

# 参与阿尔茨海默病发病的分泌酶

徐嘉妮 肖宏

【中图分类号】 R741.02 【文献标识码】 A  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.03.033

【文章编号】 1007-0478(2019)03-0377-04

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的神经变性疾病,全世界每年新增 AD 病例超过 990 万,造成了沉重的家庭和社会负担<sup>[1]</sup>。目前占主导地位的 AD 发病假说认为, $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )的沉积是 AD 发生的始动因素<sup>[2]</sup>。A $\beta$ 是由它的前体蛋白 APP 经过  $\beta$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶剪切而形成的蛋白片段,而  $\alpha$ -分泌酶剪切 APP 可阻断 A $\beta$ 的生成。除了  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶这些经典的分泌酶之外,近年来还发现了一些新的分泌酶如  $\delta$ -和  $\eta$ -分泌酶等也参与 AD 的发病<sup>[3]</sup>,本研究将根据目前发现的分泌酶及其在 AD 发病过程中的作用机制进行综述,并提出调控分泌酶的 AD 治疗措施。

## 1 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)概述

AD 是临床上最常见的神经变性疾病,也是导致痴呆最常见的原因,常发生于 50 岁以后,起病隐匿,病情缓慢进展。其临床过程分为痴呆前阶段和痴呆阶段,常见的临床表现为进行性记忆障碍、认知障碍和人格障碍。AD 特征性的病理变化是中枢神经系统神经原纤维缠结和老年斑的形成。其中神经原纤维缠结的主要成分是异常沉积的 tau 蛋白,而老年斑的主要成分是  $\beta$ -淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ , A $\beta$ )。AD 的发病机制尚未完全阐明,但 A $\beta$ 的生成在 AD 发病中起到关键作用。A $\beta$ 作为病理触发因素,导致 tau 蛋白聚集、突触功能障碍、神经细胞损伤和大脑萎缩,最终导致痴呆的发生<sup>[2-4]</sup>。

A $\beta$ 是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)剪切而来。APP 是 I 型单次跨膜蛋白,目前的研究发现,APP 的典型剪切途径主要有两种:非淀粉样蛋白生成途径和淀粉样蛋白生成途径<sup>[3]</sup>。在非淀粉样蛋白生成途径中 APP 被  $\alpha$ -分泌酶和  $\gamma$ -分泌酶依次切割,产生分泌型细胞外结构域(sAPP $\alpha$ )和 P3 肽,不产生 A $\beta$ ;在淀粉样蛋白生成途径中 APP 主要由  $\beta$ -分泌酶切割,释放分泌型细胞外结构域(sAPP $\beta$ ),剩下的由 99 个氨基酸组成的 C-末端片段(C99)再由  $\gamma$ -分泌酶进一步切割生成 A $\beta$ <sup>[5]</sup>(图 1)。

## 2 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -分泌酶介导 APP 的经典剪切途径

### 2.1 $\alpha$ -分泌酶

$\alpha$ -分泌酶是指在  $\alpha$  位点切割 APP 并产生分泌型胞外域 sAPP $\alpha$ 的分泌酶。有研究发现,去整合素金属蛋白酶(AD-

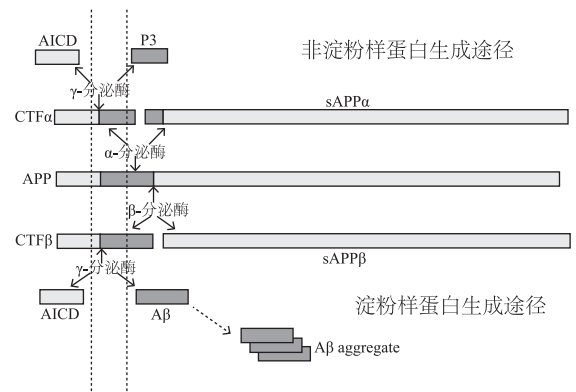


图 1 经典的 APP 剪切 非淀粉样蛋白生成途径:APP 经  $\alpha$ -分泌酶切割释放 sAPP $\alpha$ ,剩余 CTF $\alpha$ (C-末端片段- $\alpha$ , C83),CTF $\alpha$  再经  $\gamma$ -分泌酶切割产生 P3 肽和 APP 细胞内结构域(AICD);淀粉样蛋白生成途径:APP 经  $\beta$ -分泌酶切割释放 sAPP $\beta$ ,剩余 CTF $\beta$ (C-末端片段- $\beta$ , C99),CTF $\beta$  再经  $\gamma$ -分泌酶切割产生 A $\beta$  和 AICD;虚线表示细胞膜磷脂双分子层,虚线左侧代表细胞内,右侧代表细胞外

