

· 一切为了人民健康——我们这十年专栏 ·

## 笃行致远, 磨剑十年

### ——我国阿尔茨海默病早期筛查中的尿液生物标志物研究进展

王蓉 何静

100053 北京, 首都医科大学宣武医院中心实验室(王蓉、何静); 100053 北京市老年病医疗研究中心(王蓉); 100053 北京脑重大疾病研究院(王蓉)

通信作者: 王蓉, Email: rong\_wang72@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2022.10.001

**【摘要】** 随着人口老龄化程度的不断加剧, 阿尔茨海默病(AD)的患病人数逐年增加, 早筛查、早发现、早干预已经成为防治AD的策略和共识, 所以对于无创性外周生物标志物的研究尤为重要。现主要回顾和总结了近10年来国内学者在AD尿液生物标志物方面的研究进展, 参考文献中的研究结论, 绝大部分来源于对人尿液标本的检测和观察, 提示应重视无创性外周生物标志物的探索和应用, 为疾病的早期诊断和早期干预提供新视角和新思路。

**【关键词】** 阿尔茨海默病; 无创性生物标志物; 尿液

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFA0108503); 首都卫生发展科研专项(首发2020-2Z-1034)

#### **Study on urine biomarkers in early screening of Alzheimer disease in China** Wang Rong, He Jing

Department of Central Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China (Wang R, He J); Beijing Geriatric Medical Research Center, Beijing 100053, China (Wang R); Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100053, China (Wang R)

Corresponding author: Wang Rong, Email: rong\_wang72@aliyun.com

**【Abstract】** With the increasing aging of the population, the number of patients with Alzheimer disease (AD) is growing year by year. Early screening, early detection and early intervention have become the strategy and consensus for the prevention and treatment of AD, so the research on noninvasive peripheral biomarkers is particularly important. This article mainly reviews and summarizes the research progress of domestic scholars on urine biomarkers of AD in the past decade. Most of the research findings in the references come from the detection and observation of human urine samples. It suggests that we should pay attention to the exploration and application of noninvasive peripheral biomarkers, which provide a new perspective as well as new ideas for the early diagnosis and early intervention of diseases.

**【Key words】** Alzheimer disease; Non-invasive biomarkers; Urine

**Fund programs:** National Key R&D Program of China (2018YFA0108503); Capital Health Research and Development of Special (2020-2Z-1034)

人口老龄化是21世纪的我们共同面临的挑战。2020年第7次全国人口普查显示, 全国人口共14.12亿人, 其中65岁及以上人口1.9亿, 占13.5%; 与2010年第6次全国人口普查相比, 65岁及以上人口的比重上升4.63个百分点<sup>[1]</sup>。在北京, 人口老龄化问题同样不可忽视, 2020年北京市老龄事业发展报告(北京市老龄工作委员会办公室、北京市老龄协会和北京师范大学中国公益研究院联合发布)指出, 截至2020年末, 北京市常住总人口2 189万人, 其中

65岁及以上常住人口从5年前的252.6万人上升到291.2万人, 增长38.6万人; 占常住总人口的比例从11.5%上升到13.3%<sup>[2]</sup>。根据联合国《人口老龄化及其社会经济后果》报告中提出的老龄化定义, 当一个国家或地区65岁及以上老年人口数量占总人口比例超过7%时, 则表明这个国家或地区进入老龄化<sup>[3]</sup>。早在2006年, 全国老龄工作委员会办公室就首次发布了《中国人口老龄化发展趋势预测报告》<sup>[4]</sup>, 指出中国已于1999年进入老龄化社会, 并且是世界

上老年人口最多的国家。我国的人口老龄化具有以下特点:(1)人口规模大;(2)发展迅速,有专家预计,到2050年我国老龄人口将达到总人口数的1/3,进入重度老龄化社会。(3)“未富先老”,在我们目前经济条件下,老龄化社会的提前到来必然会增加解决养老问题的难度。

