



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117825714 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 05

(21) 申请号 202311582708.8

(22) 申请日 2023.11.24

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

申请人 浙江大学医学院附属第一医院

(72) 发明人 章京 郭涪 田辰 陈文涛 虞佳怡

(74) 专利代理机构 杭州华知专利事务所(普通合伙) 33235

专利代理师 王莲莲

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

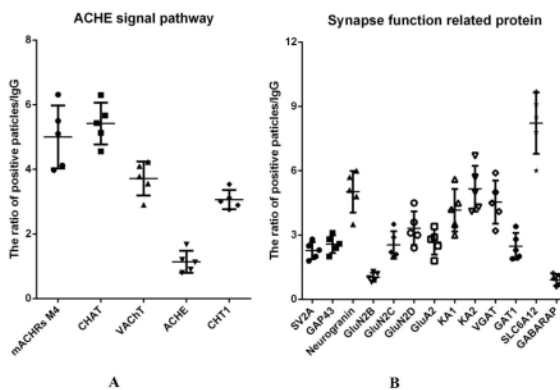
权利要求书1页 说明书9页 附图12页

(54) 发明名称

外周体液胞外囊泡富集检测技术和生物标志物用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断方法和系统

(57) 摘要

本发明提供外周体液胞外囊泡富集检测技术和生物标志物用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断方法和系统,所述生物标志物来源于外周体液胞外囊泡EVs中AChE通路关键蛋白和/或突触功能相关关键蛋白,所述AChE通路关键蛋白包括CHT1、CHAT蛋白中的一种或几种,所述突触功能相关关键蛋白包括KA1、KA2、GluN2D (NR2D)、SLC6A12、VGAT、GAP43、SV2A蛋白中的一种或几种。本发明将AChE通路关键蛋白与突触功能相关标志物联合检测,多重标记EVs同时检测,以避免获取脑脊液、只通过少量外周体液样本就可以反应中枢神经系统变化的效果,实现早期阿尔兹海默病及轻度认知功能障碍的早期筛查和辅助诊断。



1. 基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的生物标志物,其特征在于:所述生物标志物来源于外周体液胞外囊泡EVs中AChE通路关键蛋白和/或突触功能相关关键蛋白,所述AChE通路关键蛋白包括CHT1、CHAT蛋白中的一种或几种,所述突触功能相关关键蛋白包括KA1、KA2、GluN2D(NR2D)、SLC6A12、VGAT、GAP43、SV2A蛋白中的一种或几种。

2. 根据权利要求1所述的基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的生物标志物,其特征在于:CHAT、CHT1、KA1、KA2、GAP43蛋白可单独用于阿尔茨海默病AD的辅助诊断。

3. 根据权利要求1所述的基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的生物标志物,其特征在于:CHAT、CHT1、KA1、GAP43、NR2D蛋白可单独用于轻度认知功能障碍MCI的辅助诊断。

4. 根据权利要求1所述的基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的生物标志物,其特征在于:CHAT蛋白联合NR2D蛋白、CHAT蛋白联合GAP43蛋白、CHT1蛋白联合KA1蛋白、CHT1蛋白联合KA2蛋白、CHT1蛋白联合SLC6A12蛋白中的一组或几组可用于阿尔茨海默病AD的辅助诊断。

5. 根据权利要求1所述的基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的生物标志物,其特征在于:CHAT蛋白联合KA1蛋白、CHAT蛋白联合NR2D蛋白、CHAT蛋白联合GAP43蛋白、CHT1蛋白联合KA1蛋白、CHT1蛋白联合KA2蛋白、CHT1蛋白联合NR2D蛋白、CHT1蛋白联合SLC6A12蛋白中的一组或几组可用于轻度认知功能障碍MCI的辅助诊断。

6. 根据权利要求1所述的基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的生物标志物,其特征在于:外周体液胞外囊泡EVs经PEG8000沉降富集获得。

7. 基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的试剂盒,其特征在于:包括用于权利要求1-6任一项所述的生物标志物的抗体,抗体标记试剂和孵育探针DNA anchor,所述抗体标记试剂包括Alexa Fluro荧光标记kit。

8. 基于权利要求1-6任一项所述的生物标志物、权利要求7所述的试剂盒进行阳性蛋白检测的方法,其特征在于:包括以下步骤,

利用Alexa Fluro荧光标记kit标记权利要求1-6任一项所述的生物标志物的抗体,取标记的抗体与封闭完毕的外泌体混匀,后4℃避光孵育过夜后,加入孵育探针DNA anchor,4℃避光孵育;

在标记完毕的样本中加入PFA,混匀后室温避光孵育;

用PBS稀释到合适浓度上机,用CytoFLEX检测,每秒颗粒数小于1万个颗粒;

使用CytoFLEX的VSSC模式检测孵育探针DNA anchor阳性情况下,获得蛋白标记的阳性比例即可。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:用于非疾病诊断和治疗目的的鉴别。

10. 基于权利要求1-6任一项所述的生物标志物、权利要求7所述的试剂盒的结合外周体液胞外囊泡富集检测技术进行早期阿尔兹海默病的辅助诊断系统。

外周体液胞外囊泡富集检测技术和生物标志物用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断方法和系统

技术领域

[0001] 本发明涉及外周体液胞外囊泡检测和辅助诊断技术领域,具体涉及外周体液胞外囊泡富集检测技术和生物标志物用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断方法和系统。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是最常见的神经退行性疾病,其主要特征是进行性认知障碍。AD是全球十大重大疾病之一,据估计,AD患者约占全球5000万痴呆患者的70%。随着人口老龄化的日益加剧,预计到2050年,全球老年痴呆患者的数量将增加至目前的三倍。此外,在典型AD症状出现之前,AD源性轻度认知障碍(mild cognitive impairment,MCI)的早期筛查也是临床上极具挑战和亟待解决的重大问题。针对包括AD在内的重大脑病的早期筛查、早期诊断和早期干预的“三早原则”是此类疾病防控的全球共识。然而,AD的早期预警和精准诊疗一直是困扰医学界的世界性难题和挑战,目前临床常用的影像、病理和检验等检查手段,由于各自的专业、技术及经济等局限性和滞后性,均无法满足大规模的人群早筛及早诊的工作。因此,开发更加便捷、经济且准确的疾病早期筛查及诊断手段已成为临床亟待解决的科学与技术问题。

[0003] 近年来,胞外囊泡(Extracellular Vesicles,EVs)已经成为诊断生物标志物的研究热点。EVs由外泌体、微泡和凋亡小体组成。几乎所有类型的细胞都能够释放EVs,包括中枢神经系统的细胞,如神经元、少突胶质细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞以及血管内皮细胞等。研究显示,EVs参与中枢神经系统正常细胞间信息传递、神经元应激反应、神经炎症、表观遗传调节和神经可塑性等病理生理过程。目前,EVs的研究在医学领域如神经退行性疾病、癌症等疾病的研究中已经取得了一些突破。据报道,中枢神经系统来源的EVs能够穿过血脑屏障进入外周血,并且能够在外周血中检测到。多项临床生物标志物研究发现,体液中的EVs对于神经退行性疾病具有重要的早期预警和诊断价值。液体活检特别是基于EVs技术的发展为AD的早期预警和诊疗带来了新的曙光。

[0004] 因此,聚焦AD早期阶段即发生变化的关键通路(如,AChE通路)中的关键蛋白和反映AD发生发展过程中神经突触功能损伤的关键蛋白,检测外周血液体中相关的EVs,具有采样微量微创和临床检测便捷快速等优势,有望在患者症状出现前数年就发现MCI或者AD的潜在风险,实现AD的精准早筛和辅助诊断;从而为临床及时干预赢得了时机,具有重大临床应用价值和社会意义。

发明内容

[0005] 为了克服现有技术中存在的不足,本发明提供外周体液胞外囊泡富集检测技术和生物标志物用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断方法和系统,利用外周体液EVs有效地对早期阿尔兹海默病及轻度认知功能障碍进行早期筛查和辅助诊断,通过识别外周体液中阿尔兹海默病早期发生改变的生物标志物进行早期阿尔兹海默病及轻度认知功能障碍的早期

筛查和辅助诊断。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的生物标志物,其中:所述生物标志物来源于外周体液胞外囊泡EVs中AChE通路关键蛋白和/或突触功能相关关键蛋白,所述AChE通路关键蛋白包括CHT1、CHAT蛋白中的一种或几种,所述突触功能相关关键蛋白包括KA1、KA2、GluN2D (NR2D)、SLC6A12、VGAT、GAP43蛋白中的一种或几种。

[0007] 优选的,CHAT、CHT1、KA1、KA2、GAP43蛋白可单独用于阿尔茨海默病AD的辅助诊断。

[0008] 优选的,CHAT、CHT1、KA1、GAP43、NR2D蛋白可单独用于轻度认知功能障碍MCI的辅助诊断。

[0009] 优选的,CHAT蛋白联合NR2D蛋白、CHAT蛋白联合GAP43蛋白、CHT1蛋白联合KA1蛋白、CHT1蛋白联合KA2蛋白、CHT1蛋白联合SLC6A12蛋白中的一组或几组可用于阿尔茨海默病AD的辅助诊断。

[0010] 优选的,CHAT蛋白联合KA1蛋白、CHAT蛋白联合NR2D蛋白、CHAT蛋白联合GAP43蛋白、CHT1蛋白联合KA1蛋白、CHT1蛋白联合KA2蛋白、CHT1蛋白联合NR2D蛋白、CHT1蛋白联合SLC6A12蛋白中的一组或几组可用于轻度认知功能障碍MCI的辅助诊断。

[0011] 优选的,外周体液胞外囊泡EVs经PEG8000沉降富集获得。

[0012] 本发明还提供一种基于外周体液胞外囊泡富集检测技术用于早期阿尔兹海默病的辅助诊断的试剂盒,其包括用于权利要求1-6任一项所述的生物标志物的抗体,抗体标记试剂和孵育探针DNA anchor,所述抗体标记试剂包括Alexa Fluro荧光标记kit。

