·综 述·

外周血拉曼光谱在阿尔茨海默病诊断中的应用

吕庆坤,黄高忠*
(上海交通大学附属上海市第六人民医院老年病科,上海 200030)

【摘 要】 阿尔茨海默病(AD)是最常见的痴呆类型,起病隐匿,发展缓慢,病理生理变化复杂,目前尚无明确、特异、可靠的实验室方法对其进行早期诊断。然而,随着人们对AD发病机理的研究及检测技术的发展,近年不断有相关的辅助诊断技术受到重视。如结构磁共振(sMRI)用于评估脑萎缩;功能磁共振(fMRI)用于检测脑血流及新陈代谢的减少;弥散张量成像技术(DTI)用于评估大脑各区纤维连接程度以及脑脊液中Aβ1-42/1-40和tau蛋白及其过磷酸产物的检测。然而拉曼光谱因其可检测有机或无机混合物各成分的独特优势,使其在AD病理机制研究中的作用逐渐受到重视,本文就该技术对AD诊断的可行性及前景做一概述,以期有助于临床医师决策,并为研究者进一步探究梳理思路。

【关键词】 阿尔茨海默病;拉曼光谱技术;外周血;生化标志物
【中图分类号】 R749.1 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.04.073

Application of Raman spectroscopy on peripheral blood for diagnosis of Alzheimer's disease

LYU Qing-Kun, HUANG Gao-Zhong*
(Department of Geriatrics, the Affiliated Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is the most common dementia, and characterized by its insidious onset, slow process of development, and complex pathophysiological changes. In present, there is still no an explicit, specific and reliable laboratory diagnostic method, especially for its early diagnosis. However, with the progress on its pathogenesis and the development of detection techniques, more and more assisted diagnostic techniques captured the attention of many scientists. For example, structural magnetic resonance (sMRI) is used to assess brain atrophy, functional magnetic resonance imaging (fMRI) to detect reduced cerebral blood flow and metabolism, and diffusion tensor imaging (DTI) to evaluate the fibre connections in various areas of the brain. Besides, the detection of Aβ1-42/1-40, and tau and its phosphate product in the cerebrospinal fluid also plays important roles in the diagnosis of AD. What's more, because Raman spectroscopy has been valued for its unique advantages in the detection of components from organic or inorganic mixtures, it is gradually applied in the study of AD pathogenesis. Herein, we summarized the feasibility and prospect of Raman spectroscopy on peripheral blood for the diagnosis of AD, and expected it to be helpful for clinicians to make decision and be beneficial to scientific research.

【Key words】 Alzheimer's disease; Raman spectroscopy; peripheral blood; biomarkers
Corresponding author: *HUANG Gao-Zhong*, *E-mail*: *huanggaozhong@medmail.com.cn*

德国精神病和神经病理学家Alois Alzheimer于1906年首先报道了阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)。[1]病变主要累及前脑、基底节区、海马和大脑皮质,病理特征为神经元丧失、突触功能障碍、细胞外β-淀粉样蛋白(amyloid beta protein,Aβ)沉积为核心的老年斑、神经元胞浆内神经纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFT)和脑血管淀粉样变性。AD患者的临床表现为年龄相关的记忆功能丧失,逐渐发展为认知功能受损,直至完全痴呆、丧失生活自理和社会交际能力。

1 AD诊断现状

AD发病的分子机制还没有完全明了,受高龄、吸烟、基因突变、心脑血管疾病、2型糖尿病和颅脑损伤等多种因素的影响[2]。目前存在一些假说,包括Aβ假说、MicroRNA缺乏假说、NFT假说、细胞自噬假说和细胞周期重入假说等。然而,这些假说至今没有一个被临床或试验的确切证据所证实。近年

收稿日期:2016-10-27;修回日期:2016-11-14
通信作者:黄高忠,E-mail:huanggaozhong@medmail.com.cn

研究结果表明,AD可能不单是脑的疾病,它可能涉及其他非神经组织[3],存在氧化应激、炎症反应、脂质代谢紊乱等病理生理变化。

AD的诊断目前主要根据临床观察及神经心理量表评估,其中AD评定量表被作为诊断"金标准",但近来因其对轻度认知障碍诊断的不敏感性而遭到质疑[4]。此类神经心理量表诊断方法受临床医师经验的影响较大,而且近期神经化学和神经病理学研究提示记忆相关大脑区域的萎缩和新陈代谢降低早于临床表现很多年[5],所以单纯依靠临床行为表现区分AD,对于早期识别和及时诊疗尚有不足。