AM)家族的几种蛋白酶都有  $\alpha$ -分泌酶活性,其中 ADAM10 是主要的  $\alpha$ -分泌酶<sup>[6]</sup>。ADAM10 是 I 型跨膜蛋白,在大脑和其他组织中广泛表达,它能够切割多种膜蛋白的细胞外结构域。ADAM10 介导 APP 的非淀粉样蛋白生成途径切割,其切割位点位于 A $\beta$  序列内,因此能够阻断 A $\beta$  的生成,并且其切割产物 sAPP $\alpha$  具有神经保护和神经营养作用。最近的一项研究发现,AD 患者脑脊液中的 ADAM10 降低<sup>[7]</sup>。由于 ADAM10 能够阻断 A $\beta$  的生成,激活 ADAM10 的治疗策略在 AD 的治疗中有着广阔的前景。但由于 ADAM10 底物众多,因此在进行增强 ADAM10 活性的研究中应警惕药物可能的副作用。

### 2.2 $\beta$ -分泌酶

$\beta$ -分泌酶能够在  $\beta$  位点切割 APP,产生 A $\beta$  的 N 末端,是 A $\beta$  生成的限速酶。现有的证据表明 BACE1 是脑内主要的  $\beta$ -分泌酶<sup>[8]</sup>。BACE1 主要在脑中表达,是一种 I 型跨膜天冬氨酸蛋白酶<sup>[9]</sup>。以往的观点认为,BACE1 最重要的底物是 APP,但近年来发现了许多其他的 BACE1 底物,这些底物在生理过程中发挥重要作用。BACE1 剪切 APP 生成 sAPP $\beta$  和 A $\beta$ ,sAPP $\beta$  仅比 sAPP $\alpha$  少 16 个氨基酸,但 sAPP $\beta$  失去了 sAPP $\alpha$  的神经保护作用。BACE1 切割 APP 启动 A $\beta$  的生成,AD 患者脑内的 BACE1 活性升高,提示 BACE1 参

与 AD 的发病过程<sup>[10]</sup>。大量证据表明, BACE1 是一种应激反应蛋白酶, AD 相关的氧化应激、炎症和缺氧都能够增加它的表达水平<sup>[11-13]</sup>, 这些都表明 BACE1 在 AD 发病中起着十分重要的作用。一些研究正在探索脑脊液中的 BACE1 可否作为 AD 的生物标志物<sup>[14]</sup>。鉴于 BACE1 在 AD 的发病中起到重要的作用, 已有几个临床试验正在验证 BACE1 抑制剂在 AD 治疗中的价值。

### 2.3 $\gamma$ -分泌酶

APP 在经历  $\beta$ -切割后形成的 CTF $\beta$  再由  $\gamma$ -分泌酶切割, 生成 A $\beta$ 。 $\gamma$ -分泌酶属于膜内切割蛋白酶家族, 参与多种 I 型膜蛋白的膜内蛋白水解。 $\gamma$ -分泌酶是由 4 个亚基组成的复合物, 其中早老素是催化核心<sup>[15]</sup>。编码早老素 (PS1 和 PS2) 的基因突变是大多数家族性 AD 的致病原因, 其突变可以增加 A $\beta$  的生成并增加 A $\beta$ 42 的比例。近年来已发现,  $\gamma$ -分泌酶对 APP 的切割比最初认为的要复杂得多, 其对 CTF 的初始蛋白切割发生在跨膜结构域的 C 末端附近的  $\epsilon$ -位点, 产生 A $\beta$ 48 或 A $\beta$ 49, 然后通过  $\gamma$ -分泌酶的羧肽酶功能修剪这些长 A $\beta$  肽以产生分泌形式的 A $\beta$ <sup>[16]</sup>。家族性 AD 相关的 PS 突变会导致  $\gamma$ -分泌酶的羧肽酶功能缺陷, 从而有利于更长形式的 A $\beta$  肽产生, 表明 PS 突变所观察到的 A $\beta$ 42 比例增加可能是  $\gamma$ -分泌酶修剪功能降低的结果<sup>[17]</sup>。另外, 研究发现急性缺氧会导致  $\gamma$ -分泌酶组分水平升高, 从而促进 A $\beta$  的产生<sup>[18]</sup>。由于在 AD 中的重要作用,  $\gamma$ -分泌酶是十分有吸引力的治疗靶标。