[0013] 本发明还提供一种基于所述的生物标志物、所述的试剂盒进行阳性蛋白检测的方法,其包括以下步骤,

[0014] 利用Alexa Fluro荧光标记kit标记权利要求1-6任一项所述的生物标志物的抗体,取标记的抗体与封闭完毕的外泌体混匀,后4℃避光孵育过夜后,加入孵育探针DNA anchor,4℃避光孵育;

[0015] 在标记完毕的样本中加入PFA,混匀后室温避光孵育;

[0016] 用PBS稀释到合适浓度上机,用CytoFLEX检测,每秒颗粒数小于1万个颗粒;

[0017] 使用CytoFLEX的VSSC模式检测孵育探针DNA anchor阳性情况下,获得蛋白标记的阳性比例即可。

[0018] 优选的,用于非疾病诊断和治疗目的的鉴别。

[0019] 本发明还提供一种基于所述的生物标志物、所述的试剂盒的结合外周体液胞外囊泡富集检测技术进行早期阿尔兹海默病的辅助诊断系统。

[0020] 本发明的有益效果如下:

[0021] 本申请旨在提供一种能够在外周体液中有效识别到阿尔兹海默病早期发生改变的AChE通路关键蛋白,将其与突触功能相关标志物联合检测,多重标记EVs同时检测,以达到避免获取脑脊液、只通过少量外周体液样本就可以反应中枢神经系统变化的效果。

附图说明

[0022] 图1为血浆EVs携带的候选生物标志物的比例,其中,图1A显示了AChE通路关键候选生物标志物的标记情况,图1B显示了突触功能相关关键候选生物标志物的标记情况,图

中横坐标代表生物标志物的名称;纵坐标代表血浆EVs携带的相关生物标志物的比例与阴性对照IgG的比值。

[0023] 图2为血浆EVs携带的候选生物标志物单独标记的阳性比例,其中,图2A显示了AChE通路关键候选生物标志物的单独标记情况,图1B显示了突触功能相关关键候选生物标志物单独标记情况,图中横坐标代表组别,纵坐标代表血浆EVs携带的相关生物标志物的阳性比例;NC组中,n=5个Pool;AD组中,n=5个Pool,*表示 $p<0.05$;**表示 $p<0.01$,***表示 $p<0.001$ 。

[0024] 图3为血浆EVs携带的候选生物标志物双重标记结果,其中,图3A显示了CHAT与突触功能相关关键候选生物标志物的双重标记情况,图3B显示了CHT1与突触功能相关关键候选生物标志物的双重标记情况,横坐标代表组别;纵坐标代表血浆EVs携带的相关生物标志物的阳性比例,NC组中,n=5个Pool;AD组中,n=5个Pool,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$ 。

[0025] 图4为血浆EVs携带的候选生物标志物双重标记结果,其中图4A显示了CHAT与突触功能相关关键候选生物标志物的双重标记情况,图4B显示了CHT1与突触功能相关关键候选生物标志物的双重标记情况,横坐标代表组别;纵坐标代表血浆EVs携带的相关生物标志物的阳性比例,图4C显示了各整合模型的ROC曲线,NC组中,n=12;AD组中,n=12;MCI组中,n=12,*表示 $p<0.05$;**表示 $p<0.01$ 。

具体实施方式

[0026] 为更好的说明本发明的目的、技术方案和优点,下面将结合具体实施例对本申请作进一步说明。

[0027] 实施例1:用PEG8000沉降富集EVs

[0028] 1.来自受试者的血浆在37℃迅速解冻(2min内),涡旋混匀;

[0029] 2.血浆样品(>300 μ L)在4℃,2,000 \times g条件下离心15min,取上清;

[0030] 3.接着在4℃,12,000 \times g条件下离心30min,取上清;

[0031] 4.吸取10 μ L离心后的血浆至1.5mL离心管中,加入70 μ L PBS和20 μ L 40%PEG8000,充分吹打混匀,室温静置30min;

[0032] 5.12000g,4℃,离心20min;

[0033] 6.弃上清,加入100 μ L PBS重悬,吹打混匀,10 μ L/管进行分装,保存于-80℃备用。

[0034] 实施例2:

[0035] 1.样本封闭

[0036] (1)取10 μ L利用上述方法经PEG8000的EVs至0.6mL离心管;

[0037] (2)加入10 μ L 2%BSA溶液(0.22 μ m滤膜过滤),混匀;

[0038] (3)室温(25-26℃)封闭1小时,以去除非特异性结合;

[0039] (4)加入10 μ L PBS(0.22 μ m滤膜过滤)稀释,终止封闭。

[0040] 2.样本标记

[0041] 利用标记方法标记用于检测生物标志物的抗体。使用的试剂:

[0042] 利用Alexa Fluro荧光标记kit,来标记CHT1、mAChRs M4、CHAT、VAcHT、ACHE以及SV2A、GAP-43、Neurogranin、GluN2B、GluN2C、GluN2D、GluA2、KA1、KA2、VGAT、GAT1、SLC6A12、GABARAP的抗体。其中,标记CHT1、mAChRs M4、CHAT、VAcHT、ACHE抗体的试剂为ZenonTM

Alexa Fluor™ 488 Labeling Kit, 购买自 Thermo Fisher Scientific; 标记 SV2A、GAP-43、Neurogranin、GluN2B、GluN2C、GluN2D、GluA2、KA1、KA2、VGAT、GAT1、SLC6A12、GABARAP 抗体的试剂为 Zenon™ Alexa Fluor™ 647 IgG Labeling Kit, 购买自 Thermo Fisher Scientific。

[0043] 标记步骤如下:

[0044] (1) 取 1 μ g 相应标志物的抗体, 用 PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释至 5 μ L (0.2 μ g/ μ L);

[0045] (2) 加入 5 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ Labeling Kit A 液, 混匀后在室温 (25-26 $^{\circ}$ C) 避光孵育 20min;

[0046] (3) 向 (2) 步骤的溶液中加入 3 μ L (3 μ g) Zenon™ Alexa Fluor™ Labeling Kit B 液 (B 液稀释至 1 μ g/ μ L), 混匀后室温 (25 $^{\circ}$ C) 避光孵育 10min, 以淬灭未结合的游离荧光素;

[0047] (4) 加入 PBS (0.22 μ m 滤膜过滤) 稀释至总体积 50 μ L;

[0048] (5) 取 5 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ 647 Rabbit IgG Labeling Kit 标记的 pTau217 于步骤 1 封闭完毕的样本中, 混匀后室温 (25-26 $^{\circ}$ C) 避光孵育 5min;

[0049] (6) 加入 3 μ L Zenon™ Alexa Fluor™ 488 Rabbit IgG Labeling Kit 标记的 CHAT 或 NR2D 于步骤 (5) 样本中, 混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜;

[0050] 3. 探针孵育

[0051] 使用试剂: DNA anchor, 序列为 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT; 5' 端修饰: 5'-6-CY3; 3' 端修饰: 3'-Cholesteryl。该脂质探针能够与 EVs 膜结合, 探针标记阳性的颗粒被认为是真正的 EVs; 该方法进一步提高了 EVs 标记的科学性和准确度。探针孵育的步骤如下:

[0052] (1) 于 2. 样本标记, 步骤 (6) 4 $^{\circ}$ C 避光孵育过夜的次日, 向体系中加入 62 μ L PBS+5 μ L 脂质探针 (脂质探针工作液浓度 10 μ M) (反应体积 100 μ L, 探针终浓度 500nM), 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h。

[0053] (2) 在标记完毕的样本中加入 100 μ L 4% PFA (0.22 μ m 滤膜过滤), 混匀后室温 (25-26 $^{\circ}$ C) 避光孵育 20min;

[0054] (3) 用 PBS 稀释到合适浓度上机, 标准: 用 CytoFLEX 检测, 每秒颗粒数小于 1 万个颗粒。在脂质探针门下收集 50000 个颗粒。

[0055] 4. 检测

[0056] 使用 CytoFLEX 的 VSSC 模式检测标记阳性比例。

[0057] 实施例 3

[0058] 筛选潜在用于早期阿尔兹海默病及轻度认知功能障碍诊断和鉴别诊断的 AChE 通路关键蛋白和突触功能相关关键蛋白。

[0059] 1. AChE 通路关键候选生物标志物有: CHT1、mAChRs M4、CHAT、VAcHT、ACHE;

[0060] 突触功能相关关键候选生物标志物有: SV2A、GAP43、Neurogranin、GluN2B、GluN2C、GluN2D、GluA2、KA1、KA2、VGAT、GAT1、SLC6A12、GABARAP。

[0061] 2. 在临床 Pool 的血浆样本中, 对上述候选生物标志物进行初步筛选。

[0062] 为确保初筛结果的稳定性和可靠性, 该实施例使用的临床 Pool 血浆样本, 每个 Pool 由 10 例血浆样本混合而成, 以减少个体血浆差异产生的不稳定因素。健康对照组 (NC 组) 包含 5 个 Pool 血浆样本, 阿尔茨海默病受试者 (AD 组) 包含 5 个 Pool 血浆样本。

[0063] 首先, 对血浆 EVs 携带的候选生物标志物的比例和含量进行检测。使用样本为 5 个

Pool1的NC组血浆样本,按照实施例1和2进行实验。

[0064] 结果如图1所示。我们选择血浆EVs携带的相关生物标志物的比例与阴性对照IgG的比值大于2的标志物进行进一步研究,该情况下我们认为EVs携带的相关生物标志物能被可靠地检测。因此,排除ACHE、GluN2B、GABARAP,选择AChE通路关键蛋白:CHT1、mAChRs M4、CHAT、VAcHT;以及突触功能相关关键蛋白:SV2A、GAP43、Neurogranin、GluN2B (NR2B)、GluN2C (NR2C)、GluN2D (NR2D)、GluA2、KA1、KA2、VGAT、GAT1、SLC6A12进行下一步研究。

[0065] 接下来,我们在NC组5个Pool1血浆样本和AD组5个Pool1血浆样本中,按照实施例1和2进行实验。进一步筛选,检测候选生物标志物在NC组和AD组EVs中的阳性颗粒的比例是否存在差异。