伴随着老龄化程度的不断加剧,与增龄相关的老年患病率呈现逐年增加趋势,AD就是其中具有典型代表意义的疾病。AD是一种以认知功能障碍为主要表现的神经系统退行性疾病,据报道,我国65岁以上人群中AD的患病率为3.21%,截至2019年,中国已有超过1 000万的AD患者,居世界首位<sup>[5-6]</sup>。AD患病率随年龄的增加而增加,85岁以上人群达到30%~40%。AD起病隐匿,早期不易被发现,多以学习记忆功能下降为首发症状;病程进行性加重,一旦进入中晚期则无法逆转;除5%左右的患者具有家族遗传史外,大多数病例属于原因不清的散发性AD。

虽然AD的发病机制尚不清楚,但是关于AD的危险因素一直备受关注。2020年有研究基于2017年报告中9个已知危险因素(受教育程度低、高血压、听力障碍、吸烟、肥胖、抑郁、体力活动不足、糖尿病、缺乏社交活动),又报道了3个新的危险因素,分别为过量饮酒、头部受伤、空气污染,并特别指出,在群体层面有意识地避免这些危险因素有可能预防或延缓大约40%的痴呆发生<sup>[7]</sup>。1906年德国的阿尔茨海默医生发现第1例AD患者时,就确定了AD的两大主要病理特征,即细胞外 $\beta$ 淀粉样肽(amyloid- $\beta$  peptide, A $\beta$ )沉积形成的老年斑(senile plaque)和细胞内过度磷酸化的tau蛋白形成的神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)<sup>[8]</sup>。近年来,越来越多的研究显示,AD的病理变化在AD症状之前的10年,甚至20年,已经在脑内悄然出现<sup>[9-10]</sup>,这一发现提示AD的病理变化和症状出现之间存在着10~20年的“窗口期”,而此阶段正是早期筛查、早期干预的最佳时期,尤其是处在危险因素之中的人群。加强对AD的早期认识,改善不健康的生活方式,有效地防止或减缓神经元退变对于提高老年期的认知功能、保证晚年生活质量具有重要意义。

那么,通过何种方法早期发现神经元退行性改变呢?寻找外周生物标志物对于解决上述问题尤为重要。生物标志物是一种可供客观测量的生化指标,可以用于评价机体的病生理过程或治疗过程中的某种特征,以便获知机体所处的生物学状态。获得生

物标志物的常见来源有血液、尿液、粪便、脑脊液、腹水、胸水、唾液、汗液、皮肤组织、口腔黏膜、活检穿刺组织、术中标本等。本文着重叙述近10年国内学者在AD等神经系统疾病中对尿液中无创性生物标志物检测所做的研究和探索。

### 一、尿液中是否存在生物标志物?

尿液是唯一可以大量收集的排泄出人体的液体,并且对被检测人没有任何伤害。尿液看似是机体排出的废物,其实含有大量有研究价值的信息,不仅可以反映泌尿系统变化,也能反映其他器官的病理生理状态。高友鹤教授课题组的研究指出,“健康人尿液中的蛋白质含量较低,但是种类却十分丰富,可能是机体不需要的废弃物,也可能是会对机体产生毒害作用而必须被排出。相较于小分子代谢物而言,蛋白质的结构复杂、功能多样,即使分子水平上的一个小的改变都会影响其后续的生物功能。”<sup>[11]</sup>其研究揭示了血浆和尿液中的蛋白质在蛋白质组修饰方面的差异,并认为可能由于蛋白质分子修饰的差异造成了其结构不可逆的改变,进而使得失去功能或者有毒的蛋白质经血液被排进尿液中。该课题组发表了多篇文章及综述<sup>[12-13]</sup>,深入探讨了常见生理条件,如性别、年龄、饮食、每日节律、运动、激素状态、生活方式和极端环境等对人体尿液中蛋白质成分和含量的影响。

