

doi: 10.3969/j.issn.1674-1242.2026.03.033

尿液外泌体纳米富集芯片联合病理标志物 在膀胱癌早期诊断中的价值

张 星, 宰国真, 杨 柳, 王桂芝

(郑州大学第五附属医院 病理科, 河南郑州 450053)

【摘要】目的 探讨尿液外泌体纳米富集芯片联合病理标志物对膀胱癌的早期诊断价值。**方法** 前瞻性纳入郑州大学第五附属医院就诊的疑似膀胱癌患者及同期行健康体检的志愿者 110 例作为受试者, 随机分为芯片检测组($n=55$)和常规检测组($n=55$)。根据病理活检结果, 分为膀胱癌组($n=58$)和非膀胱癌组($n=52$)。芯片检测组采用纳米芯片富集尿液外泌体, 常规检测组采用超速离心法富集尿液外泌体, 比较两组外泌体的提取时间、回收率与蛋白纯度差异。采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测微小核糖核酸(microRNA, miR)-21、miR-200b 表达差异; 采用受试者操作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线评估单一及联合病理标志物对早期膀胱癌的诊断效能。**结果** 纳米芯片法的外泌体提取时间、回收率与蛋白纯度均显著优于超速离心法(均 $P<0.001$)。与非膀胱癌组比较, 膀胱癌组外泌体中 miR-21、miR-200b 表达均显著上调(均 $P<0.001$)。受试者操作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线分析表明, 两病理标志物联合检测的曲线下面积(area under the curve, AUC)达 0.910, 敏感度与特异度分别为 89.1% 和 86.7%, 显著优于任一单一指标(均 $P<0.05$)。**结论** 尿液外泌体纳米富集芯片联合 miR-21、miR-200b 检测可显著提升早期膀胱癌的诊断效能, 突破传统检测手段精准度不足的局限, 为膀胱癌无创早期筛查提供了高效、可行的新型检测策略。

【关键词】 膀胱癌; 早期诊断; 尿液外泌体; 纳米富集芯片; 病理标志物**【中图分类号】** R737.14**【文献标志码】** A

文章编号: 1674-1242 (2026) 03-0178-05

The value of urinary exosomes nano-enrichment chips combined with pathological markers in early diagnosis of bladder cancer

ZHANG Xing, ZAI Guozhen, YANG Liu, WANG Guizhi

(Department of Pathology, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450053, Henan, China)

【Abstract】Objective To explore the diagnostic value of urinary exosomes nano-enrichment chips combined with pathological markers for the early diagnosis of bladder cancer. **Methods** A total of 110 patients suspected of having bladder cancer who were treated at the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University and 110 volunteers who underwent health check-ups at the same time were prospectively included as subjects. They were randomly divided into the chip detection group ($n=55$) and the conventional detection group ($n=55$). Based on the results of pathological biopsy, the patients were divided into the bladder cancer group ($n=58$) and the non-bladder cancer group ($n=52$). The chip detection group used nano-chips to enrich urinary exosomes, while the conventional detection group used ultracentrifugation to enrich urinary exosomes. The differences in extraction time, recovery rate and protein purity of the exosomes between the two groups were compared. The expression differences of microRNA-21 and miR-200b were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR); the diagnostic efficacy of single and combined pathological markers for early bladder cancer was evaluated by the receiver operator characteristic (ROC) curve. **Results** The extraction time, recovery rate and protein purity of exosomes using the nano-chip method were significantly better than those of the ultracentrifugation method (all $P<0.001$). Compared with the non-bladder cancer group, the expression of miR-21 and miR-200b in the exosomes of the bladder cancer group was significantly upregulated (all $P<0.001$). The receiver operator characteristic (ROC) curve analysis indicated that the area under the curve (AUC) of the combined detection of the two pathological markers reached 0.910, with a sensitivity of 89.1% and a specificity of 86.7%. This was significantly superior to either single indicator (all $P<0.05$). **Conclusion** The combined use of urinary exosomes nano-enrichment chips

收稿日期: 2026-03-01。

作者简介: 张 星, 硕士研究生, 主管医师, 研究方向: 女性生殖系统肿瘤。E-mail: 15036169306@163.com

通信作者: 王桂芝, 硕士研究生, 主任医师, 研究方向: 泌尿男性生殖。E-mail:

and miR-21 and miR-200b detection can significantly enhance the diagnostic efficacy of early-stage bladder cancer, breaking through the limitations of the insufficient accuracy of traditional detection methods, and providing an efficient and feasible new detection strategy for non-invasive early screening of bladder cancer.