[0066] 结果如图2所示。AChE通路关键蛋白:CHT1、mAChRs M4、CHAT、VAcHT。与NC组相比,AD发生时,CHAT和CHT1阳性EVs的比例显著降低;而mAChRs M4和VAcHT阳性EVs的比例在NC组和AD组之间没有显著差异。因此选择AChE通路关键蛋白CHAT和CHT1进行下一步研究。突触功能相关关键蛋白:SV2A、GAP43、Neurogranin、GluN2B (NR2B)、GluN2C (NR2C)、GluN2D (NR2D)、GluA2、KA1、KA2、VGAT、GAT1、SLC6A12。与NC组相比,AD发生时,KA1、KA2、GluN2D (NR2D)、SLC6A12、VGAT、GAP43阳性EVs的比例显著降低;而Neurogranin、GluN2B (NR2B)、GluN2C (NR2C)、GluA2、GAT1、SV2A阳性EVs的比例在NC组和AD组之间没有显著差异。因此选择突触功能相关关键蛋白KA1、KA2、GluN2D (NR2D)、SLC6A12、VGAT、GAP43进行下一步研究。

[0067] AChE通路在AD的早期阶段即发生变化;此外,AD的发生发展过程中也伴随着神经突触功能的损伤。同时检测AChE通路的变化情况和突触功能相关蛋白的变化情况,可能会提升AD早期诊断及与MCI鉴别诊断的灵敏性和特异性。因此接下来,我们进一步对EVs携带的AChE通路关键蛋白和突触功能相关关键蛋白进行组合双重标记,检测相关标志物组合在区分NC组和AD组方面的能力。结果如图3所示,AChE通路候选关键蛋白CHAT、CHT1分别与突触功能相关关键蛋白KA1、KA2、GluN2D (NR2D)、SLC6A12、VGAT、GAP43组合双标,结果稳定,并和单独标记趋势一致。可进行临床队列检测。

[0068] 实施例4

[0069] 在临床样本中检测上述生物标记物的鉴别诊断能力。分别获取年龄、性别匹配的健康对照(NC组)12例、阿尔茨海默病受试者(AD组)12例、轻度认知功能障碍(MCI组)12例的血浆样本,利用上述实施例1、2方法进行实验。

[0070] 利用CytoFLEX的VSSC模式分别检测CHAT、CHT1、KA1、KA2、GluN2D (NR2D)、SLC6A12、VGAT、GAP43单通道荧光标记、CHAT和KA1、CHAT和KA2、CHAT和GluN2D (NR2D)、CHAT和SLC6A12、CHAT和VGAT、CHAT和GAP43、CHT1和KA1、CHT1和KA2、CHT1和GluN2D (NR2D)、CHT1和SLC6A12、CHT1和VGAT、CHT1和GAP43双荧光标记的EVs阳性比例,计算其占脂质探针标记阳性的EVs数量的比例,检测其区分NC、AD、MCI的能力。

[0071] 结果如图4所示。CHAT与突触功能相关蛋白的组合双重标记结果如下,

[0072] 在CHAT与KA1的双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(**, $p < 0.01$);与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例也显著降低(**, $p < 0.01$) (图4A)。与NC组相比,AD组血浆中KA1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$);与MCI组相比,AD组血浆中KA1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例也显著降低(*, $p < 0.05$) (图4A);与NC组相比,血浆中CHAT蛋白和KA1蛋白双阳性EVs

占总EVs数量的比例在AD组中存在下降趋势,但差异没有统计学显著性;与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白和KA1蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著下降(*, $p < 0.05$) (图4A)。

[0073] 在CHAT与KA2双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$);与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4A)。与NC组相比,AD组血浆中KA2蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中KA2蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4A);与NC组相比,血浆中CHAT蛋白和KA2蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中存在下降趋势,但差异没有统计学显著性;与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白和KA2蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例存在下降趋势,但差异没有统计学显著性(图4A)。

[0074] 在CHAT与GluN2D(NR2D)双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$);与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4A)。与NC组相比,AD组血浆中NR2D蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与NC组相比,MCI组血浆中NR2D蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4A);与NC组相比,血浆中CHAT蛋白和NR2D蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中显著降低(*, $p < 0.05$);与NC组相比,MCI组血浆中CHAT蛋白和NR2D蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4A)。

[0075] 在CHAT与SLC6A12双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4A)。与NC组相比,AD组和MCI组血浆中SLC6A12蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例差异均不明显(图4A);与NC组相比,血浆中CHAT蛋白和SLC6A12蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组和MCI组中的变化均不明显(图4A)。

[0076] 在CHAT与VGAT双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4A)。与NC组相比,AD组和MCI组血浆中VGAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例差异均不明显(图4A);与NC组相比,血浆中CHAT蛋白和VGAT蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中存在下降趋势,但差异没有统计学显著性;与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白和VGAT蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例存在下降趋势,但差异没有统计学显著性(图4A)。

[0077] 在CHAT与GAP43双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$);与MCI组相比,AD组血浆中CHAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4A)。与NC组相比,AD组血浆中GAP43蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(**, $p < 0.01$);与NC组相比,MCI组血浆中GAP43蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4A);与NC组相比,血浆中CHAT蛋白和GAP43蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中显著降低(**, $p < 0.01$);与NC组相比,MCI组血浆中CHAT蛋白和GAP43蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(**, $p < 0.01$) (图4A)。

[0078] CHT1与突触功能相关蛋白的组合双重标记结果如下,

[0079] 在CHT1与KA1的双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数

量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) ;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例存在下降趋势,但差异没有统计学显著性(图4B)。与NC组相比,AD组血浆中KA1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(**, $p < 0.01$) ;与MCI组相比,AD组血浆中KA1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例存在下降趋势,但差异没有统计学显著性(图4B) ;与NC组相比,血浆中CHT1蛋白和KA1蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中显著降低(**, $p < 0.01$) ;与NC组相比,MCI组血浆中CHT1蛋白和KA1蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著下降(*, $p < 0.05$) (图4B)。

[0080] 在CHT1与KA2双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) ;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4B)。与NC组相比,AD组血浆中KA2蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) ;与MCI组相比,AD组血浆中KA2蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4B) ;与NC组相比,血浆中CHT1蛋白和KA2蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中显著降低(**, $p < 0.01$) ;与NC组相比,MCI组血浆中CHT1蛋白和KA2蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4B)。

[0081] 在CHT1与NR2D双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4B)。与NC组相比,AD组血浆中NR2D蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中NR2D蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4B) ;与NC组相比,血浆中CHT1蛋白和NR2D蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白和NR2D蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4B)。

[0082] 在CHT1与SLC6A12双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) ;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4B)。与NC组相比,AD组和MCI组血浆中SLC6A12蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例差异均不明显(图4B) ;与NC组相比,AD组血浆中CHT1蛋白和SLC6A12蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) ;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白和SLC6A12蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) (图4B)。

[0083] 在CHT1与VGAT双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例显著降低(*, $p < 0.05$) ;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4B)。与NC组相比,AD组和MCI组血浆中VGAT蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例差异均不明显(图4B) ;与NC组相比,血浆中CHT1蛋白和VGAT蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中存在下降趋势,但差异没有统计学显著性;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白和VGAT蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例存在下降趋势,但差异没有统计学显著性(图4B)。

[0084] 在CHT1与GAP43双重标记时,与NC组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中CHT1蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4B)。与NC组相比,AD组血浆中GAP43蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血

浆中GAP43蛋白阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4B);与NC组相比,血浆中CHAT1蛋白和GAP43蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例在AD组中有下降趋势,但未达到统计学差异;与MCI组相比,AD组血浆中CHAT1蛋白和GAP43蛋白双阳性EVs占总EVs数量的比例有下降趋势,但未达到统计学差异(图4B)。

[0085] 基于以上结果,使用逻辑回归分析Enter方法纳入年龄(Age)和相关分析指标,建立整合模型,通过受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析进行诊断效率评估,得到的各组ROC曲线下面积(area under curve, AUC)如表1所示。

[0086] 表1各整合模型的ROC曲线下面积

Integrated Model	NC VS MCI (AUC)	NC VS AD (AUC)	AD VS MCI (AUC)
CHAT+GAP43 CHAT1+GAP43 Age	0.965	0.979	0.757
CHAT1+KA1 CHAT1+KA2 Age	0.944	0.98	0.689
CHAT+NR2D CHAT1+NR2D Age	0.958	0.875	0.861
CHAT1+KA2 CHAT+KA2 Age	0.944	0.939	0.652
CHAT1+KA1 CHAT+KA1 Age	0.840	0.879	0.614
CHAT+KA1 CHAT+KA2 Age	0.800	0.795	0.636
CHAT+VGAT CHAT1+VGAT Age	0.764	0.713	0.601
CHAT+SLC6A12 CHAT1+SLC6A12 Age	0.735	0.702	0.624

[0088] 注:ROC:受试者工作特征曲线;AUC:曲线下面积;NC:健康对照;AD:阿尔兹海默病;MCI:轻度认知功能障碍。

[0089] 根据表1可知,使用逻辑回归分析Enter方法纳入Age、CHAT1+KA1和CHAT1+KA2双重标记数据,AUC=0.98(NC VS AD);AUC=0.944(NC VS MCI);AUC=0.689(AD VS MCI)(图4C);使用逻辑回归分析Enter方法纳入Age、CHAT+NR2D和CHAT1+NR2D双重标记数据,AUC=0.875(NC VS AD);AUC=0.958(NC VS MCI);AUC=0.861(AD VS MCI)(图4C);使用逻辑回归分析Enter方法纳入Age、CHAT+GAP43和CHAT1+GAP43双重标记数据,AUC=0.979(NC VS AD);AUC=0.965(NC VS MCI);AUC=0.757(AD VS MCI)(图4C);使用逻辑回归分析Enter方法纳入Age、CHAT+KA2和CHAT1+KA2双重标记数据,AUC=0.939(NC VS AD);AUC=0.944(NC VS