那么,从尿液中寻找外周生物标志物具有哪些优势呢?高友鹤教授在给《中国科学》编者的一封信中谈到,机体中所有细胞的生存和发挥作用都依赖于一个稳态的微环境,而血液作为影响内环境的关键因素,只有本身保持平衡和稳定的状态才能使所有组织和器官免受干扰因素的影响<sup>[14]</sup>。与此相反的是,尿液作为血液的滤过液,并不需要稳态机制,血液中出现的变化通过肝、肾和(或)其他器官代谢或滤过排出,以便维持机体内环境的稳定性;换言之,尿液是血液中大多数废物排泄的地方,在这些看似“废物”的物质中,恰恰隐藏着被机体排出的各种变化,所以尿液是被大家忽略的、可以挖掘外周生物标志物的“金矿”,同时提出以下建议<sup>[15]</sup>:(1)健康人群中尿蛋白表达的自然变化可作为参考,以帮助确定由疾病引起的蛋白质丰度变化,而不是由个体变化或生理变化引起;(2)比较尿液和血浆中的蛋白质表达水平可以促进生物标志物的发现;(3)建立收集数据的共享平台,整合所有尿液生物标志物研究的结果,有助于促进尿液蛋白质组学的发展,并为实现个性化医疗服务做出贡献。为了对尿样本进行长

期存储和归档,高教授课题组发明了尿膜的制作方法<sup>[16]</sup>,将尿蛋白质固定在一片特殊的纸膜上,干燥后储存在真空袋中。这种简单、经济、实用的方法能够长期保存尿蛋白质,提供用于解码生物信息的资源。

1982年发表第1篇双向电泳分离鉴定尿蛋白的蛋白质组学文章<sup>[17]</sup>之后,在尿液中发现的蛋白质种类逐渐增多,而且1/3的尿蛋白并非来源于泌尿系统。那么,尿液中有可能出现关于神经系统疾病的生物标志物吗?根据前面提到的“内环境稳态变化”的理念,高教授团队认为,脑脊液较血液更具有稳定性,而尿液没有稳定状态,是一个理想的早期搜寻复杂慢性脑疾病生物标志物的场所,特别是脑脊液或血液中无法捕捉到的早期变化<sup>[18]</sup>;该课题组还综述了在神经系统疾病中尿液生物标志物的变化<sup>[19]</sup>,包括神经精神障碍性疾病(重度抑郁症、双相情感障碍、自闭症、精神分裂症)、脑血管疾病(脑卒中)、神经退行性疾病(AD、PD)、多发性硬化、传染性海绵状脑病、神经内分泌肿瘤和创伤性脑损伤。

## 二、尿液中与AD相关的生物标志物

1. AD相关的神经丝蛋白AD7c-NTP(Alzheimer-associated No.7 clone-neuronal thread protein):本课题组自2003年开始进行AD的尿液生物标志物AD7c-NTP研究,同时进行AD7c-NTP ELISA检测试剂盒的研发,2011年获得国家专利授权(人AD7c-NTP抗原决定簇多肽、抗体及其在诊断试剂盒上的应用,200710125584.5),同年获得中华人民共和国医疗器械注册证书,2013年参与获得国家科技进步二等奖(痴呆与轻度认知障碍的流行病学、发病机制和诊治的应用研究,2013-J-233301-02),并进入医疗机构临床检验目录,目前在全国14个省市取得收费标准。近10年,本课题组发表AD7c-NTP相关的SCI论文10余篇,下面对研究结果做简要总结:(1)首先对AD7c-NTP ELISA检测试剂盒进行临床小样本试验验证<sup>[20]</sup>。收集神经内科门诊根据AD的ICD-10诊断标准确诊的121例AD患者作为AD组,118名体检中心健康体检者作为对照组,两组的年龄比较差异无统计学意义。留取清晨空腹中段尿液1 ml,置4℃保存待检。采用自建的ELISA方法检测AD7c-NTP水平,结果显示,AD组为2.25(0.43~8.62)ng/ml,高于健康对照组的0.82(0.47~2.77)ng/ml( $P < 0.0001$ );检测的敏感度为89.3%,特异度为84.7%。(2)为了方便临床中留取尿标本,对样本的留取时间进行了研究<sup>[21]</sup>,连续5 d收集20人的晨尿、上午尿、下午尿

