



膀胱癌尿液诊断标志物及诊断技术的研究应用进展

刘楮, 张成俊煜, 陈泽华, 潘柏林, 陈旭*

中山大学孙逸仙纪念医院, 泌尿外科, 广州 510120

* 联系人, E-mail: chenx457@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2024-04-06; 接受日期: 2024-06-24; 网络版发表日期: 2024-07-08

国家重点研发计划(批准号: 2022YFC2408300)和国家自然科学基金(批准号: 82322056)资助

摘要 膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一, 成为威胁人类健康的重大疾病. 目前膀胱癌诊断的金标准是膀胱镜检和病理学检查, 但这些检查有创且痛苦. 近几十年来, 研究者一直试图在尿液中开发和鉴定用于膀胱癌无创诊断的肿瘤标志物. 现有的研究发现, 尿液中的脱落细胞、DNA、RNA、蛋白质、代谢物、外泌体等成分或标志物在膀胱癌的早期诊断、预后评估、复发监测、肿瘤残留判断等展示出良好性能和应用前景, 而且已有诊断试剂盒获批上市, 如UriFind, Bladder Epicheck等. 此外, 人工智能技术也已被应用于尿液细胞学检查, 不但解决了敏感性低的难题, 而且能大幅提高诊断效率. 本文就近年来尿液诊断标志物和尿液诊断技术在膀胱癌精准诊疗中的进展进行综述, 并展望了未来的发展趋势, 以期为临床医生和研究者提供参考.

关键词 膀胱癌, 尿液标志物, DNA甲基化, 精准诊疗, 人工智能

膀胱癌(bladder cancer, BC)是泌尿系统最常见的肿瘤之一, 2020年在全球范围内约有57万余例新发病例和21万余例死亡病例^[1]. 我国2022年的膀胱癌发病率为6.58/10万, 已成为威胁我国人民健康的重大疾病^[2]. 膀胱癌的组织学类型90%以上是尿路上皮癌, 其他类型, 如鳞状细胞癌约占1.8%, 腺癌约占1.9%^[3]. 根据肿瘤浸润深度, 膀胱癌分为非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)占75%~85%, 肌层浸润性膀胱癌(muscle-invasive bladder cancer, MIBC)占15%~25%^[4]. NMIBC尽管不会危及生命, 但其中70%的患者术后会出现肿瘤复发, 而且有15%

的复发患者在分期和分级上出现进展^[5]. 因此, 膀胱癌患者需要反复地检查和用药, 这使膀胱癌成为治疗成本最高的恶性肿瘤之一^[6].

膀胱癌的诊断和复发监测金标准是膀胱镜活检和病理学检查^[5,7], 但该检查方式是有创的, 不但给患者带来疼痛, 甚至有可能导致尿路损伤和感染等不良反应, 导致患者依从性较差. 膀胱作为尿液的储存器官, 肿瘤细胞或成分可进入尿液, 因此尿液是诊断膀胱癌的最佳标本. 目前膀胱癌临床应用的尿液检测方法有: 尿液脱落细胞学、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、尿液核基质蛋白22(nucle-

引用格式: 刘楮, 张成俊煜, 陈泽华, 等. 膀胱癌尿液诊断标志物及诊断技术的研究应用进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 1439–1453
Liu C, Zhang C J Y, Chen Z H, et al. Research and application of urinary diagnostic markers and assays for bladder cancer (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 1439–1453, doi: [10.1360/SSV-2024-0099](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0099)

ar matrix protein 22, NMP22)、膀胱肿瘤抗原(bladder tumor antigen, BTA)、DNA甲基化等,同时也有多种方法在临床研究中。本文从人工智能细胞学方面和DNA、RNA、蛋白质、代谢物、外泌体(exosomes)等的尿液标志物进行述评,旨在梳理膀胱癌尿液诊断技术的国内外研究进展和应用情况,为膀胱癌无创精准诊断提供新思路。

1 膀胱癌尿液诊断技术的研究概况

目前膀胱癌尿液诊断的标志物和技术包括尿液细胞学、DNA、RNA、蛋白质、代谢物、外泌体等(图1)。尿细胞学检测通过显微镜评估尿沉渣中脱落细胞形态,判断有无癌细胞,是膀胱癌最早开展无创诊断技术。该技术具有较高的特异性,但总体敏感性只有