MCI); $AUC=0.652$ (AD VS MCI) (图4C)。

[0090] 综上所述,我们基于AD和MCI发病的机制(即,AChE通路在AD的早期阶段即发生变化;此外,AD的发生发展过程中也伴随着神经突触功能的损伤),同时在血浆EVs中检测AChE通路的变化情况和突触功能相关蛋白的变化情况,并得到了几组效果显著的标志物组合:(1) Age、CHT1+KA1和CHT1+KA2双阳性EVs占总EVs数量的比例;(2) Age、CHAT+NR2D和CHT1+NR2D双阳性EVs占总EVs数量的比例;(3) Age、CHAT+GAP43和CHT1+GAP43双阳性EVs占总EVs数量的比例;(4) Age、CHAT+KA2和CHT1+KA2双阳性EVs占总EVs数量的比例;依靠上述标志物组合,不仅能够很好地区分NC和AD患者;也能有效区分NC和MCI。其中, Age、CHAT+NR2D和CHT1+NR2D双阳性EVs占总EVs数量的比例的组合,在区分NC和AD患者、NC和MCI患者的同时,也能实现AD和MCI的区分。

[0091] 简言之,我们的基于血浆EVs的该项研究为实现MCI的早期筛查和AD的早期精准诊断提供了高效快速的手段,具有较高的转化前景和应用价值。

[0092] 最后所应当说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制,尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

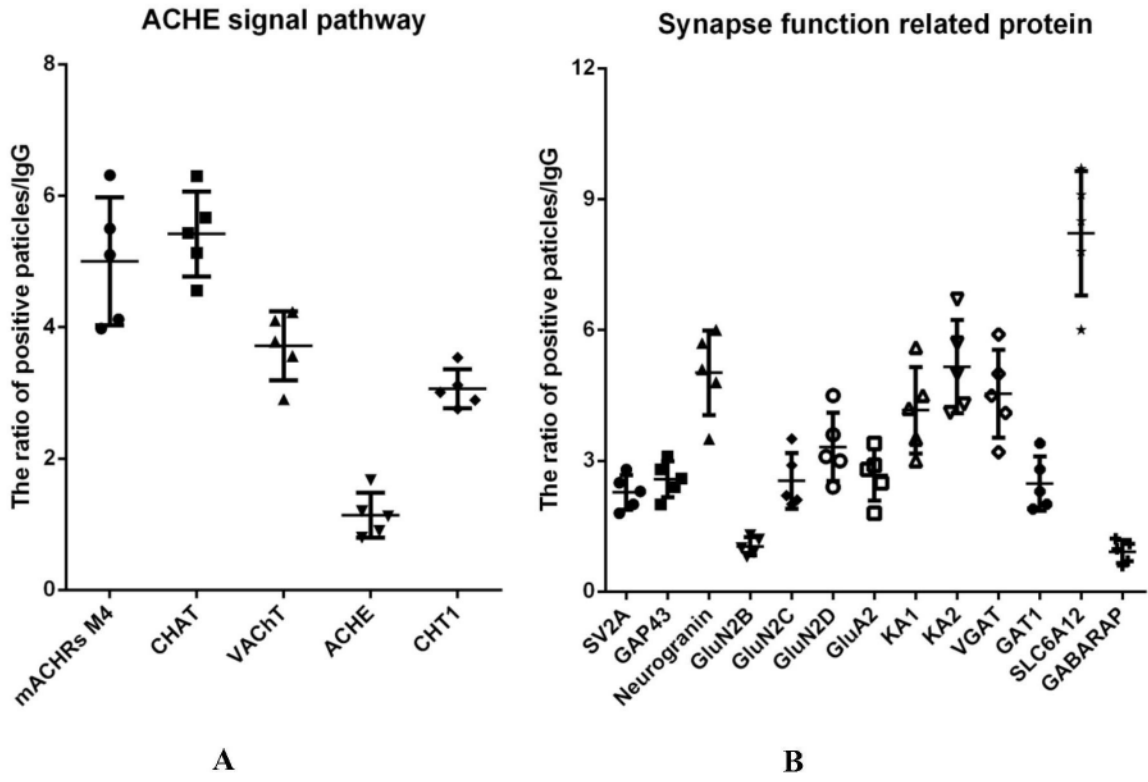
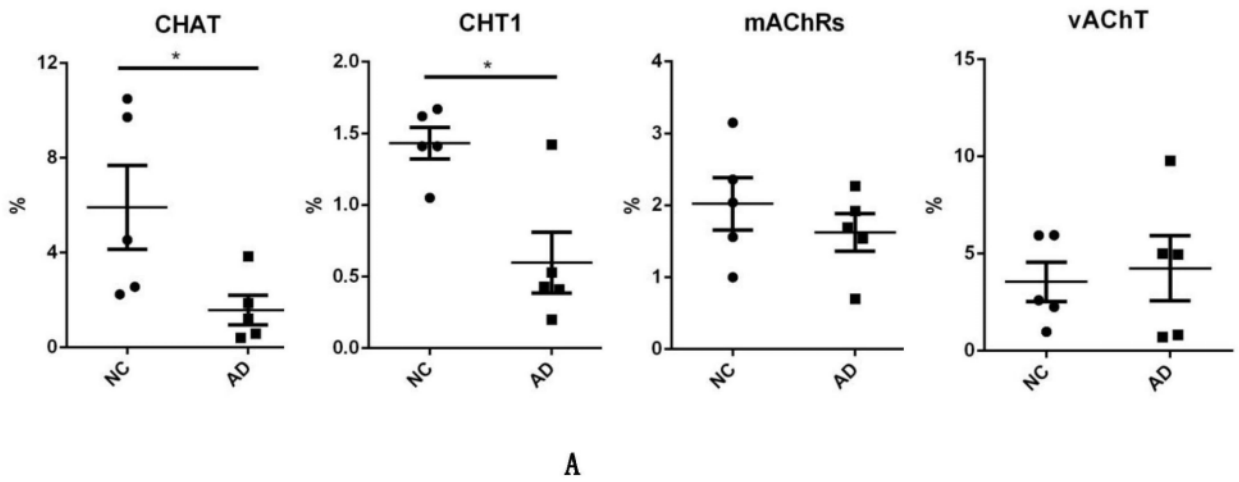
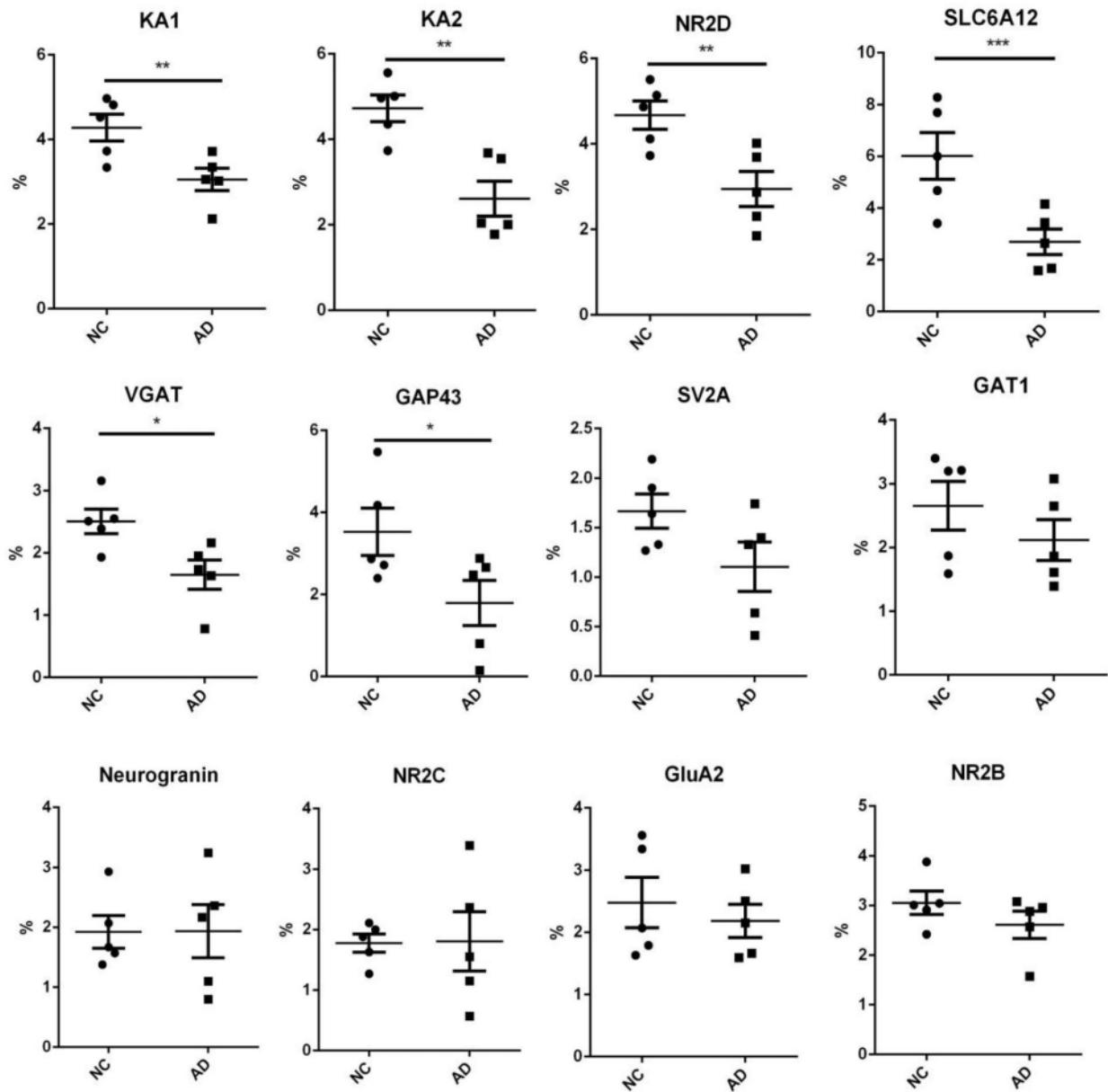


