原因。

3.1.1 A β

迄今为止,大多数文献发现AD患者脑脊液A β 42呈中度至显著上升,A β 40无变化^[17]。Pareja等^[18]将一组AD患者与一组对照组和帕金森病患者的唾液样本进行比较,发现AD患者唾液中的A β 42有统计学上的增加,而帕金森患者的A β 42水平没有明显变化,这与大脑A β 生成有相似的情况。当然上述结果的差异也可能与诊断标准不同、唾液采集方法、A β 42检测方法有关。唾液A β 42和A β 40水平与AD进展之间是否存在相关性,还需要更多的研究和更大的样本量。

3.1.2 tau

有研究表明,早期的tau蛋白磷酸化参与了神经元死亡的诱导^[19]。鉴于唾液腺通过颅神经接近中枢神经系统,因此唾液中的tau蛋白可能是由支配唾液腺的神经释放的。Shi等^[20]通过Luminex检测发现,AD患者和对照组之间的P-tau/T-tau比值有显著差异,这是一个很好的AD诊断标记物。但是值得注意的是,研究只集中在一个磷酸化位点,苏氨酸181,未来的工作应探索其他磷酸化位点如磷酸化位点Ser396^[21],并进一步研究唾液中tau蛋白的作用机制。

3.1.3 乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)

AChE催化乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)神经递质生成乙酸和胆碱2种成分。胆碱能神经元对记忆和学习至关重要,在AD早期阶段就会被破坏导致ACh水平显著下降^[22]。唾液是由胆碱能神经支配下的唾液腺和黏膜产生的,在老年人中可检测到胆碱能神经支配的唾液乙酰胆碱酯酶的催化活性,因此酶活性与脑潜在胆碱能功能之间存在广泛的相关性^[3]。有研究表明,AD患者早期唾液样本中的AChE水平有所升高^[23]。虽然这些研究证明了唾液乙酰胆碱酯酶作为一种有用的生物标记物的可能性,但对于乙酰胆碱酯酶水平的诊断价值以及唾液标记物是否真实反映了中枢胆碱能功能的变化尚无定论。但是其未来应用的潜能性还是

非常大的。

3.1.4 乳铁蛋白(lactoferrin)

乳铁蛋白具有高度的防御作用,其与调节免疫反应和炎症的发生过程密切相关。在AD病理过程中,抗菌肽作为AD致病过程中脑感染的病原体靶向剂和潜在的标记物已经被提出并进行了实验研究^[24]。已有研究发现,健康人唾液中乳铁蛋白水平低是发生MCI和AD的明显危险因素,乳铁蛋白在AD脑内显著上升,并可能参与A β 沉积,但在AD患者的唾液中乳铁蛋白呈下降^[25]。所以抗菌肽可以作为唾液潜在的生物标记物,并为唾液中其他潜在的生物标记物研究提供新的思路。

3.1.5 其他AD的生物标记物

除淀粉样级联外,炎症、免疫系统激活、轴突损伤、神经细胞间通讯减少、氧化应激等也参与了AD的发病机制。一些促炎物质如白细胞介素-1(IL-1),参与了免疫反应和炎症的激活,是大脑免疫反应的重要媒介。IL-1可以促进淀粉样前体蛋白的产生和代谢,增加淀粉样蛋白沉积和斑块形成,与AD的发病机制密切相关^[26]。IL-1在唾液生物标记物中的具体研究还未有明确的实验报告,但其与AD发病机制相关的优势具有潜在的研究价值。

3.2 泪液可作为AD生物流体标记物的样本来源

随着新型无创检测的快速发展,泪液检测被认为是一种极有前景的检测方法。从胚胎学的角度来看,眼睛与大脑的起源相近。前神经管在形成眼睛之后再形成前脑。AD不仅导致大脑中的神经退行性改变产生结构性改变,同时也会导致眼睛中神经元和血管系统的功能改变^[27]。

AD患者泪液中有特定蛋白质和microRNA的富集。尤其是,研究人员发现,AD患者泪液的总microRNA丰度更高,并且泪液易于收集,便于操作、量大、侵入性小,是很有前景的生物标记物。

3.2.1 microRNA-200b-5p

泪液中的microRNAs与中枢神经系统疾病(central nervous system, CNS)密切相关,microRNAs作为信使,参与了发育与分化过程中的微调^[28]。泪液是高度浓缩的microRNA的来源,并确定在AD患者中泪液中microRNA的总浓度和单个microRNA浓度都会改变^[27]。在具体的microRNA