40%~55%,尤其在低级别膀胱癌敏感性更差,只有15%~25%^[8-10],最近人工智能技术在此应用对细胞学的敏感性也有大幅提升^[11]。荧光原位杂交技术是一种通过荧光标记的探针与特定DNA序列进行杂交,并用荧光显微镜检测信号来定位染色体上特定DNA序列的技术^[12]。使用荧光原位杂交技术的探针对尿液脱落细胞中的染色体进行检测,用于诊断膀胱癌的敏感性高于常规脱落细胞学,但对低级别膀胱癌的敏感性仍然不佳^[13]。近年来,越来越多的生物标志物包括DNA、RNA、蛋白质、外泌体等被开发和应用用于膀胱癌的无创诊断和全程管理,基于蛋白质的标志物NMP22和BTA和基于细胞的标记物UroVysion, FISH等已获得FDA的批准^[14],但诊断应用效果尚未能满足临床需求^[15]。许多新型尿液诊断技术,如基于DNA甲基化的UriFind和Bladder EpiCheck等展现出良好的临

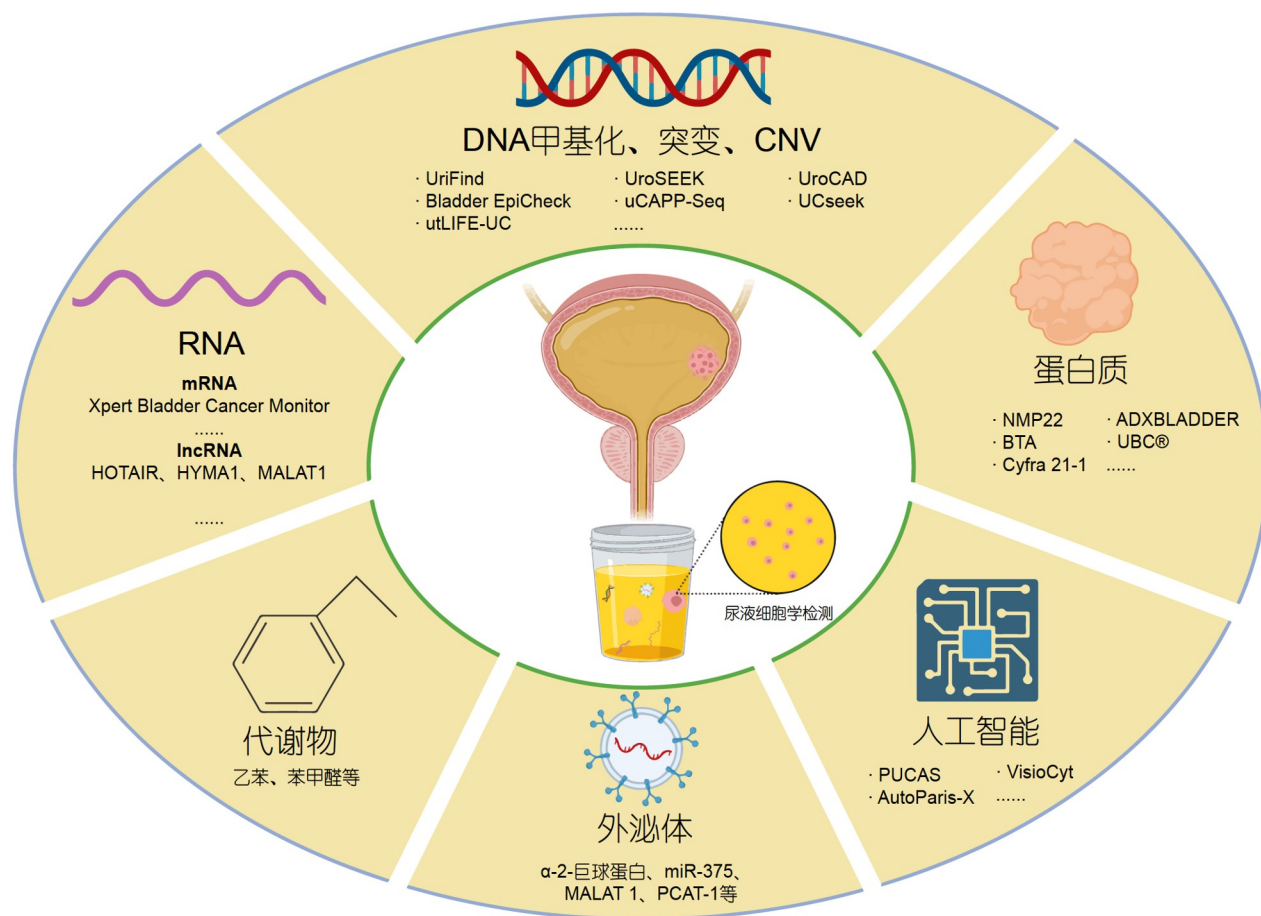


图1 膀胱癌尿液检测技术

Figure 1 Urine assays for detection of bladder cancer

床性能, 已经获批上市并进入临床应用^[16]. 在此, 我们概述在目前临床研究中表现良好的尿液生物标志物及其在膀胱癌患者诊断、治疗和预后方面的潜在应用.