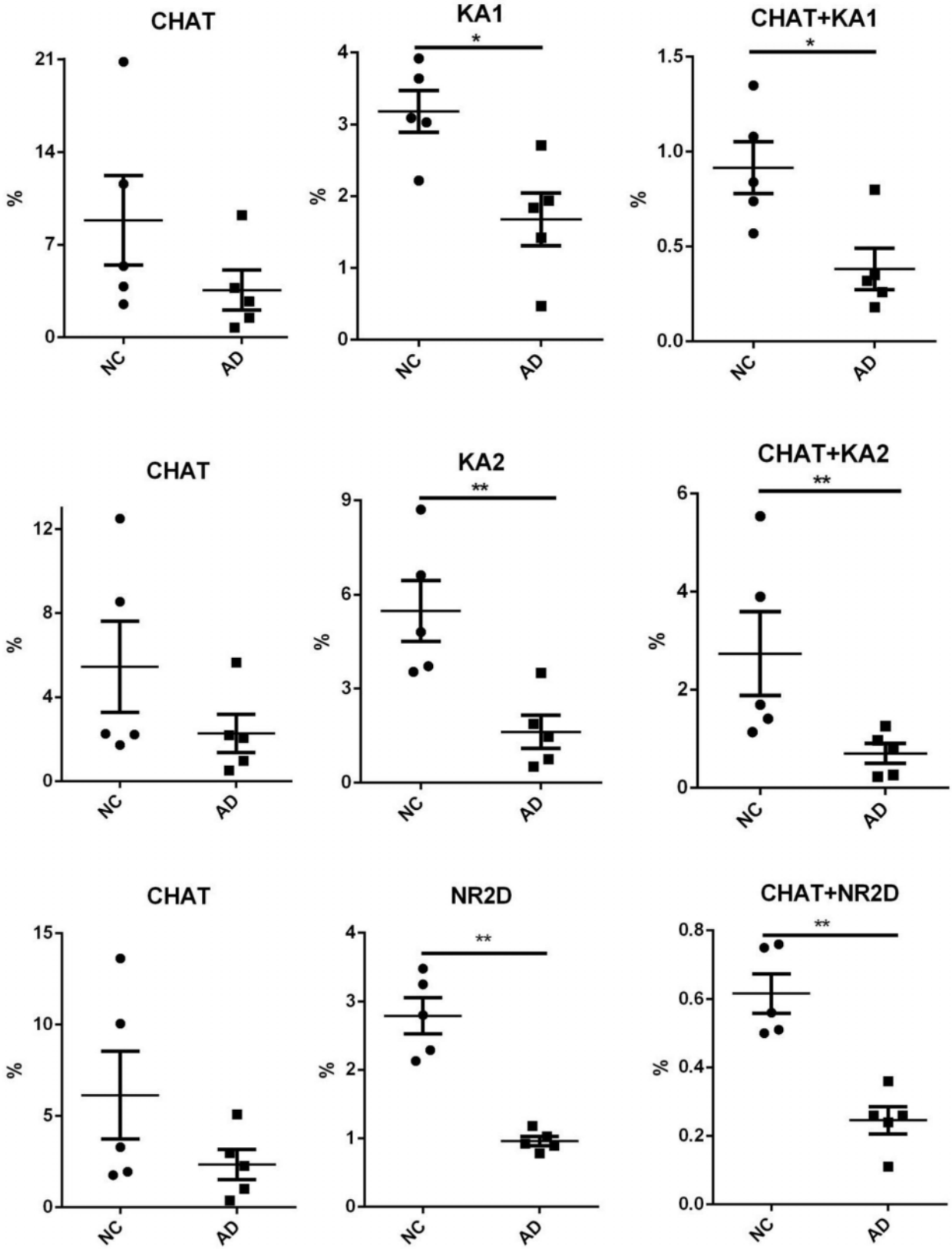
图1

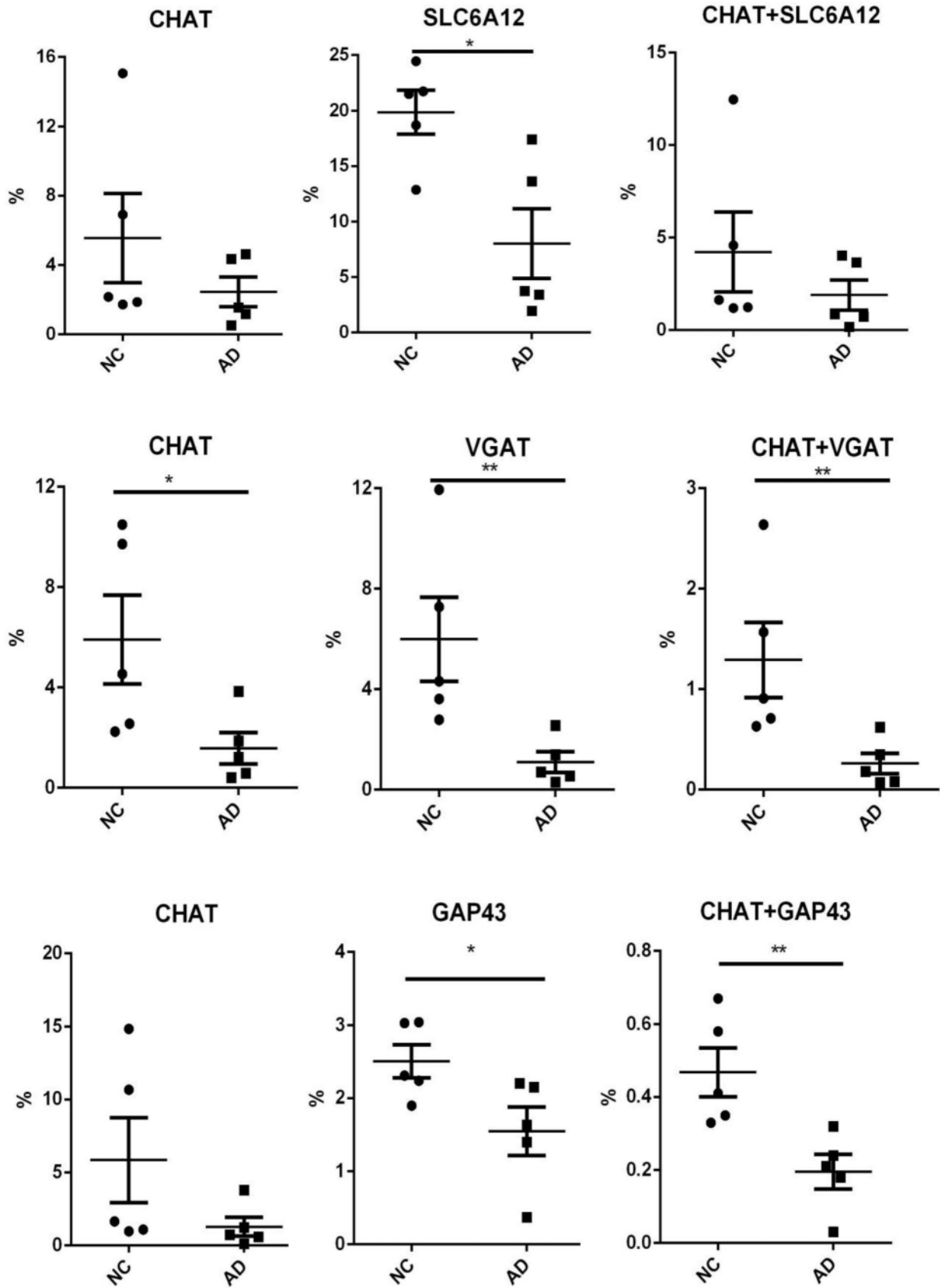


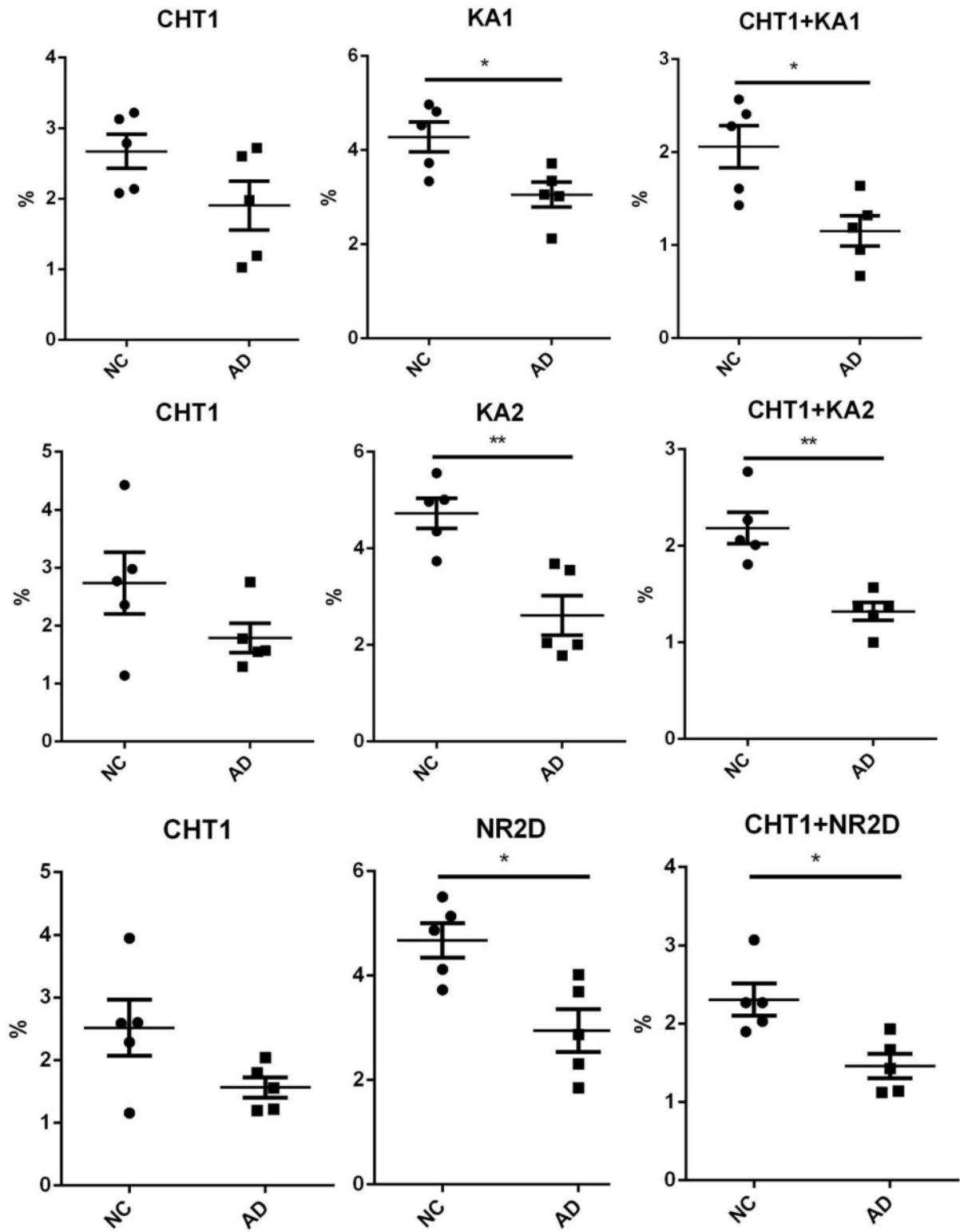


B

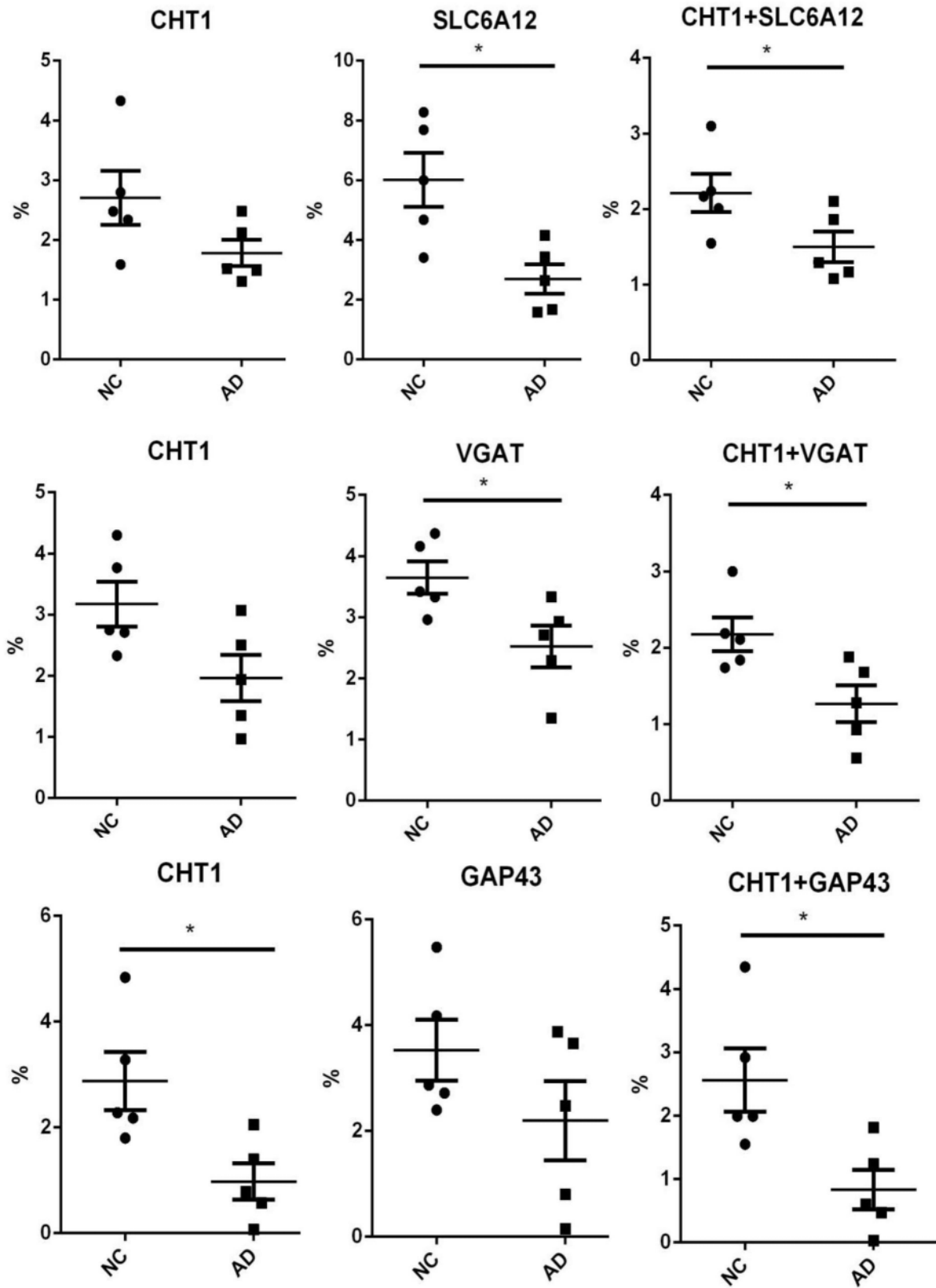