美国国家老化研究院的Frank等[6]提出,理想的AD生化标志物应该满足以下标准:①揭示AD中枢神经系统基本的病理生理变化,并在神经病理学确诊的病例中得到证实。②诊断敏感性>85%,特异性>75%。③能检测到对疾病治疗有益的任何影响。④可靠、可重复、无创、操作简单。⑤被至少两个资深研究者主持的独立研究所证实,并发表在同行评议的杂志上。标志物的关键特点包括早期发现疾病过程的能力和检测到疾病前临床阶段的能力,并能随疾病发展及严重程度变化而变化。

随着临床检验技术的不断发展,近年相关辅助诊断指标不断受到人们的重视。如结构磁共振((structural magnetic resonance imaging,sMRI)评估脑萎缩;功能磁共振(functional magnetic resonance imaging,fMRI)检测脑血流及新陈代谢的减少;弥散张量成像技术(diffusion tensor imaging,DTI)评估大脑各区纤维连接程度等[7]。另有脑脊液中Aβ1-42/1-40和tau蛋白及其过磷酸产物的检测,这些都在一定程度上有助于AD的临床诊断及病程监测。但这些检查技术或操作复杂,或创伤性大,或费用昂贵,对AD诊断的敏感性及特异性并不理想。

2 拉曼光谱技术

拉曼光谱是1928年印度物理学家Raman发现的一种散射光谱[8],用于研究分子的振动,根据其提供的分子内部各种简正振动频率及有关振动能级的情况,我们可以鉴定分子中存在的官能团。目前,拉曼光谱已广泛应用于材料、化工、石油、高分子、生物、环保、地质等领域。

随着技术的不断发展,拉曼光谱技术包括傅立叶变换技术、表面增强技术、激光共振技术、共焦显微技术、高温技术、拉曼光谱与光导纤维技术联用、固体光声拉曼技术等。各种技术有不同的特点和优势,在不同领域的科研中发挥作用。其中表面增强拉曼光谱技术克服了拉曼光谱灵敏度低的缺点,并可直接分析水相生物分子的结构状态,样品用量少,相比其他方法有明显的优势。人们利用表面增强拉曼光谱技术解决了生物化学、生物物理和分子生物学中的许多难题,包括分子的特殊基团(如氨基酸中的氨基、羧基、芳环等)与界面的相互作用、生物分子与金属表面的键合方式、DNA、RNA、卟啉在银溶胶上的吸附状态等研究[9]。国外有研究人员通过以银胶和银电极为活性基体的表面增强拉曼光谱与流动注射分析联用,成功地获取到嘌呤和嘧啶类化合物的结构信息[10]。

拉曼光谱技术也可应用于疾病的诊疗,可广泛应用于癌症、糖尿病、皮疹等疾病的研究;其检测的样本种类亦多种多样,包括血浆、血清、红细胞及其成分、唾液、尿液等。

3 拉曼光谱技术与AD的病理生理研究

研究人员观测到,脑脊液中不同浓度及不同构像的Aβ(1-40)蛋白的拉曼光谱特点存在明显差异,Aβ蛋白在1670 cm^{-1}波峰处有一个附加肩峰,被认为是β蛋白折叠结构标志性的光谱反应[11]。Ramachandran等[12]通过红外线共振拉曼光谱检测Tau纤维形成过程中的结构变化。Zengin等[13]则通过一种抗体夹心检测方法,可使表面增强拉曼光谱技术检测到25 fM~500 nM浓度之间的Tau蛋白。这些研究有助于我们了解Aβ蛋白、Tau蛋白变化过程和AD病程发展及症状之间的关系,从而诊断或随访AD患者。

海马组织是AD病理变化的重要部分,其中发生Aβ蛋白沉淀、胆固醇含量升高、Tau蛋白过度磷酸化已得到证实。武汉大学研究团队应用微拉曼光谱法对AD痴呆小鼠模型的海马组织进行检测,不仅同样检测到了Aβ的特征光谱,也发现了脂质和过磷酸化Tau蛋白的光谱信号。他们通过对单个波峰和整体光谱带进行统计分析,显示该技术对AD海马组织的敏感性为93.8%,特异性89.6%[14]。有研究者利用近红外线激发的拉曼光谱分析尸检的脑组织切片,其光谱表现有明显的差异[8]。他们展望将来有可能将探针经鼻道达筛板送达脑皮质附近,从而实现活体无创的AD诊断。