各1次,结果20人中有19人在不同时间点的检测水平比较差异无统计学意义,因此在进行尿AD7c-NTP检查时,可以在门诊随机留取患者的尿液标本,如果出现异常/临界值,建议留取晨尿复查,这样可以极大地方便临床应用。(3)针对尿液样本的保存条件问题,课题组进行了如下试验<sup>[21]</sup>,分别采用无处理、硼酸和碳酸氢钠处理样本4℃保存后检测,结果显示,不添加防腐剂组在第3天出现检测结果异常,添加硼酸组5 d内检测结果保持稳定,添加碳酸氢钠使检测结果异常增高,所以建议尿标本及时检测,若不能及时送检,需添加硼酸做防腐剂,并于1周内检测。另外,重要的试验结果提示,由于冷冻储存可使检测结果明显偏离正常值,做尿AD7c-NTP检测时严禁将尿液冷冻。(4)本课题组研发的尿AD7c-NTP ELISA检测试剂盒是国内首个进入市场的产品,为了得到尿AD7c-NTP在不同年龄段中的水平,课题组收集了体检中心不同年龄段的尿液标本进行了双盲试验,结果见表1<sup>[22]</sup>。尿AD7c-NTP水平具有随年龄增加的特点,提示此指标有可能在人群中作为脑健康筛查的指标之一,即如果检查结果高于所在年龄段的正常值,且具备发生AD的危险因素时,应该进行更加全面的认知功能检查。(5)与尿AD7c-NTP相关的其他因素<sup>[23-24]</sup>。通过2180人的流行病学调查显示,在女性中的检测水平略高于男性(与女性的患病率高于男性一致),在低教育程度和无配偶人群中的检测水平略高于对照组,与糖化血红蛋白、胰岛素和甘油三酯水平呈正相关,有冠心病史和糖尿病史的受试者的检测水平高于对照组;对329名受试者的研究取得了最重要的发现<sup>[25]</sup>,即携带ApoEε4等位基因者的尿AD7c-NTP水平高于未携带ApoEε4等位基因者。以上结果提示,尿AD7c-NTP水平与AD的某些危险因素呈正相关,有可能成为早期预警的指标之一,特别是与ApoEε4等位基因联检能够为临床前期筛查提供简便无创的外周生物学标志物。

表1 尿液AD7c-NTP在不同年龄组受试者中的水平(ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

年龄(岁)	例数	AD7c-NTP	F值	P值
20~29	64	0.301 ± 0.137		
30~39	56	0.370 ± 0.142		
40~49	66	0.391 ± 0.144	6.181	<0.001
50~59	57	0.484 ± 0.191		
≥60	51	0.588 ± 0.164		

注:AD7c-NTP 阿尔茨海默病相关的神经丝蛋白

2. 甲醛及相关代谢酶: 赫荣乔教授团队长期研究甲醛与衰老的关系, 认为甲醛代谢失调, 内源甲醛水平升高可以引起神经 tau 蛋白的异常修饰和错误折叠<sup>[26-27]</sup>, 导致表观遗传等方面的改变<sup>[28]</sup>, 同时内源甲醛水平也与 ApoE4 携带相关<sup>[29]</sup>, 这些特点与 AD 的病理过程具有一定的关联。尿液是体内甲醛排出的主要途径之一, 尿甲醛的含量可能代表 AD 的外周标志物<sup>[30-31]</sup>。课题组选择了 65 岁以上的 AD 患者、血管性痴呆患者和正常对照组老人, 采用荧光高效液相色谱进行清晨中段尿的甲醛检测, 结果显示 AD 组和血管性痴呆组的尿甲醛水平明显高于健康对照组<sup>[32-33]</sup>。为了探究尿甲醛升高的机制, 其收集了 AD 患者、卒中后认知障碍患者和性别、年龄匹配的健康对照组, 分别采用 ELISA 方法和高效液相色谱(HPLC)分析检测血液和尿液中氨基脲敏感的单胺氧化酶(semicarbazide-sensitive amine oxidase, SSAO, 一种甲醛生成酶)和甲醛水平, 结果表明, 尿甲醛水平增加是由于血液中 SSAO 的过度表达以及蛋白质、DNA、RNA 等脱甲基化所致, 提示测量夜间空腹尿液中的甲醛浓度可能作为一种潜在的无创方法用于评估发生认知障碍或痴呆的可能性<sup>[34]</sup>。