图2





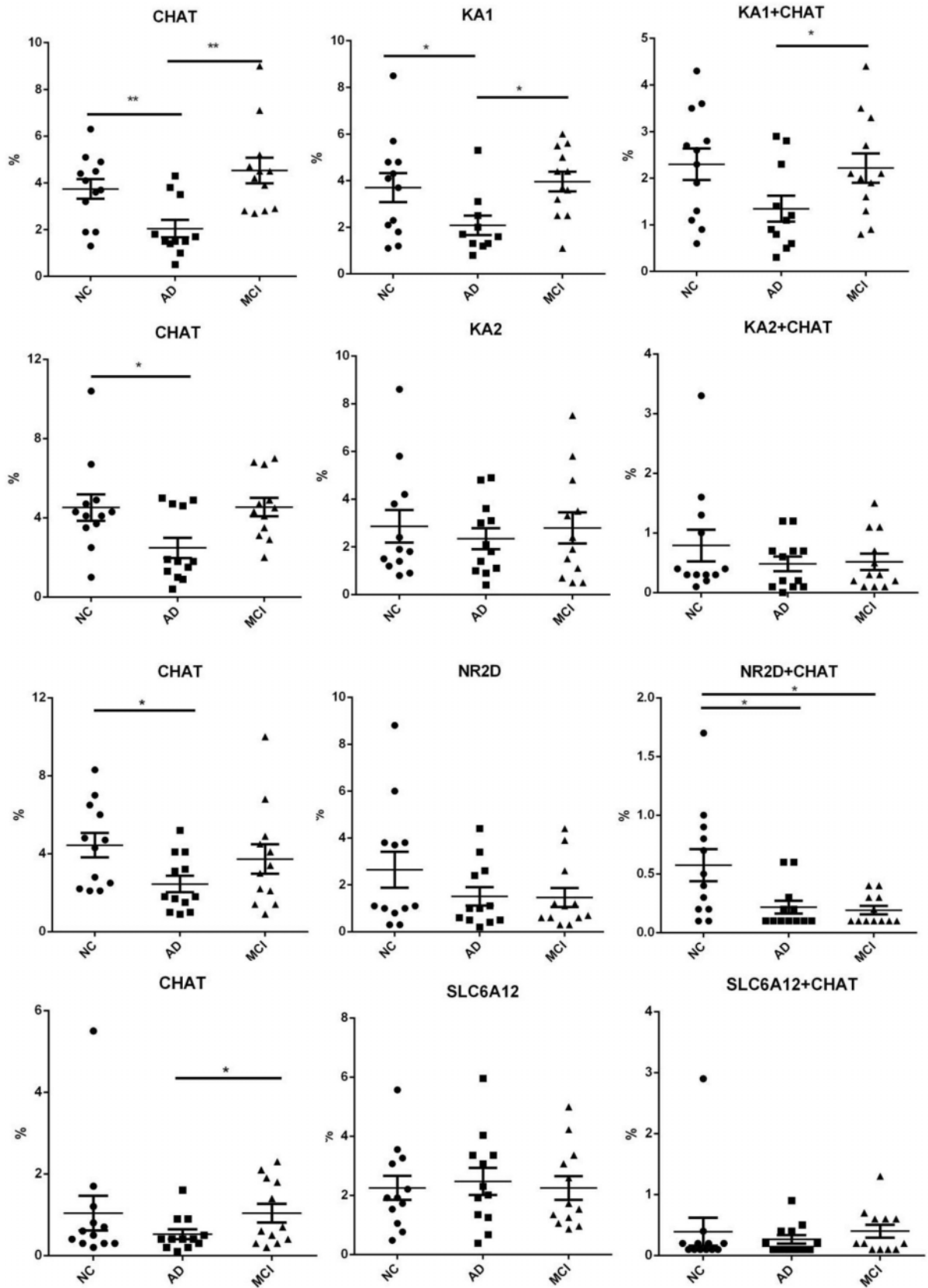


A

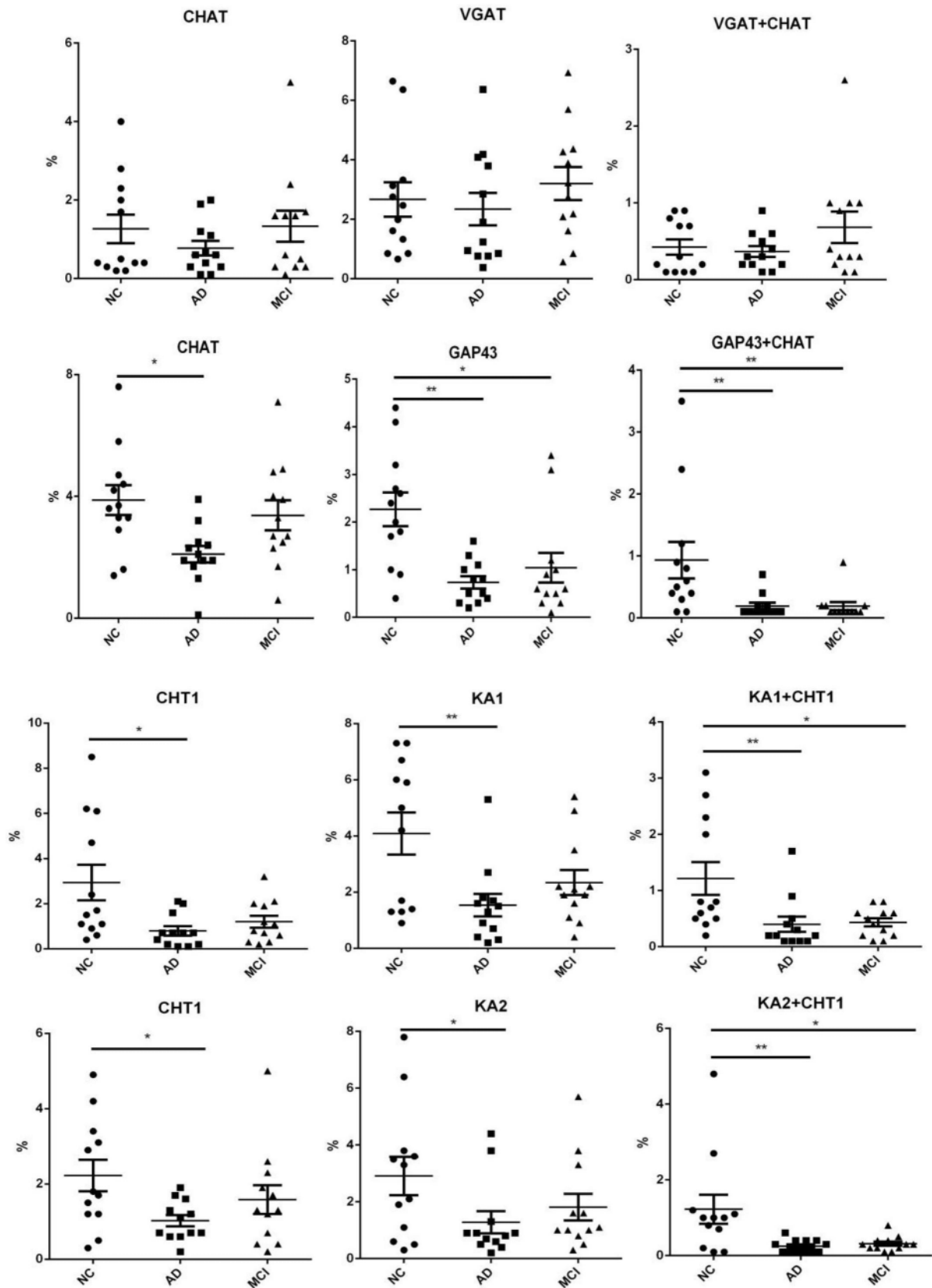


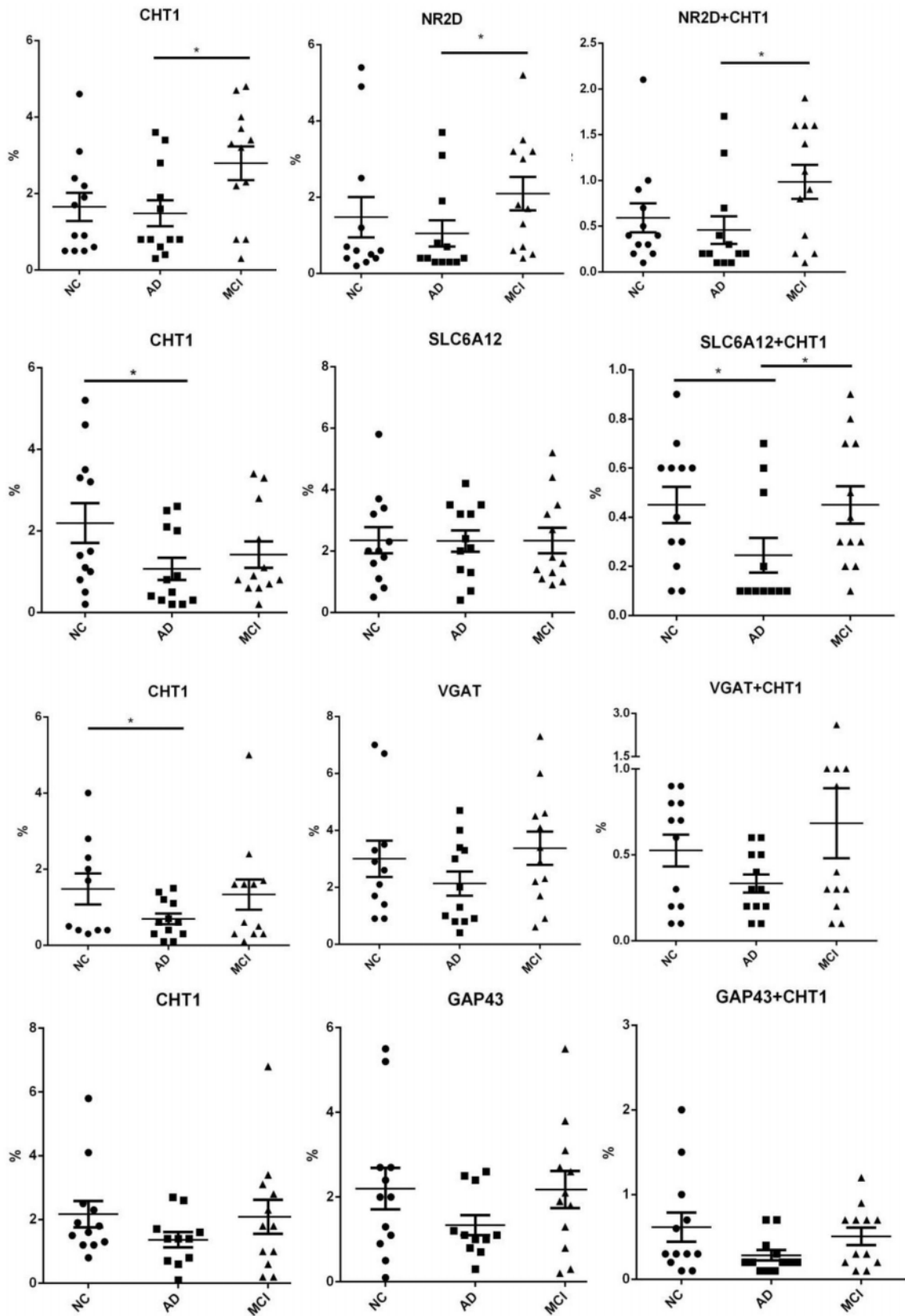
B

图3