【Key words】Bladder cancer; Early diagnosis; Urinary exosomes; Nano-enrichment chips; Pathological markers

膀胱癌是临床最常见的泌尿系统恶性肿瘤之一,早期精准诊断对改善患者远期预后至关重要^[1]。目前,液体活检技术凭借可无创动态反映肿瘤实时状态的核心优势,在肿瘤早筛领域展现出巨大应用潜力^[2]。外泌体携带来源细胞特异性的核酸、蛋白质等生物信息,可为癌症早期诊断提供了潜在的生物标志物^[3]。研究表明,膀胱癌细胞来源的尿液外泌体中富集多种具有较高诊断价值的分子,如微小核糖核酸(microRNA, miR)-21^[4]、长链非编码 RNA 转移相关肺腺癌转录本 1(long non-coding RNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)^[5]及 miRNA 比值^[6-7]等。近年来,微流控芯片技术,尤其是集成特定功能纳米材料的芯片,为外泌体的高效分离与富集提供了新思路^[8-9]。其中,基于特殊微结构设计的芯片,已在外泌体分离效率、富集纯度等核心性能指标上展现出显著优势^[10]。基于此,本研究旨在探究基于纳米结构阵列的微流控芯片,用于高效富集尿液中的外泌体,并探讨其联合相关病理标志物对膀胱癌的早期诊断价值,以期对膀胱癌的早期无创诊断提供一种准确、高效的方案。

1 资料与方法

1.1 一般资料

前瞻性纳入 2023 年 12 月至 2025 年 12 月在郑州大学第五附属医院泌尿外科就诊的疑似膀胱癌患者及同期进行健康体检的志愿者,共 110 例。纳入标准:① 经术后病理组织活检确诊为尿路上皮癌;② 入组前未进行过放疗、化疗或免疫治疗的患者;③ 临床病历资料完整。排除标准:① 合并其他部位恶性肿瘤;② 伴有严重心、肝、肾功能不全;③ 妊娠期或哺乳期女性;④ 近 1 个月内有尿路感染或接受过泌尿系统手术。所有受试者在入组时按随机数字表法分为芯片检测组($n=55$)和常规检测组($n=55$),两组均采用各自方法富集尿液外泌体并进行后续标志物检测。根据最终病理活检结果,将全部受试者分为膀胱癌组($n=58$)和非膀胱癌组($n=52$)。膀胱癌组中,男性 44 例,女性 14 例;年龄

45 ~ 78 岁,平均(62.5 ± 8.4)岁;世界卫生组织(World Health Organization, WHO)分级标准^[11]:低级别尿路上皮癌 24 例,高级别 34 例;国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)TNM 分期(第 8 版)^[12]: $T_a \sim T_1$ 期非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)35 例, $T_2 \sim T_4$ 期肌层浸润性膀胱癌(muscle invasive bladder cancer, MIBC)23 例。非膀胱癌组包括膀胱良性病变患者 28 例[男性 20 例,女性 8 例;年龄 44 ~ 75 岁,平均(61.5 ± 8.1)岁]及健康志愿者 24 例[男性 18 例,女性 6 例;年龄 43 ~ 73 岁,平均(60.0 ± 7.6)岁]。健康志愿者纳入标准:① 近 1 年内体检结果正常,无泌尿系统疾病史、无恶性肿瘤病史;② 无吸烟、饮酒等不良嗜好;③ 尿常规、血常规、肝肾功能、腹部超声均未见异常。所有志愿者均签署知情同意书,自愿参与本研究并提供晨尿标本。志愿者所需检查(包括尿液外泌体检测)产生的费用由本研究科研经费承担。由于两类人群在年龄、性别方面差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),且均为非恶性对照,故合并为非膀胱癌组进行后续统计分析。两组受试者在年龄、性别等一般资料方面比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 尿液样本收集与处理

收集所有受试者清晨中段尿 50 ml,置于冰上迅速转运至实验室。在 4 °C 条件下,以 $3\,000 \times g$ 离心 10 min 去除细胞碎片,取上清液分装后保存于 -80 °C 超低温冰箱备用。

1.2.2 纳米结构阵列微流控芯片的制备与外泌体富集

本研究所用芯片采用软光刻技术制备,通道内修饰有纳米级的硅尖锥阵列,借助该结构强化流体动力学效应,实现对外泌体的高效捕获。将解冻后的 10 ml 尿液上清液通入芯片,流速设定为 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ 。外泌体在纳米阵列表面被特异性捕获,随后通过带有特异性洗脱液的侧通道将富集的外泌体洗脱收集。常规检测组则采用传统的差速超速离心法($120\,000 \times g$, 2 h)提取外泌体。两组均采用实时荧光