3. 尿液中其他可能的生物标志物: (1) 尿外泌体中 A $\beta$  1-42 和 P-S396-tau。张杰文教授和江海松教授团队检测了 30 例 AD 患者尿外泌体中的 A $\beta$  1-42 和 P-S396-tau 水平, 与年龄和性别匹配的 30 名健康受试者相比, AD 患者尿外泌体中的上述 2 个指标水平升高。尿液中提取的外泌体在透射电镜下呈环形, 通过纳米粒子跟踪分析观察发现, 与健康受试者相比, AD 患者的尿液外泌体数量更多, 外泌体体积更大。这些差异支持尿外泌体是早期 AD 诊断标志物潜在来源的论点<sup>[35]</sup>。(2) 尿 MCP-1。王延江教授团队观察了尿液单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 在 AD 患者、遗忘性轻度认知障碍(amnesic mild cognitive impairment, aMCI) 患者和认知正常对照组中的水平。在不同年龄的正常受试者队列中, 尿 MCP-1 水平随年龄增加而升高, 并与年龄相关; 女性尿 MCP-1 水平高于男性; 在由 AD、aMCI 患者和年龄、性别匹配的正常对照组组成的队列中, AD 和 aMCI 患者的尿 MCP-1 水平高于对照组; AD 组和 aMCI 组之间的尿液 MCP-1 水平比较差异无统计学意义; 尿 MCP-1 水平与迷你精神状态检查(Mini-Mental State Examination) 分数和年龄相关, 并能够区分具有认知障碍的患者和正常受试者, 认为尿 MCP-1 是诊断 AD 和 aMCI 的潜在

生物标志物<sup>[36]</sup>。(3) 尿精氨酸代谢失调。程琦、王刚、陈红专教授团队认为, 尿液样本是探索非侵入性生物标志物的理想选择, 通过采集尿液样本捕获个体的代谢概况, 检测代谢组学的重要目标——差异代谢氨基酸, 以确认受试者 aMCI 状态, 并进一步探讨 aMCI 的发病机制。该研究包括 208 名受试者, 其中 98 例为 aMCI 患者, 110 名为无痴呆的对照受试者, 通过液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS) 检测尿液样本的氨基酸浓度, 结果显示, aMCI 患者的尿精氨酸水平低于正常对照组, 尿液总精氨酸的生物利用率降低, 并与 MMSE 评分呈正相关, 提示尿精氨酸代谢失调有可能成为老年 aMCI 的外周生物标志物, 这为临床早期诊断提供了实验室证据<sup>[37]</sup>。(4) 通过组学方法检出的可能标志物。王勇教授团队通过计算和实验方法结合, 鉴定 AD 的尿液生物标志物, 首次报道了分泌磷酸蛋白 1(secreted phosphoprotein 1, SPPI1)、凝溶胶蛋白(gelsolin, GSN) 和胰岛素样生长因子结合蛋白 7(insulin-like growth factor binding-protein 7, IGFBP7) 在 AD 患者的尿液中存在差异表达, 为在尿液中发现 AD 的早期生物标志物提供了重要指导<sup>[38]</sup>。吴群红教授团队采用超高效液相色谱-四极飞行时间质谱法对 46 例 AD 患者和 36 名健康对照者的血清和尿液样本进行了非靶向代谢组学分析, 结果显示, AD 患者样本的氨基酸和磷脂代谢紊乱, 棕榈酰胺失调, 为寻找 AD 诊断的外周生物标志物提供了新的思路<sup>[39]</sup>。另外, 还有研究者采用 APP/PS1 转基因小鼠模型进行尿液生物标志物的研究, 发现 29 种蛋白质表达显著不同, 24 种代谢产物存在差异调节, 牛磺酸、马尿酸、尿素、甲胺等物质水平存在差异, 提示在尿液中探索 AD 的外周生物标志物大有可为<sup>[40-42]</sup>。