中, microRNA-200b-5p被鉴定为AD的潜在生物标记物, 与正常人相比, AD泪液样品中microRNA-200b-5p存在更高的水平^[29]。

3.2.2 溶菌酶C

泪液中含有大量蛋白质, 其中较重要的是乳铁蛋白和溶菌酶C等, 它们参与免疫和炎症过程。在此背景下, 泪液中总蛋白浓度和成分的改变, 以及AD患者泪液流速和泪液功能的异常, 支持使用眼泪作为一种新的无创鉴别AD患者的方法。溶菌酶在泪液蛋白质组学的研究中能够很好地反应系统性疾病的发展状况, 因此泪液可用于AD的首次筛查, 泪液分析试验阳性的患者可进一步评估以建立早期诊断^[30]。但是把泪液作为生物标记物也有些挑战, 如普及应用程度不高, 流速不均匀, 患者接受度不高等。

3.3 尿液可作为AD生物标记物的样本来源

外泌体为纳米级物质, 可以透过血脑屏障, 通过肾脏进入尿液。因此, 尿液外泌体成分中的变化可在一定程度上反应脑脊液的变化。外泌体的内容物, 包括核酸、蛋白质和脂质在疾病条件下会发生变化, 而它们的膜保护这些内容物不被降解。这些特征使尿液外泌体成为一种有价值的诊断工具。

3.3.1 异前列腺素8,12-iso-iPF(2 α)-VI

因为氧化应激在AD中起着重要的作用, 故尿中氧化性脑损伤的诱导分子可能成为AD的潜在的标记物。一些代谢物, 如异前列腺素8,12-iso-iPF(2 α)-VI, 一种脂质过氧化产生的化合物, 在AD晚期尿液中含量较高, 可能预测从MCI到AD痴呆的病理进展^[31-33]。

3.3.2 AD相关神经元线蛋白AD7c-NTP

AD患者脑脊液中可分离出更高浓度的AD7c-NTP, 且其升高程度与痴呆的严重程度相关^[34], 因此被认为是潜在的AD生物标记物。最近, 该蛋白的高度特异性被证明可以预测MCI患者尿液中a β 斑块的存在^[35]。这些发现得到了meta分析的支持, 提示可以使用尿AD7c-NTP对可能的AD患者进行早期诊断^[36]。

3.3.3 A β 42和P-S396tau

通过酶联免疫吸附法(ELISA)检测尿液外泌体中的病理蛋白A β 42和P-S396tau的水平, 结果可以

发现AD组中这2种病理蛋白水平(经CD63统一化)较对照组显著升高^[36]。这种差异表明, AD患者的尿液外泌体中可能有这些病理蛋白的聚集。

3.3.4 其他类型蛋白

有研究指出, 与健康老年人相比, AD患者尿中骨桥蛋白水平明显降低, 凝胶蛋白和胰岛素样生长因子结合蛋白7水平升高^[37]。它们都是参与AD多个病理过程的蛋白^[38-40], 可作为潜在的新型的尿液生物标记物。

3.3.5 microRNAs

循环的细胞外microRNAs可被输送到肾上皮细胞, 并与RNA结合蛋白相结合释放到尿液中, 或被包装到微囊泡中, 如外泌体^[41]。未来提高尿microRNAs生物标记物分析的敏感性和准确性的方法, 特别是使用外泌体的方法, 将对研究尿中是否可以检测到microRNAs具有重要价值。许多使用全反式维甲酸分化的人类细胞系、培养的原代神经元、星形胶质细胞以及小鼠和人类模型的大脑切片的研究突出了microRNAs在神经退行性变中的重要性^[42]。总之, 在生物液体中检测microRNAs的潜力, 特别是在大脑中高表达的microRNAs, 得到了已发表文献的良好支持。

4 总结与展望

我们对比了脑脊液与唾液、泪液以及尿液等生物流体标记物(表1), 发现虽然脑脊液中的生物标记物可以用于检测AD, 但脑脊液的抽取具有侵入性, 并且会有并发症和不良反应。因此, 找到一种简单、安全、廉价、无创且能够在症状前阶段检测生物标记物的方法是至关重要的。本文阅读现有的关于AD的生物标记物的文献, 经过大量的阅读和对比, 发现唾液、泪液及尿液生物标记物具有可靠、可重复、使用简单、成本低、无创性等优点。

其中经文章的归纳对比后认为, 唾液是最具有潜力作为一种新的检测方式。目前可用的数据表明, 使用常规免疫分析, 唾液上都可以检测到A β 42、A β 40和多种tau蛋白。其中A β 42、磷酸化tau蛋白的增加和乳铁蛋白的减少可能具有潜在的意义。已有研究证明, 唾液乳铁蛋白水平的降低对AD是特异性的, 且这种潜在的生物标记物显示