定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测外泌体中 miR-21、miR-200b 的表达水平。

1.2.3 外泌体表征与 RNA 提取

使用透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察外泌体的形态;利用 BCA 蛋白定量试剂盒检测外泌体总蛋白浓度,并根据公式(回收外泌体蛋白量/初始尿液总蛋白量 $\times 100\%$)计算外

泌体提取的回收率。提取外泌体内总 RNA,逆转录为 cDNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.4 RT-qPCR 检测病理标志物表达

选取 U6 小核 RNA (small nuclear RNA, snRNA) 为内参基因,采用 RT-qPCR 检测外泌体中 miR-21、miR-200b 的相对表达量。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体序列见表 1。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标基因的相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 引物序列

基因名称	正向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')
miR-21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	Universal reverse primer provided by kit
miR-200b	TAATACTGCCTGCTAATGATGA	Universal reverse primer provided by kit
U6 snRNA	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

注: RT-qPCR: 实时荧光定量聚合酶链式反应。miRNA 的反向引物使用试剂盒提供的通用反向引物,此为茎环法 RT-qPCR 的标准做法。

1.3 观察指标

① 比较纳米芯片法与超速离心法提取外泌体的回收率、蛋白纯度及提取时间;② 分别比较膀胱癌组与非膀胱癌组尿液外泌体中 miR-21、miR-200b 的表达差异;③ 分析单一标志物及联合标志物对早期膀胱癌的诊断效能。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据统计分析。计量资料均经正态性检验,符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;不符合正态分布的数据以中位数(四分位间距)表示,采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。采用受试者操作特征(receiver operator characteristic, ROC)曲线评估诊断效能,计算曲线下面积(area under the curve, AUC),并报告 95% 置信区间(95% confidence interval, 95%CI)。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

基于预实验中联合诊断 AUC 预期 ≥ 0.90 ,设定 $\alpha=0.05$ (双侧)、检验效能 $1-\beta=0.80$,采用 MedCalc 软件计算至少需要 84 例(每组 42 例)。本研究实际纳入 110 例,满足最低样本量要求。

2 结果

2.1 受试者基线资料分析

本研究共纳入 110 例受试者,两组在年龄、性别构成比、吸烟史等方面比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),具有可比性(表 2)。

表 2 两组受试者基线临床病理资料比较

临床病理特征	膀胱癌组 ($n=58$)	非膀胱癌组 ($n=52$)	t/χ^2	P
年龄($\bar{x}\pm s$, 岁)	62.5 $\pm$ 8.4	60.8 $\pm$ 7.9	1.082	0.282
性别(男/女, 例)	44/14	38/14	0.145	0.703
吸烟史(有/无, 例)	20/38	18/34	0.012	0.914
分组明细(例)				
膀胱良性病变	—	28	—	—
健康志愿者	—	24	—	—
肿瘤分期(例)				
T _a ~T ₁ 期(NMIBC)	35	—	—	—
T ₂ ~T ₄ 期(MIBC)	23	—	—	—
肿瘤分级(例)				
低级别	24	—	—	—
高级别	34	—	—	—

注: NMIBC: 非肌层浸润性膀胱癌; MIBC: 肌层浸润性膀胱癌。

2.2 纳米富集芯片与超速离心法的外泌体提取效能对比

为验证纳米芯片的性能,本研究对提取的外泌体进行 TEM 表征。TEM 结果显示,样本中囊泡呈典型类圆形双层膜结构,符合外泌体形态特征。与传统超速离心法相比,纳米芯片法不仅将提取时间从数小时缩短至 30 min 内,其外泌体回收率和蛋白纯度也均显著提高(均 $P<0.001$)(表 3)。

2.3 尿液外泌体病理标志物的表达差异

RT-qPCR 检测结果显示(表 4),膀胱癌组尿液外泌体中 miR-21 和 miR-200b 的相对表达量均显著高于非膀胱癌组(均 $P<0.001$)。亚组分析显示(表 5),MIBC 患者尿液外泌体中 miR-21 和 miR-200b 的相对表达量均显著高于 NMIBC 者(均 $P<0.05$)。