### 三、无创性生物标志物检测的前景展望

在人口老龄化日益加剧的今天, 罹患 AD 的人数逐年增加, 给社会、家庭和个人带来严重的经济负担和心理压力。由于中晚期患者病情无法逆转, 早筛查、早发现、早干预已经成为防治 AD 的重要策略和共识, 即在 AD 的症状出现之前, 通过外周生物标志物的检测发现脑内出现的病理改变, 及时引起重视并给予干预(如改善生活方式、避免 AD 的危险因素等), 完全可以延缓 AD 的发生, 减少老年期罹患 AD 的可能性。作为早期筛查的手段, 无创性的外周生物标志物检测不但具有留取样本简便易行、可重复操作的优势, 而且在很多研究中显示, 无创性外周生物标志物的变化要早于其他来源的标志物<sup>[43]</sup>, 提

示应该重视无创性外周生物标志物的探索和应用,为疾病的早期诊断和早期干预打开一条崭新的康庄大道。

在此,针对尿液生物标志物的研究提出两点建议:(1)在生物样本库中为尿液标本开辟“一席之地”,标本具体保存方法可以参考尿膜的制备文献<sup>[16]</sup>。(2)建议在做脑脊液和血液标志物的同时,关注相同的标志物在尿液中的水平,或许会有令人意想不到的新发现。

**利益冲突** 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

**作者贡献声明** 论文构思设计和撰写为王蓉,文献调研与整理为何静,论文修订、审校为王蓉、何静

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 国家统计局,国务院第七次全国人口普查领导小组办公室.第七次全国人口普查公报(第五号)——人口年龄构成情况[J].中国统计,2021(5):10-11.
- [ 2 ] 北京市老龄协会.北京市老龄事业发展报告(2020) [EB/OL]. (2021-10-14) [ 2022-09-09 ]. [http://wjw.beijing.gov.cn/xwzx\\_20031/wnxw/202110/t20211014\\_2512063.html](http://wjw.beijing.gov.cn/xwzx_20031/wnxw/202110/t20211014_2512063.html).
- [ 3 ] United Nations, Department of Economic and Social Affairs. The Aging of Populations and Its Economic and Social Implications[ M ]. New York: United Nations, 1956.
- [ 4 ] 国务院新闻办公室.中国人口老龄化发展趋势预测报告 [EB/OL]. (2006-12-12) [ 2022-09-09 ]. <http://www.scio.gov.cn/xwfbh/xwfbh/wqfbh/2006/1212/Document/325195/325195.htm>.
- [ 5 ] Jia JP, Wei CB, Chen SQ, et al. The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide[ J ]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 483-491. DOI: 10.1016/j.jalz.2017.12.006.
- [ 6 ] Jia JP, Wang F, Wei CB, et al. The prevalence of dementia in urban and rural areas of China[ J ]. *Alzheimers Dement*, 2014, 10(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.jalz.2013.01.012.
- [ 7 ] Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission[ J ]. *Lancet*, 2020, 396(10248): 413-446. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30367-6.
- [ 8 ] Grøntvedt GR, Schröder TN, Sando SB, et al. Alzheimer's disease[ J ]. *Curr Biol*, 2018, 28(11): R645-R649. DOI: 10.1016/j.cub.2018.04.080.
- [ 9 ] Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade[ J ]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(1): 119-128. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70299-6.
- [ 10 ] Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, 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[ J ]. *Alzheimers Dement*, 2011, 7(3): 280-292. DOI: 10.1016/j.jalz.2011.03.003.
- [ 11 ] 刘永涛,赵敏迪,潘宣圳,等.健康人的尿液中为什么会有蛋白质?[ J ]. *中国科学(生命科学)*, 2020, 50(3): 338-348. DOI: 10.1360/SSV-2019-0235.
- [ 12 ] Wu JQ, Gao YH. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome[ J ]. *Expert Rev Proteomics*, 2015, 12(6): 623-636. DOI: 10.1586/14789450.2015.1094380.
- [ 13 ] Shao C, Zhao MD, Chen XZ, et al. Comprehensive analysis of individual variation in the urinary proteome revealed significant gender differences[ J ]. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18(6): 1110-1122. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001343.