表1 脑脊液、唾液、尿液和泪液潜在AD标记物一览表

生物流体	脑脊液	唾液	尿液	泪液
诊断准确性	高	缺乏临床证据	—	—
可得性	有创	无创易获取	无创易获取	无创
标记物	A β 42	A β 42、PD不变	异前列腺素晚期	总microRNA丰度
	T-tau	P-tau/T-tau、苏氨酸181	AD相关神经元线蛋白MCI	MicroRNA-200b-5p
	P-tau	AChE早期	外泌体A β 42	溶菌酶C
	神经丝蛋白	乳铁蛋白	外泌体P-S396	
	BACE初期	IL-1	凝胶蛋白	
	IP-10		骨桥蛋白	
	FABP3		胰岛素样生长因子结合蛋白7	

出的参数具有非常高的敏感性和特异性^[43]。此外，AD患者早期唾液样本中的AChE水平有所升高，表明唾液乙酰胆碱酯酶作为一种AD早期诊断的生物标记物的可能性，但对于乙酰胆碱酯酶水平的诊断价值以及唾液标记物是否真实反映了中枢胆碱能功能的变化尚无定论。外泌体是由大部分细胞释放到细胞外的囊泡，广泛存在于体液中，且可以通过血脑屏障。AD外泌体中APP、A β 寡聚体、A β 1-42、p-S396和tau蛋白水平显著升高^[44]，其中A β 和p-tau水平升高更为明显。唾液外泌体可作为A β 、tau蛋白的载体，在AD的早期诊断中具有巨大潜力^[45]。

综上，我们认为，唾液作为疾病临床前阶段非侵入性生物标记物的潜力，应该进一步研究。鉴于目前缺乏标准化的唾液采集方法，在之后的研究中应统一唾液的采集方式、检测方法，以减少实验误差，并结合神经病理变化、影像学结果以及脑脊液标记物，来确定唾液生物标记物在AD早期诊断中的潜力。同时，大样本的研究有利于唾液样本库的建立，促进人类医学数据库的发展。除此之外，泪液和尿液也具有很大的研究价值，可以进行更多的研究以确定这些生物标记物在检测疾病病理或监测疾病进展中的可靠性。

参考文献

- [1] Clay E, Zhou J, Yi ZM, et al. Economic burden for Alzheimer's disease in China from 2010 to 2050: a modelling study. *J Market Access Health Policy*, 2019, 7(1): 1667195
- [2] Nakamura A, Kaneko N, Villemagne VL, et al. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 2018, 554(7691): 249-254
- [3] Liang D, Lu H. Salivary biological biomarkers for Alzheimer's disease. *Arch Oral Biol*, 2019, 105: 5-12
- [4] Barthélemy NR, Li Y, Joseph-Mathurin N, et al. A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2020, 26(3): 398-407
- [5] Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, et al. Inverse relation between *in vivo* amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β_{42} in humans. *Ann Neurol*, 2006, 59(3): 512-519
- [6] Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59-70
- [7] Haddad M, Perrotte M, Ben Khedher MR, et al. Levels of receptor for advanced glycation end products and glyoxalase-1 in the total circulating extracellular vesicles from mild cognitive impairment and different stages of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimer Dis*, 2021, 84(1): 227-237
- [8] Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol*, 2014, 13(6): 614-629
- [9] Olsson B, Lautner R, Andreasson U, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 2016, 15(7): 673-684
- [10] García-Ayllón MS, Campanari ML, Brinkmalm G, et al. CSF Presenilin-1 complexes are increased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2013, 1(1): 46
- [11] Zetterberg H, Andreasson U, Hansson O, et al. Elevated cerebrospinal fluid BACE1 activity in incipient Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 2008, 65(8): 1102-1107
- [12] Bettcher BM, Johnson SC, Fitch R, et al. Cerebrospinal fluid and plasma levels of inflammation differentially relate to CNS markers of Alzheimer's disease pathology and neuronal damage. *J Alzheimer Dis*, 2018, 62(1): 385-