4 拉曼光谱技术与AD诊断

血液包括血细胞和血浆,而血浆富含各种蛋白质、脂质和反映不同器官(包括中枢神经系统)生理、病理反应的代谢产物。人体内大约每天有

500 ml 脑脊液被吸收到血液中，而血样采集便捷、相对无创、廉价、临床应用范围广，是研究神经退行性疾病生物标志物的理想对象，对血液成分进行拉曼光谱分析可能会为 AD 的诊断提供一个全新的领域。

Aβ 蛋白是构成 AD 老年斑的主要成分，血小板是其合成、加工和分泌的场所之一。轻度认知功能障碍(mild cognitive impairment, MCI)患者血小板的β淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)分泌及合成相关酶可发生异常。Barbara 等[15]对 MCI 患者血小板中 APP 不同类型比率进行检测并随访了 2 年，发现血小板 APPr 可预测 MCI 患者向 AD 的转变。利用显微拉曼光谱技术检测痴呆小鼠模型外周血的血小板，也发现谱带中 1658 cm^{-1}处波峰的强度及 757 和 743 cm^{-1}波峰强度比对 AD 的分辨准确性达 95.8%[16]。

相比同年龄的健康对照组，AD 患者的红细胞可变性和运氧效率下降，外周血液黏度、红细胞聚集性、红细胞平均容量和 AD 高度相关[17]。Carmona 等[18]人应用拉曼光谱法和红外光谱法分析血浆以区分 AD 和正常衰老。他们分析了 8 例轻度 AD，16 例中度 AD，11 例中度 AD 和 12 例年龄匹配的健康老人，得出来一系列特异标志信号，包括拉曼光谱中 758/743 cm^{-1}、409/423 cm^{-1}和 1672/1658 cm^{-1}各自的波峰强度比，980～910 cm^{-1}和 750～743 cm^{-1}范围内波谱线下面积以及红外光谱中β折叠蛋白区域波谱下面积和 1140～1000 cm^{-1}范围内波谱下面积。综合这些结果后，对 AD 诊断的特异性为 92%，敏感性为 89%，对轻度 AD 的检测率近 100%[18]，该团队后来的研究也得到了类似的结果[19]。Ryzhikova 等[20]应用近红外拉曼显微镜分析研究了 AD 痴呆患者组、非 AD 痴呆患者组及认知正常组的血清拉曼光谱信号，并结合人工神经网络技术和遗传算法处理复杂的光信号，发现拉曼光谱技术对 AD 的诊断有巨大潜力。

红细胞有一个独特的糖代谢通路，可产生 2,3－二磷酸甘油酸(2,3-diphosphoglycerate, 2,3-DPG)，它是调节血红蛋白对氧亲和力的重要代谢中间产物。AD 患者红细胞转运能力长期慢性代偿性增强导致三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)和 2,3-DPG 浓度降低，血红蛋白对氧亲和力增强，组织氧供给不足，最终导致认知功能下降。Kosenko 等[21]认为红细胞内能量代谢紊乱是 AD 的主要启动机制，在此过程中红细胞聚集性和变形性受到影响。氧化应激使红细胞膜上丙二醛浓度升高也会影响红细胞在毛细血管的移动能力，导致血液流变学异常，加重组织氧供给不足[17]。另外，Aβ 与红细胞膜结合，抑制细胞膜乙酰胆碱酯酶和蛋白激酶的活性，介导红细胞膜脂质过氧化[22]。研究者通过表面增强拉曼光谱技术观察到 Aβ40 在结合细胞膜脂质模型时构象发生变化[23]。同时红细胞内某些能量代谢相关酶受到抑制，从而使得维持细胞完整的代谢过程受到抑制，最终导致细胞死亡。老年 AD 患者的红细胞对 Aβ 的毒性更敏感。在 AD 患者病理状态下红细胞柠檬酸盐的离子交换和沉降率都发生异常[24]。研究人员应用显微拉曼光谱仪检测 Aβ(25－35)诱发的模型小鼠红细胞的变异情况，得到了特异的光谱信号[25]，这些信号提示红细胞膜上脂质[26]和蛋白质在 AD 病理变化下产生了某些变化。