表3 纳米芯片法与超速离心法在外泌体提取效能比较

提取方法	样本量 (例)	提取时间 ($\bar{x}\pm s$, min)	回收率 ($\bar{x}\pm s$, %)	蛋白纯度 ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/ml}$)
纳米芯片法	55	28.5 $\pm$ 3.2	85.3 $\pm$ 6.1	12.8 $\pm$ 1.5
超速离心法	55	245.0 $\pm$ 15.0	45.7 $\pm$ 5.8	8.2 $\pm$ 1.1
<i>t</i>		98.736	34.518	17.829
<i>P</i>		<0.001	<0.001	<0.001

表4 miR-21、miR-200b在膀胱癌组与对照组的表达差异对比 ($\bar{x}\pm s$)

分组	miR-21	miR-200b
膀胱癌组 ($n=58$)	4.85 $\pm$ 1.32	3.92 $\pm$ 1.15
非膀胱癌组 ($n=52$)	1.05 $\pm$ 0.41	0.98 $\pm$ 0.35
<i>t</i>	15.041	11.323
<i>P</i>	<0.001	<0.001

表5 miR-21、miR-200b在NMIBC与MIBC患者中的

表达差异对比 ($\bar{x}\pm s$)

分组	miR-21	miR-200b
NMIBC 组 ($T_a \sim T_1$ 期, $n=35$)	3.23 $\pm$ 1.15	3.35 $\pm$ 0.95
MIBC 组 ($T_2 \sim T_4$ 期, $n=23$)	5.80 $\pm$ 1.45	4.75 $\pm$ 1.30
<i>t</i>	9.039	4.365
<i>P</i>	0.035	0.026

注: NMIBC: 非肌层浸润性膀胱癌; MIBC: 肌层浸润性膀胱癌。

2.4 单一及联合病理标志物对早期膀胱癌的诊断效能

以病理结果为“金标准”,绘制ROC曲线评估这些标志物对早期膀胱癌的诊断价值。结果显示(图1),miR-21的AUC为0.845(95%CI: 0.789~0.901),最佳截断值为2.85,敏感度为78.9%,特异度为82.4%;miR-200b的AUC为0.820(95%CI: 0.762~0.880),敏感度为75.3%,特异度为79.1%。二者联合(采用Logistic回归模型构建预测概率)时,其AUC显著提升至0.910(95%CI: 0.871~0.950),敏感度和特异度分别达到89.1%和86.7%,优于任一单一指标(均 $P<0.05$)。

3 讨论

本研究在前瞻性队列中成功验证了一种基于纳米结构阵列的微流控芯片,用于高效富集尿液外泌体,并验证了外泌体miR-21、miR-200b联合检测在早期膀胱癌诊断中的价值。芯片本身为富集工具,诊断价值源于所富集的miRNA标志物。

本研究通过Logistic回归构建了miR-21与miR-200b的联合诊断模型。ROC曲线分析表明,联合模型的诊断效能(AUC=0.910)显著优于任一单一标志物,其敏感度和特异度分别达到89.1%和86.7%。这体现了多重标志物联合检测在信息互补、提升诊断

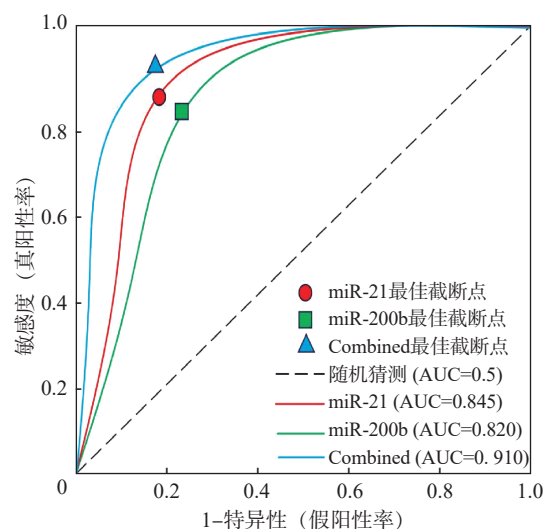


图1 单一及联合标志物诊断早期膀胱癌的ROC曲线

注: ROC: 受试者操作特征; AUC: 曲线下面积。

精度方面的统计学优势,其效能也优于传统尿液脱落细胞学检查。

本研究选择的两种外泌体miRNA在膀胱癌诊断中有重要作用,文献研究表明外泌体miR-21可由膀胱癌细胞分泌,并通过激活磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)等信号通路促进肿瘤进展^[4];而miR-200b是上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)过程的关键调控因子,其表达水平变化与肿瘤的侵袭转移能力关系密切^[13]。本研究发现二者在MIBC患者中表达水平更高,进一步验证了这两种外泌体miRNA可作为评估肿瘤侵袭性潜力的重要标志物,因此将这两种标志物进行组合诊断不仅可有效提升膀胱癌的诊断准确率,还可为后续膀胱癌的恶性发展程度提供参考。