## 3 新的蛋白酶 $\delta$ -分泌酶和 $\eta$ -分泌酶介导 APP 的非经典剪切

$\delta$ -分泌酶和  $\eta$ -分泌酶都是最近几年发现的可以切割 APP 并在 AD 发病机制中发挥重要作用的分泌酶。

### 3.1 $\delta$ -分泌酶

$\delta$ -分泌酶也称为天冬酰胺内肽酶 (AEP), 是广泛分布的溶酶体半胱氨酸蛋白酶, 可在天冬酰胺残基后特异性切割其底物<sup>[19]</sup>。有研究发现 AEP 激活后可降解 SET 蛋白, 促进细胞凋亡<sup>[20]</sup>。另外, AEP 可以切割淀粉样蛋白前体蛋白 (APP) 和 tau, 介导 AD 中 A $\beta$  和 tau 的沉积<sup>[19]</sup>。

有研究发现, 脑内的 AEP 活性随着年龄的增长逐渐增高, 在 N373 和 N585 两个位点切割 APP 胞外域, 其在 N585 处切割 APP 增强了后续 BACE1 对产生的 APP 片段 APP (586-695) 的切割, 增加了 A $\beta$  水平, 而 AEP 在 N373 处切割 APP 产生的 N-末端胞外域 APP 1-373 可触发神经损伤<sup>[21]</sup>。最近研究出的一种无毒且具有选择性的  $\delta$ -分泌酶抑制剂 (Compound 11), 可以减少 AD 转基因小鼠中 APP 切割并改善突触损失、长时程增强, 从而保护记忆<sup>[19]</sup>。这些都说明,  $\delta$ -分泌酶在 AD 发病机制中发挥着十分重要的作用, 并且可能是有效的 AD 临床治疗靶标。

### 3.2 $\eta$ -分泌酶

$\eta$ -分泌酶对 APP 的切割是由基质金属蛋白酶 MT5-MMP 介导的, 可以在 APP 的 504 位氨基酸残基处切割 APP 释放胞外域 sAPP $\eta$ , 剩下的 CTF- $\eta$  通过 ADAM10 和 BACE1 进一步剪切生成成长和短的 A $\eta$  肽 (称为 A $\eta$  $\alpha$  和 A $\eta$

$\beta$ )<sup>[22]</sup>。在 AD 小鼠模型和人 AD 脑内受损的神经元内都发现了 CTF- $\eta$  的聚集, A $\eta$  $\alpha$  能够抑制海马神经元的电活动<sup>[22]</sup>。以上研究结果说明  $\eta$ -分泌酶可能也在 AD 的发病机制中起着重要的作用, 并且 AD 的 BACE1 抑制治疗策略很有可能因为增加 A $\eta$  $\alpha$  而引起不良反应。另外, 虽然以上研究发现 MT5-MMP 具有  $\eta$ -分泌酶活性, 但不排除有其他  $\eta$ -分泌酶,  $\eta$ -分泌酶及其切割 APP 产物与 AD 发病机制的关系还有待进一步阐明。

## 4 针对分泌酶的治疗策略

### 4.1 针对 $\beta$ -分泌酶的治疗策略

在 A $\beta$  假说建立以及发现  $\beta$ -分泌酶在 AD 中起着重要作用后  $\beta$ -分泌酶已经成为 AD 预防和治疗的重要靶点。经过多年的努力, 已经研究出了有效的 BACE1 抑制剂, 并且几种抑制剂正在进行临床试验。最开始的 BACE1 抑制剂是基于肽的过渡态类似物, 之后又研发出了其他的肽类抑制剂。虽然这些肽类抑制剂在体外是有效的, 但是不具有在体内最佳的药物特性<sup>[9]</sup>。因此, 后来又开发出了非肽类小分子 BACE1 抑制剂, 其中一些抑制剂在临床前动物模型中表现出令人满意的药代动力学结果, 已经解决了血脑屏障渗透性差的问题<sup>[23]</sup>。另外, 有部分小分子 BACE1 抑制剂已经进入了临床试验, 正在进行的有 AZD3293、MK-8931、E2609 和 HPP854 等<sup>[24]</sup>。然而, 最近的一些临床试验表明清除脑内的 A $\beta$  不足以改善 AD 的认知<sup>[25]</sup>, 这些结果提示 A $\beta$  可能不是 AD 的唯一致病因子。另外, 最近还发现 BACE1 有多种底物, 因此完全抑制 BACE1 的活性可能产生毒副作用, 而应该确定 BACE1 抑制剂的剂量, 使得 BACE1 抑制剂既不会引起严重的毒副作用, 又可以有效地降低 A $\beta$  的水平<sup>[9, 14]</sup>。此外, 治疗的时机也很重要, 因为一旦 A $\beta$  开始沉积, 下游的神经损伤通路已经激活, 此时再使用 BACE1 抑制剂可能不能达到预期的疗效。