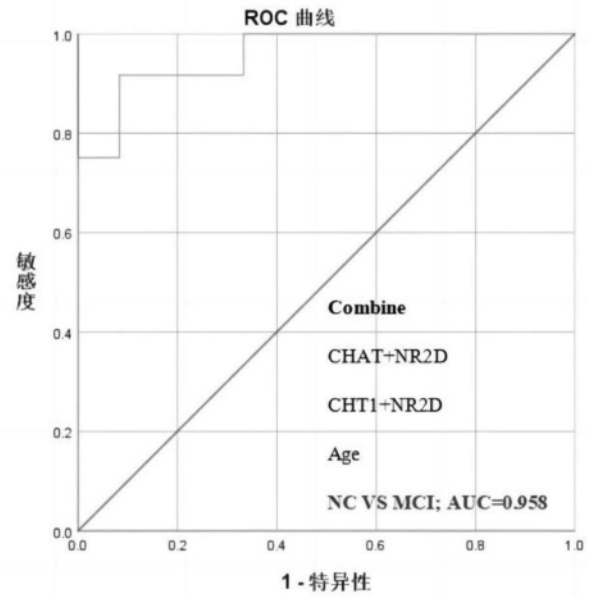
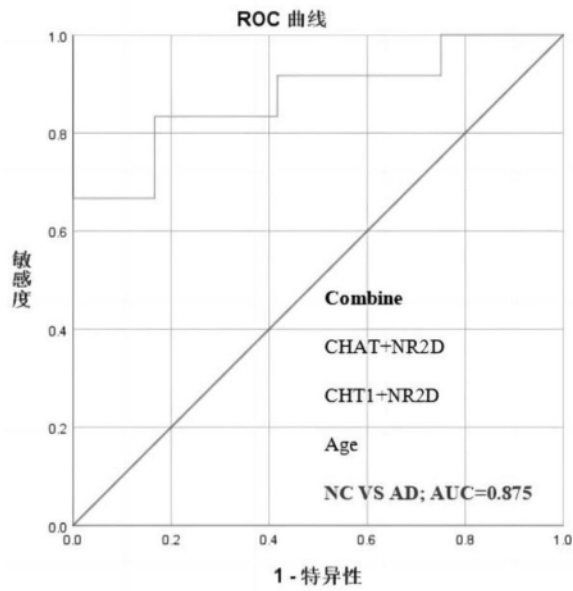
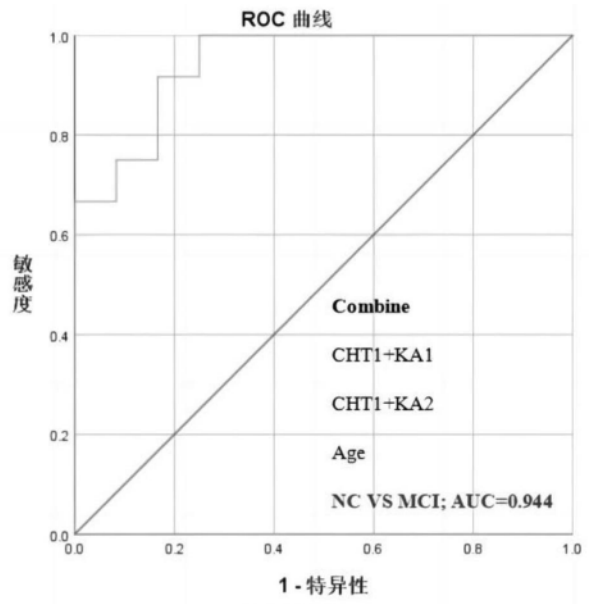
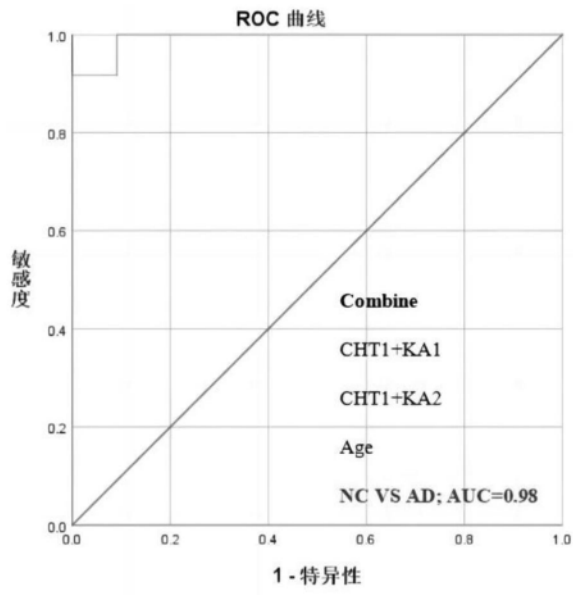