5 结 论

AD 的早期诊断一直以来是困扰临床医务工作者的难题，此病的隐匿性、进程缓慢及病理生理改变的不确定性加大了对其诊断和治疗的难度。一个世纪以来，人们对此进行了不懈的探索，获得了可喜的成果，但仍差强人意。拉曼光谱技术是疾病诊疗中的一股新生力量，虽存在着一些不足，如光谱信号数据的有效处理、统一金属粒子制备对表面增强拉曼光谱检测的可重复性等[27]，但是它与其他技术[13,28,29]整合可能更具有发展潜能，为 AD 的研究开辟了一片新领域。AD 诊断在拉曼光谱检测技术的介导下亦有了质的进步。目前诸多报道都提示单纯的生物分子标志物无法理想地诊断 AD，越来越多学者倾向于蛋白质组学、脂质组学、代谢组学领域试图构建多种生物分子组成的模块对疾病进行诊断。拉曼光谱技术所检测的光谱信号正是混合物中各成分信号的总和，它整体反映研究对象的变化，可对患者病理变化进行全面分析，对 AD 这类机制复杂不清的全身性疾病的诊断应该会有所裨益。

【参考文献】

[1] Shampo MA, Kyle RA, Steensma DP. Alois Alzheimer — Alzheimer's disease[J]. Mayo Clin Proc, 2013, 88(12): e155. DOI: 10.1016/j.mayocp.2013.01.031.

[2] 王 越，拓西平. 阿尔茨海默病的危险因素[J]. 中华老年多器官疾病杂志，2015，14(11)：873－876. DOI：10.11915/j.issn.1671-5403.2015.11.201.
Wang Y, Tuo XP. Risk factors for Alzheimer's disease[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2015, 14(11): 873－876. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.11.201.

[3] Giordano V, Peluso G, Iannuccelli M, *et al*. Systemic and brain metabolic dysfunction as a new paradigm for approaching Alzheimer's dementia[J]. Neurochem Res, 2007, 32(4－5):

555-567. DOI:10.1007/s11064-006-9125-8.

[4] Posner HB, Cano S, Carrillo MC, *et al*. Establishing the psychometric underpinning of cognition measures for clinical trials of Alzheimer's disease and its precursors: a new approach[J]. Alzheimers Dement, 2013, 9(1): S56-S60. DOI: 10.1016/j.jalz.2012.10.008.

[5] Bernard C, Helmer C, Dilharreguy B, *et al*. Time course of brain volume changes in the preclinical phase of Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2014, 10(2): 143-151. DOI: 10.1016/j.jalz.2013.08.279.

[6] Frank RA, Galasko D, Hampel H, *et al*. Biological markers for therapeutic trials in Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(4): 521-536. DOI: 10.1016/S0197-4580(03)00002-2.

[7] Hu Z, Wu L, Jia J, *et al*. Advances in longitudinal studies of amnestic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on multi-modal MRI techniques[J]. Neurosci Bull, 2014, 30(2): 198-206. DOI: 10.1007/s12264-013-1407-y.

[8] Hanlon EB, Manoharan R, Koo TW, *et al*. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy[J]. Phys Med Biol, 2000, 45(2): R1-R59.

[9] Jones JC, Mclaughlin C, Littlejohn D, *et al*. Quantitative assessment of surface-enhanced resonance Raman scattering for the analysis of dyes on colloidal silver[J]. Anal Chem, 1999, 71(3): 596-601. DOI: 10.1021/ac980386k.

[10] 伍 林, 欧阳兆辉, 曹淑超, 等. 拉曼光谱技术的应用及研究进展[J]. 光散射学报, 2005, 17(2): 180-186.
Wu L, Ou Yang ZH, Cao SC, *et al*. Research development and application of Raman scattering technology[J]. Chin J Light Scat, 2005, 17(2): 180-186. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5929.2005.02.013.

[11] Lippert JL, Tyminski D, Desmeules PJ. Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy[J]. J Am Chem Soc, 1976, 98(22): 7075-7080.

[12] Ramachandran G, Milón-Garcés EA, Udgaonkar JB, *et al*. Resonance Raman spectroscopic measurements delineate the structural changes that occur during tau fibril formation[J]. Biochemistry, 2014, 53(41): 6550-6565. DOI: 10.1021/bi500528x.

[13] Zengin A, Tamer U, Caykara T. A SERS-based sandwich assay for ultrasensitive and selective detection of Alzheimer's tau protein[J]. Biomacromolecules, 2013, 14(9): 3001-3009. DOI: 10.1021/bm400968x.

[14] Chen P, Shen A, Zhao W, *et al*. Raman signature from brain hippocampus could aid Alzheimer's disease diagnosis[J]. Appl Opt, 2009, 48(24): 4743-4748.