397

- [13] Hu WT, Chen-Plotkin A, Arnold SE, et al. Novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(6): 669-678
- [14] Tecles F, Escribano D, Martínez-Miró S, et al. Cholinesterase in porcine saliva: analytical characterization and behavior after experimental stress. *Res Vet Sci*, 2016, 106: 23-28
- [15] 彭亚会, 李冀宏, 惠洋, 等. 阿尔茨海默症诊断和监测的唾液生物标记物. *生命的化学*, 2021, 41(1): 49-54
- [16] Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, et al. Alzheimer's disease. *Lancet*, 2016, 388(10043): 505-517
- [17] Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*, 2012, 15(3): 349-357
- [18] Bermejo-Pareja F, Antequera D, Vargas T, et al. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *BMC Neurol*, 2010, 10(1): 108
- [19] Hanger DP, Anderton BH, Noble W. Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*, 2009, 15(3): 112-119
- [20] Shi M, Sui YT, Peskind ER, et al. Salivary tau species are potential biomarkers of Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis*, 2011, 27(2): 299-305
- [21] Pেকেles H, Qureshi HY, Paudel HK, et al. Development and validation of a salivary tau biomarker in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 2018, 10(1): 53-60
- [22] Nunes-Tavares N, Santos LE, Stutz B, et al. Inhibition of choline acetyltransferase as a mechanism for cholinergic dysfunction induced by amyloid- β peptide oligomers. *J Biol Chem*, 2012, 287(23): 19377-19385
- [23] Ahmadi-Motamayel F, Goodarzi MT, Tarazi S, et al. Evaluation of salivary acetylcholinesterase and pseudocholinesterase in patients with Alzheimer's disease: A case-control study. *Spec CARE Dent*, 2018, : scd.12342
- [24] Welling MM, Nabuurs RJA, van der Weerd L. Potential role of antimicrobial peptides in the early onset of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(1): 51-57
- [25] Carro E, Bartolomé F, Bermejo-Pareja F, et al. Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin. *Alzheimers Dement*, 2017, 8(1): 131-138
- [26] TvariJonaviciute A, Zamora C, Ceron JJ, et al. Salivary biomarkers in Alzheimer's disease. *Clin Oral Invest*, 2020, 24(10): 3437-3444
- [27] Singh AK, Verma S. Use of ocular biomarkers as a potential tool for early diagnosis of Alzheimer's disease. *Ind J Ophthalmol*, 2020, 68(4): 555-561
- [28] van den Berg MMJ, Krauskopf J, Ramaekers JG, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers for psychiatric and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol*, 2020, 185: 101732
- [29] Kenny A, Jiménez-Mateos EM, Zea-Sevilla MA, et al. Proteins and microRNAs are differentially expressed in tear fluid from patients with Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 15437
- [30] Mantzavinos V, Alexiou A. Biomarkers for Alzheimer's disease diagnosis. *Curr Alzheimer Res*, 2017, 14(11): 1149-1154
- [31] Praticò D, Clark CM, Liun F, et al. Increase of brain oxidative stress in mild cognitive impairment. *Arch Neurol*, 2002, 59(6): 972-976
- [32] Hee Lee S, Kim I, Chul Chung B. Increased urinary level of oxidized nucleosides in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Clin Biochem*, 2007, 40(13-14): 936-938
- [33] García-Blanco A, Peña-Bautista C, Oger C, et al. Reliable determination of new lipid peroxidation compounds as potential early Alzheimer disease biomarkers. *Talanta*, 2018, 184: 193-201
- [34] Monte SM, Ghanbari K, Frey WH, et al. Characterization of the AD7C-NTP cDNA expression in Alzheimer's disease and measurement of a 41-kD protein in cerebrospinal fluid.. *J Clin Invest*, 1997, 100(12): 3093-3104
- [35] Zhang N, Zhang L, Li Y, et al. Urine AD7c-NTP predicts amyloid deposition and symptom of agitation in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J Alzheimers Dis*, 2017, 60(1): 87-95
- [36] Sun R, Wang H, Shi Y, et al. A pilot study of urinary exosomes in Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis*, 2019, 19(5-6): 184-191
- [37] Yao F, Hong X, Li S, et al. Urine-based biomarkers for Alzheimer's disease identified through coupling computational and experimental methods. *J Alzheimer Dis*, 2018, 65(2): 421-431
- [38] Agbemenyah HY, Agis-Balboa RC, Burkhardt S, et al. Insulin growth factor binding protein 7 is a novel target to treat dementia. *NeuroBiol Dis*, 2014, 62: 135-143
- [39] Yang W, Chauhan A, Mehta S, et al. Trichostatin A increases the levels of plasma gelsolin and amyloid beta-protein in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Life Sci*, 2014, 99(1-2): 31-36
- [40] Rentsendorj A, Sheyn J, Fuchs DT, et al. A novel role for osteopontin in macrophage-mediated amyloid- β clearance in Alzheimer's models. *Brain Behav Immun*, 2018, 67: 163-180
- [41] Wang G, Chan ESY, Kwan BCH, et al. Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer.

- [Clin Genitourinary Cancer](#), 2012, 10(2): 106-113
- [42] Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. [Genome Biol](#), 2004, 5(3): R13
- [43] Bartolome F, Orive G, Carro E. Standardizing salivary lactoferrin measurements to obtain a robust diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. [Alzheimers Dem Diag Ass Dis Mo](#), 2021, 13(1): e12173
- [44] Zhang T, Ma S, Lv J, et al. The emerging role of exosomes in Alzheimer's disease. [Ageing Res Rev](#), 2021, 68: 101321
- [45] Rani K, Rastogi S, Vishwakarma P, et al. A novel approach to correlate the salivary exosomes and their protein cargo in the progression of cognitive impairment into Alzheimer's disease. [J Neurosci Methods](#), 2021, 347: 108980