- [ 14 ] Gao YH. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery?[ J ]. *Sci China Life Sci*, 2013, 56(12): 1145-1146. DOI: 10.1007/s11427-013-4574-1.
- [ 15 ] Shao C, Wang Y, Gao YH. Applications of urinary proteomics in biomarker discovery[ J ]. *Sci China Life Sci*, 2011, 54(5): 409-417. DOI: 10.1007/s11427-011-4162-1.
- [ 16 ] Jia LL, Liu XJ, Liu L, et al. Urinemem, a membrane that can store urinary proteins simply and economically, makes the large-scale storage of clinical samples possible[ J ]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(3): 336-339. DOI: 10.1007/s11427-013-4582-1.
- [ 17 ] Edwards JJ, Tollaksen SL, Anderson NG. Proteins of human urine. III. Identification and two-dimensional electrophoretic map positions of some major urinary proteins[ J ]. *Clin Chem*, 1982, 28(4 Pt 2): 941-948.
- [ 18 ] Ni YY, Gao YH. Should we search for early brain disease biomarkers in urine?[ J ]. *Author J*, 2016, 1(1): 00003. DOI: 10.15406/aj.2016.01.00003.
- [ 19 ] An MX, Gao YH. Urinary biomarkers of brain diseases[ J ]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(6): 345-354. DOI: 10.1016/j.gpb.2015.08.005.
- [ 20 ] Ma LN, Wang R, Han Y, et al. Development of a novel urine Alzheimer-associated neuronal thread protein ELISA kit and its potential use in the diagnosis of Alzheimer's disease[ J ]. *J Clin Lab Anal*, 2016, 30(4): 308-314. DOI: 10.1002/jcla.21856.
- [ 21 ] Jin H, Wang R, Liu ZH, et al. Some methodological characteristics of Alzheimer-associated urine neuronal thread protein detected by enzyme-linked immunosorbent assay[ J ]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 63(1): 255-262. DOI: 10.3233/JAD-171109.
- [ 22 ] Ma LN, Chen J, Wang R, et al. Alzheimer-associated urine neuronal thread protein level increases with age in a healthy Chinese population[ J ]. *J Clin Neurosci*, 2014, 21(12): 2118-2121. DOI: 10.1016/j.jocn.2014.04.028.
- [ 23 ] Jin H, Guan SC, Wang R, et al. The distribution of urinary Alzheimer-associated neuronal thread protein and its association with common chronic diseases in the general population[ J ]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 65(2): 433-442. DOI: 10.3233/JAD-180441.
- [ 24 ] Li YX, Guan SC, Jin H, et al. The relationship between urinary Alzheimer-associated neuronal thread protein and blood biochemical indicators in the general population[ J ]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(15): 15260-15280. DOI: 10.18632/aging.103356.
- [ 25 ] Li YX, Kang MM, Sheng C, et al. Relationship between urinary Alzheimer-associated neuronal thread protein and apolipoprotein Epsilon 4 allele in the cognitively normal population[ J ]. *Neural Plast*, 2020, 2020: 9742138. DOI: 10.1155/2020/9742138.