### 4.2 针对 $\gamma$ -分泌酶的治疗策略

由于在 A $\beta$  产生中的重要作用,  $\gamma$ -分泌酶也是重要的 AD 预防和治疗靶标。关于  $\gamma$ -分泌酶的治疗策略有两种, 分别是  $\gamma$ -分泌酶抑制剂和  $\gamma$ -分泌酶调节剂。已经研究出了多种  $\gamma$ -分泌酶抑制剂, 可以分为肽类抑制剂和非肽类抑制剂<sup>[26]</sup>。遗憾的是, 大多数  $\gamma$ -分泌酶抑制剂的血脑屏障透过率和选择性都比较差<sup>[26]</sup>。一些药物已经进入临床试验阶段, 但效果并不理想, 有些甚至出现了严重的不良反应, 这些不良反应可能与阻断 Notch 信号转导有关。近年来,  $\gamma$ -分泌酶调节剂引起了人们的关注, 这类药物不改变总 A $\beta$  的产生, 但调节其活性, 减少毒性更强的 A $\beta$ 42 的水平而不影响 Notch 等重要的生理性信号分子<sup>[26]</sup>。

### 4.3 针对 $\delta$ -分泌酶的治疗策略

如前所述,  $\delta$ -分泌酶是新近发现的分泌酶, 它不但能够剪切 APP, 促进 A $\beta$  的生成, 而且它同时剪切 tau 蛋白, 促进 tau 蛋白的聚集, 因此  $\delta$ -分泌酶可能是 AD 脑内 tau 和 A $\beta$  聚集的共同机制, 针对  $\delta$ -分泌酶的治疗药物能够同时阻断 AD 的两大病理变化, 可能优于  $\beta$ -分泌酶或者  $\delta$ -分泌酶调节剂。现在已有研究发现  $\delta$ -分泌酶抑制剂 compound 11 能够特异

性阻断脑内  $\delta$ -分泌酶的活性,但其临床应用价值还有待进一步研究<sup>[19]</sup>。

## 5 APP 基因重排

最近的一项研究发现神经元中的 APP 基因可以发生基因重排,类似于 B 细胞的“体细胞重组”。该研究利用一种新型测序技术,对散发性 AD 患者的大脑以及健康大脑进行了分析,结果发现 APP 基因可以发生重排,而且相关变异达数千种,并且变异的种类极为丰富。更重要的是,虽然散发性 AD 患者与健康人体内都带有 APP 基因变异,但散发性 AD 患者的变异数是健康人的大约 6 倍<sup>[27]</sup>。而且,在 AD 患者大脑中的 APP 基因变异体中发现了 11 个家族性 AD 中已知的单核苷酸突变,而健康人大脑中则没有<sup>[27]</sup>。AD 患者中明显增多的 APP 基因变异可能使  $A\beta$  的产生增多并且带来其他预料之外的毒性。因此,这或许部分解释了过去只针对  $A\beta$  产生的临床试验的失败,而且有研究发现这些 APP 基因变异是通过“逆转录”过程,重新插回到原来的基因组,形成基因组 cDNA (gencDNA),导致 DNA 序列发生永久改变<sup>[27]</sup>。这一过程与 HIV 感染细胞相似,因此提出或许有一天,我们能用于治疗 HIV 感染的抗逆转录疗法来治疗 AD。