从本质上来说,本研究提出的诊断策略为一种“高效纳米技术平台+特异性分子标志物”的整合性诊断策略,该策略通过样本前处理到终端分析的整个流程优化处理,系统性提升了膀胱癌早期诊断的效率和可靠性。相较于传统单一诊断技术,本研究提出的诊断策略能更有效满足临床实际需求,该诊

断方法无创且操作便捷,在膀胱癌高危人群的大规模初筛中可有效提升筛选效率,并能对膀胱癌患者进行长期术后动态监测,可有效降低侵入性检查负担,适合膀胱癌的早期筛选与诊断,具有广阔的临床应用前景。

本研究样本量基于预实验效应量估算,满足统计学最低要求。但作为单中心研究,结论的外推性仍需进一步验证。未来将通过更大规模的多中心前瞻性研究来确认其临床效用,并评估该芯片技术与现有医院检验流程的整合成本及可行性。尽管样本量达到了统计学基本要求,但作为单中心研究,结论的外推性仍需进一步验证。未来将通过更大规模的多中心前瞻性研究来确认其临床效用,并评估该芯片技术与现有医院检验流程的整合成本及可行性。

综上,本研究构建的“纳米芯片高效富集+外泌体双标志物联合检测”策略,突破传统检测手段精准度不足的局限,为膀胱癌无创早期筛查提供了高效、可行的新型检测策略。

参考文献

- [1] 倪茂, 张克, 曾繁浩, 等. 外泌体在膀胱癌诊断和治疗中的应用及研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31 (21): 4078-4082.
- [2] 梅竹, 任赛, 唐思恬, 等. 膀胱癌患者尿液外泌体中 miR-494-3p、LncRNA MAGI2-AS3 表达水平及临床价值研究[J]. 现代检验医学杂志, 2024, 39 (4): 5-9, 55.
- [3] OLIVEIRA M C, CAIRES H R, OLIVEIRA M J, *et al.* Urinary biomarkers in bladder cancer: where do we stand and potential role of extracellular vesicles[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(6): 1400.
- [4] LIN F, YIN H B, LI X Y, *et al.* Bladder cancer cell-secreted exosomal miR-21 activates the PI3K/AKT pathway in macrophages to promote cancer progression[J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1):151-164.
- [5] 高娟, 王青, 王云杰, 等. 尿液外泌体长链非编码 RNA MALAT1 和 HIF1A-AS2 对膀胱癌诊断的价值[J]. 临床检验杂志, 2022, 40 (6): 415-418.
- [6] PIAO X M, JEONG P, KIM Y H, *et al.* Urinary cell-free microRNA biomarker could discriminate bladder cancer from benign hematuria[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(2):380-388.
- [7] 林映汐, 陶华林. 血浆外泌体非编码 RNA MALAT1 在乳腺癌中的诊断价值[J]. 西南医科大学学报, 2018, 41 (2): 117-120.
- [8] HU T, HAN W, ZHOU Y, *et al.* Flow-electricity coupling fields enhance microfluidic platforms for efficient exosome isolation[J]. *Anal Methods*, 2024, 16(30):5335-5344.
- [9] DING L, LIU X, ZHANG Z, *et al.* Magnetic-nanowaxberry-based microfluidic ExoSIC for affinity and continuous separation of circulating exosomes towards cancer diagnosis[J]. *Lab Chip*, 2023, 23(6):1694-1702.
- [10] LIU M, JIA G, MENG X, *et al.* Cyclic enrichment of urinary exosomes using a MOF-on-MOF-based asymmetric impinging streams chip for bladder cancer diagnosis and prognosis prediction[J]. *Adv Healthc Mater*, 2025, 14(14):e2500848.
- [11] HUMPHREY P A, MOCH H, CUBILLA A L, *et al.* The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs-part B: prostate and bladder tumours[J]. *Eur Urol*, 2016, 70(1):106-119.
- [12] BRIERLEY J D, GOSPODAROWICZ M K, WITTEKIND C. TNM Classification of Malignant Tumours[M]. 8th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2017.
- [13] GÓRCECKI I, RAK B. The role of microRNAs in epithelial to mesenchymal transition and cancers; focusing on mir-200 family[J]. *Cancer Treat Res Commun*, 2021, 28:100385.