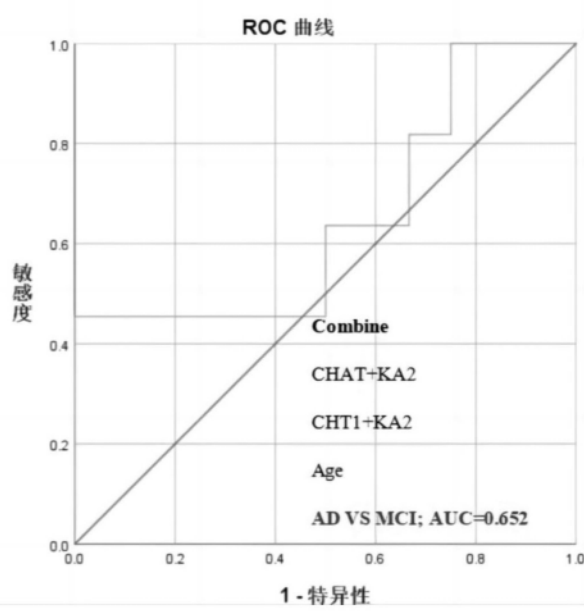
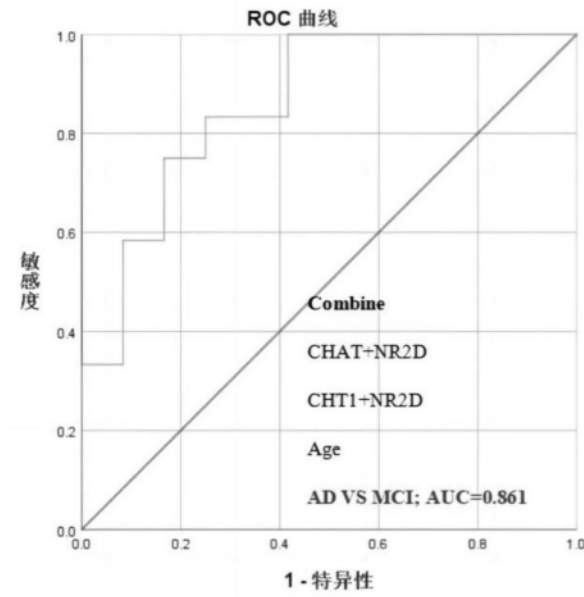
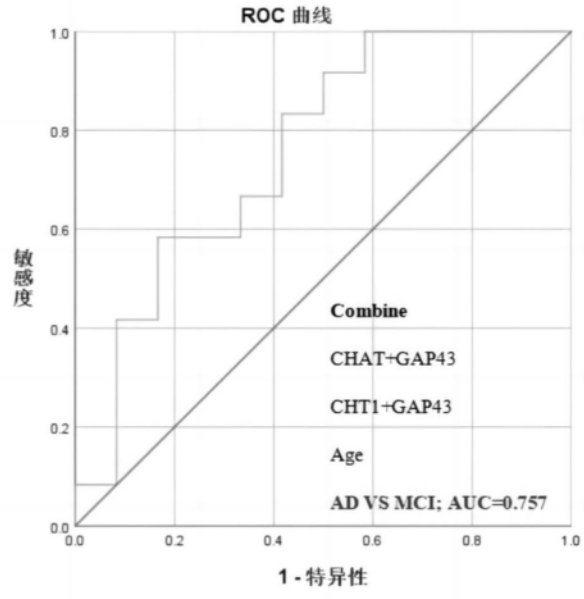
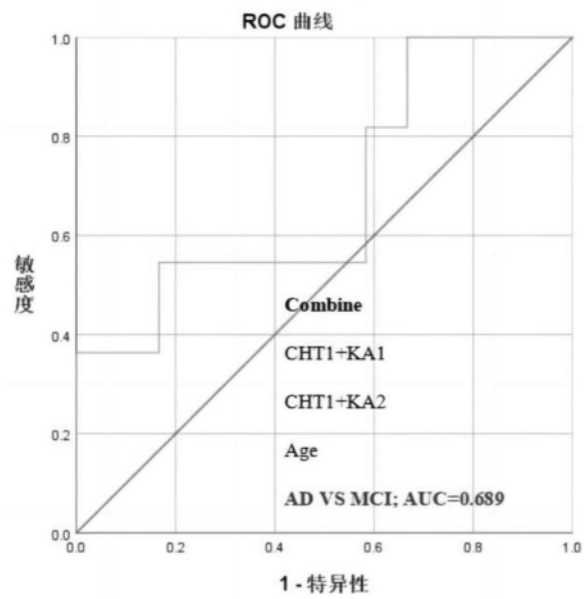
A

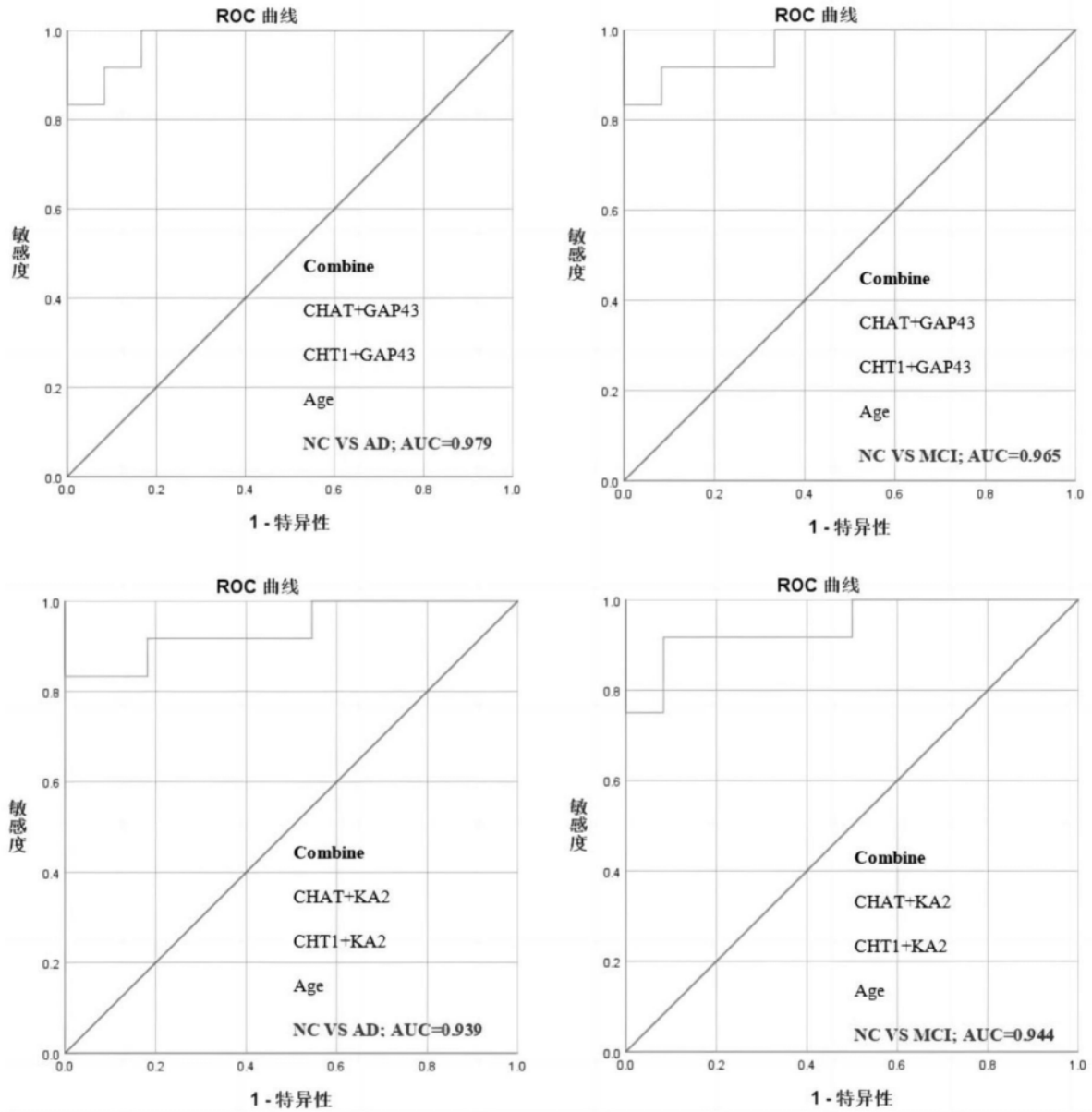




B







C

图4