## 6 结论与展望

分泌酶在 AD 发病与进展中的作用是本领域研究的热点方向。其中  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -分泌酶的研究已经进行了多年,而  $\delta$ -和  $\eta$ -分泌酶则是最近几年发现的新的分泌酶。目前的治疗思路包括提高  $\alpha$ -分泌酶活性、阻断  $\beta$ -分泌酶活性或调节  $\gamma$ -分泌酶的活性。另外,针对  $\delta$ -分泌酶已经开发了一些实验性的小分子治疗药物, $\eta$ -分泌酶在 AD 发病过程中的作用还有待进一步核实,而 APP 基因重排及其机制的发现提示了新的治疗思路。下一步,应该进一步阐明这些分泌酶的结构和调节机制,为针对分泌酶的治疗提供依据。同时还应该注意这些分泌酶之间的相互影响,综合调控这些酶的活性,达到治疗 AD 的目的。尽管目前尚无成功的先例,但分泌酶仍是 AD 治疗非常有前途的治疗靶点。

## 参 考 文 献

- Prince M, Wimo A, Guerchet M, et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia [R]. Alzheimer's Disease International (ADI), London, 2015.
- Musiek ES, Holtzman DM. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen' [J]. Nature Neuroscience, 2015, 18(6):800-806.
- Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family [J]. Nature Reviews Neuroscience, 2017, 18(5):281-298.
- Alzheimer GM. S and parkinson's diseases: the prion concept in relation to assembled  $A\beta$ , tau, and  $\alpha$ -synuclein [J]. Science, 2015, 349(6248):1255555.
- Wang X, Zhou X, Li G, et al. Modifications and trafficking of APP in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Front Mol Neurosci, 2017, 10:294.
- Saftig P, Lichtenthaler SF. The alpha secretase Adam10: A metalloprotease with multiple functions in the brain [J]. Progress in Neurobiology, 2015, 135:1-20.
- Sogorb-Esteve A, Garcia-Ayllon MS, Gobom J, et al. Levels of Adam10 are reduced in Alzheimer's disease CSF [J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 15(1):213.
- Koelsch G. Bace1 function and inhibition: implications of intervention in the amyloid pathway of alzheimer's disease pathology [J]. Molecules, 2017, 22(10):1723.
- Yan RQ, Vassar R. Targeting the beta secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy [J]. Lancet Neurology, 2014, 13(3):319-329.
- Cheng X, He P, Lee TH, et al. High activities of BACE1 in brains with mild cognitive impairment [J]. The American Journal of Pathology, 2014, 184(1):141-147.
- Bai S, Mao MH, Tian LB, et al. Calcium sensing receptor mediated the excessive Generation of beta-amyloid peptide induced by hypoxia in vivo and in vitro [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 459(4):568-573.
- Tan J, Li QX, Evin G, et al. Effects of mild and severe oxidative stress on BACE1 expression and APP amyloidogenic processing [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1303:101-116.
- Yang EJ, Mahmood U, Kim H, et al. Phloroglucinol ameliorates cognitive impairments by reducing the amyloid beta peptide burden and pro-inflammatory cytokines in the hippocampus of 5XFAD mice [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2018, 126:221-234.
- Barão S, Moechars D, Lichtenthaler SF, et al. BACE1 physiological functions May limit its use as therapeutic target for alzheimer's disease [J]. Trends in Neurosciences, 2016, 39(3):158-169.
- Bai XC, Yan CY, Yang GH, et al. An atomic structure of human gamma-secretase [J]. Nature, 2015, 525(7568):212.
- Aguayo-Ortiz R, Dominguez L. Simulating the  $\gamma$ -secretase enzyme: recent advances and future directions [J]. Biochimie, 2018, [Epub ahead of print].
- Wolfe MS. Dysfunctional  $\gamma$ -Secretase in Familial Alzheimer's Disease [J]. Neurochem Res, 2018, [Epub ahead of print].
- Zhang F, Zhong RJ, Qi Hong-qian, et al. Impacts of acute hypoxia on alzheimer's Disease-Like pathologies in APP(swe)/PS1(dE9) mice and their wild type littermates [J]. Frontiers in Neuroscience, 2018, 12:314.
- Zhang ZT, Obianyo O, DALL E, et al. Inhibition of delta-secretase improves cognitive functions in mouse models of Alzheimer's disease [J]. Nature Communications, 2017, 8:14740.
- Liu ZX, Jang SW, Liu X, et al. Neuroprotective actions of PIKE-L by inhibition of SET proteolytic degradation by asparagine endopeptidase [J]. Molecular Cell, 2008, 29(6):665-678.
- Zhang ZT, Song MK, Liu X, et al. Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease [J]. Nature Communications, 2015, 6:8762.
- Willem M, Tahirovic S, Busche MA, et al. eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus

[J]. *Nature*, 2015, 526(7573):443.