- [ 26 ] Tong ZQ, Zhang JL, Luo WH, et al. Urine formaldehyde level is inversely correlated to mini mental state examination scores in senile dementia[ J ]. *Neurobiol Aging*, 2011, 32(1): 31-41. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.07.013.
- [ 27 ] 卢静, 苗君叶, 潘荣, 等. 甲醛诱导的磷酸化减弱 Tau 蛋白与 DNA 相互作用[ J ]. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38(12): 1113-1120. DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00451.  
Lu J, Miao JY, Pan R, et al. Formaldehyde-mediated hyperphosphorylation disturbs the interaction between Tau protein and DNA[ J ]. *Prog in Biochem Biophys*, 2011, 38(12): 1113-1120.
- [ 28 ] Li T, Wei Y, Qu MH, et al. Formaldehyde and de/methylation in age-related cognitive impairment[ J ]. *Genes (Basel)*, 2021, 12(6): 913. DOI: 10.3390/genes12060913.
- [ 29 ] Wang Y, Pan FF, Xie F, et al. Correlation between urine formaldehyde and cognitive abilities in the clinical spectrum of Alzheimer's disease[ J ]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 820385. DOI: 10.3389/fnagi.2022.820385.
- [ 30 ] Yu J, Su T, Zhou T, et al. Uric formaldehyde levels are negatively correlated with cognitive abilities in healthy older adults[ J ]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(2): 172-184. DOI: 10.1007/s12264-013-1416-x.
- [ 31 ] 王维山, 郝智慧, 张力, 等. 正常老年人与阿尔茨海默病患者尿甲醛浓度的研究[ J ]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12(8): 721-722. DOI: 10.3969/j.issn.1009-0126.2010.08.017.  
Wang WS, Hao ZH, Zhang L, et al. Research on urine formaldehyde concentration in Alzheimer's disease elderly and normal elderly[ J ]. *Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis*, 2010, 12(8): 721-722.
- [ 32 ] 武海燕, 马丽, 张力, 等. 内源性甲醛及炎症介质在血管性痴呆中的研究[ J ]. *中国卒中杂志*, 2016, 11(11): 930-933. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5765.2016.11.006.  
Wu HY, Ma L, Zhang L, et al. The research of endogenous formaldehyde and inflammatory medium in the pathogenesis of vascular dementia[ J ]. *Chin J Stroke*, 2016, 11(11): 930-933.
- [ 33 ] 吕继辉, 李文杰, 赫荣乔, 等. 阿尔茨海默病患者尿甲醛水平与临床表型和 ApoE4 基因型的关系[ C ]//2016 国际老年健康论坛·泰山论文集, 2016: 239-240.
- [ 34 ] Tong ZQ, Wang WS, Luo WH, et al. Urine formaldehyde predicts cognitive impairment in post-stroke dementia and Alzheimer's disease[ J ]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 55(3): 1031-1038. DOI: 10.3233/JAD-160357.
- [ 35 ] Sun RH, Wang HY, Shi YY, et al. A pilot study of urinary exosomes in Alzheimer's disease[ J ]. *Neurodegener Dis*, 2019, 19(5/6): 184-191. DOI: 10.1159/000505851.
- [ 36 ] Xu Y, Shen YY, Zhang XP, et al. Diagnostic potential of urinary monocyte chemoattractant protein-1 for Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment[ J ]. *Eur J Neurol*, 2020, 27(8): 1429-1435. DOI: 10.1111/ene.14254.
- [ 37 ] Zhang YQ, Tang YB, Dammer E, et al. Dysregulated urinary arginine metabolism in older adults with amnesic mild cognitive impairment[ J ]. *Front Aging Neurosci*, 2019, 11: 90. DOI: 10.3389/fnagi.2019.00090.
- [ 38 ] Yao F, Hong XY, Li SM, et al. Urine-based biomarkers for Alzheimer's disease identified through coupling computational and experimental methods[ J ]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 65(2): 421-431. DOI: 10.3233/JAD-180261.
- [ 39 ] Cui Y, Liu XQ, Wang MQ, et al. Lysophosphatidylcholine and amide as metabolites for detecting Alzheimer disease using ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry-based metabolomics[ J ]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014, 73(10): 954-963. DOI: 10.1097/NEN.000000000000116.
- [ 40 ] Zhang FS, Wei J, Li XD, et al. Early candidate urine biomarkers for detecting Alzheimer's disease before amyloid- $\beta$  plaque deposition in an APP(swe)/PSEN1dE9 transgenic mouse model[ J ]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 66(2): 613-637. DOI: 10.3233/JAD-180412.
- [ 41 ] Yu JB, Kong L, Zhang AH, et al. High-throughput metabolomics for discovering potential metabolite biomarkers and metabolic mechanism from the APPswe/PS1dE9 transgenic model of Alzheimer's disease[ J ]. *J Proteome Res*, 2017, 16(9): 3219-3228. DOI: 10.1021/acs.jproteome.7b00206.
- [ 42 ] Zheng YF, Xu QQ, Jin QH, et al. Urinary and faecal metabolic characteristics in APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease with and without cognitive decline[ J ]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 604: 130-136. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.03.048.
- [ 43 ] Iwan K, Clayton R, Mills P, et al. Urine proteomics analysis of patients with neuronal ceroid lipofuscinoses[ J ]. *iScience*, 2020, 24(2): 102020. DOI: 10.1016/j.isci.2020.102020.

(收稿日期: 2022-09-14)

(本文编辑: 赵金鑫)