[15] Borroni B, Colciaghi F, Caltagirone C, *et al*. Platelet amyloid precursor protein abnormalities in mild cognitive impairment predict conversion to dementia of Alzheimer type: a 2-year follow-up study[J]. Arch Neurol, 2003, 60(12): 1740-1744. DOI: 10.1001/archneur.60.12.1740.

[16] Park A, Baek SJ, Shen A, *et al*. Detection of Alzheimer's disease by Raman spectra of rat's platelet with a simple feature selection[J]. Chemom Intell Lab Syst, 2013, 121(9): 52-56. DOI: 10.1016/j.chemolab.2012.11.011.

[17] Chang CY, Liang HJ, Chow SY, *et al*. Hemorheological mechanisms in Alzheimer's disease[J]. Microcirculation, 2007, 14(6): 627-634. DOI: 10.1080/10739680701411056.

[18] Carmona P, Molina M, Calero M, *et al*. Discrimination analysis of blood plasma associated with Alzheimer's disease using vibrational spectroscopy[J]. J Alzheimers Dis, 2013, 34(4): 911-920. DOI: 10.3233/JAD-122041.

[19] Carmona P, Molina M, López-Tobar E, *et al*. Vibrational spectroscopic analysis of peripheral blood plasma of patients with Alzheimer's disease[J]. Anal Bioanal Chem, 2015, 407(25): 7747-7756. DOI: 10.1007/s00216-015-8940-7.

[20] Ryzhikova E, Kazakov O, Halamkova L, *et al*. Raman spectroscopy of blood serum for Alzheimer's disease diagnostics: specificity relative to other types of dementia[J]. J Biophotonics, 2015, 8(7): 584-596. DOI: 10.1002/jbio.201400060.

[21] Kosenko EA, Solomadin IN, Tikhonova LA, *et al*. Pathogenesis of Alzheimer's disease: role of oxidative stress, amyloid-beta peptides, systemic ammonia and erythrocyte energy metabolism[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2014, 13(1): 112-119.

[22] Carelli-Alinovi C, Ficarra S, Russo A M, *et al*. Involvement of acetylcholinesterase and protein kinase C in the protective effect of caffeine against β-amyloid-induced alterations in red blood cells[J]. Biochimie, 2016, 121: 52-59. DOI: 10.1016/j.biochi.2015.11.022.

[23] Bhowmik D, Mote KR, Maclaughlin CM, *et al*. Cell-membrane-mimicking lipid-coated nanoparticles confer Raman enhancement to membrane proteins and reveal membrane-attached amyloid-β conformation[J]. ACS Nano, 2015, 9(9): 9070-9077. DOI: 10.1021/acsnano.5b03175.

[24] Greco FA, Satlin A, Solomon AK. Abnormal erythrocyte anion exchange in Alzheimer's disease[J]. Arch Pathol Lab Med, 2000, 124(8):1141-1146. DOI: 10.1043/0003-9985(2000)124<1141:AEAEIA>2.0.CO;2.

[25] Chen DL, Ning L, Li L, *et al*. Method to detect the variants of the erythrocyte in a rat model of Aβ25-35-induced neurotoxicity based on micro-Raman spectroscopy[J]. J Biomed Opt, 2013, 18(11): 118003. DOI: 10.1117/1.JBO.18.11.118003.

[26] Skoumalova A, Madlova P, Topinkova E. End products of lipid peroxidation in erythrocyte membranes in Alzheimer's disease[J]. Cell Biochem Funct, 2012, 30(3): 205-210. DOI: 10.1002/cbf.1836.

[27] Chen F, Flaherty BR, Cohen CE, *et al*. Direct detection of malaria infected red blood cells by surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Nanomedicine, 2016, 12(6): 1445-1451. DOI: 10.1016/j.nano.2016.03.001.

[28] Demeritte T, Viraka Nellore BP, Kanchanapally R, *et al*. Hybrid graphene oxide based plasmonic-magnetic multifunctional nanoplatform for selective separation and label-free identification of Alzheimer's disease biomarkers[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(24): 13693-13700. DOI: 10.1021/acsami.5b03619.

[29] Chou I, Benford M, Beier HT, *et al*. Nanofluidic biosensing for β-amyloid detection using surface enhanced raman spectroscopy[J]. Nano Lett, 2008, 8(6): 1729-1735. DOI: 10.1021/nl0808132.

(编辑: 王彩霞)