- [23] Ghosh AK, Osswald HL. BACE1 (beta-secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(19):6765-6813.
- [24] Kuruva CS, Reddy PH. Amyloid beta modulators and neuro-protection in Alzheimer's disease; a critical appraisal[J]. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(2):223-233.
- [25] Moussa CE. Beta-secretase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease[J]. *Expert Opinion on In-*

*vestigational Drugs*, 2017, 26(10):1131-1136.

- [26] Gu K, Li Q, Lin HZ, et al. Gamma secretase inhibitors; a patent review (2013-2015)[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2017, 27(7):851-866.
- [27] BS, GE K, I S, et al. Somatic APP gene recombination in Alzheimer's disease and normal neurons [J]. *Nature*, 2018, [Epub ahead of print].

(2018-09-06 收稿)

(上接第 376 页)

- [23] Wu P, Wang J, Peng S, et al. Metabolic brain network in the Chinese patients with Parkinson's disease based on 18F-FDG PET imaging[J]. *Parkinsonism & Related Disorders*, 2013, 19(6):622-627.
- [24] Park J, Chang WH, Cho JW, et al. Usefulness of transcranial magnetic stimulation to assess motor function in patients with parkinsonism[J]. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 2016, 40(1):81-87.
- [25] Zhang YC, Hu H, Luo WF, et al. Alteration of brainstem raphe measured by transcranial sonography in depression patients with or without Parkinson's disease[J]. *Neurological Sciences*, 2016, 37(1):45-50.
- [26] Budisic M, Trkanjec Z, Bosnjak J, et al. Distinguishing parkinson's disease and essential tremor with transcranial sonography[J]. *Acta Neurologica Scandinavica*, 2009, 119(1):17-21.
- [27] Bruggink KA, Kuiperij HB, Ekholm-Pettersson F, et al. Detection of elevated levels of  $\alpha$ -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease[J]. *Neurology*, 2010, 77(5):510-510.
- [28] Fleming SM, Tetreault NA, Mulligan CK, et al. Olfactory deficits in mice overexpressing human wildtype  $\alpha$ -synuclein[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2008, 28(2):247-256.
- [29] Ladinska M, Elizabeta B. Parkinson's disease; diagnostic relevance of elevated levels of soluble  $\alpha$ -synuclein oligomers in cerebrospinal fluid[J]. *Future Neurology*, 2011, 6(2):159-163.
- [30] Giannoccaro MP, Donadio V, Incensi AA, et al. Skin biopsy

and 1-123 MIBG scintigraphy findings in idiopathic parkinson's disease and parkinsonism; a comparative study[J]. *Movement Disorders*, 2015, 30(7):986-989.

- [31] Lamotte G, Morello R, Lebasnier A, et al. Accuracy and cut off values of delayed heart to mediastinum ratio with 123I-metaiodobenzylguanidine cardiac scintigraphy for Lewy body disease diagnoses[J]. *BMC Neurol*, 2015, 15:83-90.
- [32] Hoyles K, Sharma JC. Olfactory loss as a supporting feature in the diagnosis of Parkinson's disease: a pragmatic approach [J]. *Journal of Neurology*, 2013, 260(12):2951-2958.
- [33] Korten JJ, Meulstee J. Olfactory disturbances in Parkinsonism [J]. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 1980, 82(2):113-118.
- [34] Braak H, Del Tredici K, Rüb U, et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease[J]. *Neurobiology of Aging*, 2002, 24(2):197-211.
- [35] Herting B, Schulze S, Reichmann H, et al. A longitudinal study of olfactory function in patients with idiopathic Parkinson's disease[J]. *Neurol*, 2008, 255(3):367-370.
- [36] Tunc S, Graf J, Tadic V, et al. A Population-Based study on combined markers for early parkinson's disease[J]. *Movement Disorders*, 2015, 30(4):531-537.
- [37] 前三位作者缺失. 皮肤样本或有助于帕金森病早期诊断[J]. *中华中医药刊*, 2016, 34(6):1491-1491.
- [38] 科技部. 德国发明早期诊断帕金森方法[R]. *科技之光*, 2017, 87.

(2018-07-25 收稿)