2 尿液细胞学与人工智能

尿液细胞学检测在诊断膀胱癌中具有非侵入性和特异性, 但对低级别膀胱癌的敏感性较低, 受结石或感染等良性疾病影响^[8,17]. 近年来, 人工智能技术的应用使得尿液细胞学检测的效率和敏感性得到了大幅提升. AutoParis-X(AP-X)系统是由美国达特茅斯学院Levy教授等人^[11]开发的一个基于人工智能的深度学习系统. 该系统通过UroNet, UroSeg, AtyNet等元件可有效识别尿路上皮细胞, 计算尿路上皮细胞核质比并检测其异型性. 在综合各细胞和细胞簇相关信息后, 进一步通过混合效应机器学习方法预测不典型性评分(atypia burden score, ABS), 该评分与报告的诊断结果相关. 作为诊断决策辅助工具, AutoParis-X已在近1300例真实世界样本进行了大规模的回顾验证, 提高了尿液细胞学检测的敏感性, 将在前瞻性队列中进一步评估.

VisioCyt通过全玻片数字化和人工智能算法来识别检测尿液样本涂片中的膀胱肿瘤细胞, 可改善标准细胞学检测敏感性^[18]. 前瞻性、多中心的VISIOCYT试验纳入319名受试者(170例膀胱癌患者及149例非膀胱癌患者), 使用尿细胞学检测评估VisioCyt诊断性能, 发现VisioCyt检测膀胱癌的总敏感性显著高于标准细胞学检测(80.9%:45.9%, $P<0.0001$), 检测低级别和高级别膀胱癌的敏感性也显著提高(分别为66.7%:26.1%, $P<0.0001$ 及93.7%:62.8%, $P<0.0001$).

日本京都府立医科大学的Ukimura教授团队^[19]开发了一种全自动尿液细胞学分类的人工智能系统, 该系统对382名患者的536张连续尿液细胞学玻片进行了分析, 结果显示, 该系统预测高级别尿路上皮癌的AUC-ROC曲线下面积(area under the receiver operating characteristic curve, AUROC)为0.78, 当DOM(用于表示恶性程度)=0.55时, 该系统的敏感性、准确性及特异性分别为63%(52/82)、74%(126/171)及83%(74/89), 其敏感性及准确性优于病理学家的细胞学诊断结果(分别为63%:46%, 74%:68%), 但特异性更低(83%:89%). 该系统分析一张尿液细胞学玻片的时间仅需139秒,

与病理学家细胞学诊断的一致性为86%, 有望辅助病理学家进行尿细胞学诊断, 提高诊断敏感性的同时大大减少病理学家的工作量.

在前人研究的基础上, 中山大学孙逸仙纪念医院林天歆教授团队^[20]总结了先前相似研究的局限性: 包括金标准不可靠, 纳入样本较少, 未进行亚组及前瞻性验证等, 并展开了一项多中心的大型队列研究(人数>5000人, 其中前瞻性队列400人)进行尿液细胞学AI诊断系统的研发及验证, 该模型被命名为PUCAS(precision urine cytology AI solution). PUCAS系统采用了分阶段和集成决策模型框架进行构建, 该框架旨在能更好地提取跟恶性肿瘤相关的尿液细胞学特征, 模拟临床上多个病理学家投票决策的过程, 并最终提升AI诊断系统的敏感性及准确性. 在模型验证中, PUCAS在多中心回顾性队列中的敏感性为0.922(95%CI: 0.811~0.978)到1.000(95%CI: 0.782~1.000), 在前瞻性队列中的敏感性为0.896(95%CI: 0.837~0.939). 在临床上容易使医生困惑的异型尿路上皮细胞中, PUCAS的敏感性可达到0.840, 远高于FISH的0.575. 在临床多场景应用中, PUCAS可以有效应用于老年患者以及血尿患者中的筛查. 在复发监测中, PUCAS可以在96.4%的阴性预测值(negative predictive value, NPV)把握下减少57.5%的内镜使用, 显著减轻患者的负担.

3 尿液DNA标志物和诊断技术

随着二代测序技术(next-generation sequencing technology, NGS)深入解析膀胱癌的基因组特征, 膀胱癌发生和发展中的多种异常改变被发现, 包括DNA甲基化(DNA methylation)、突变和拷贝数变异(copy number variation, CNV)等. 这些标志物也被证实存在膀胱癌尿液的脱落细胞或上清中存在, 可用于膀胱癌的诊断、复发监测和疗效评估. 下述总结了目前临床中应用和研究之中的DNA标志物和诊断技术(表1).

3.1 尿液DNA突变标志物和诊断技术

端粒酶逆转录酶基因(telomerase reverse transcriptase, *TERT*)启动子区的C228T和C250T突变在膀胱癌中高频发生^[21]. UroMuTERT是法国Florence教授团队开发的基于二代测序检测尿液*TERT*启动子突变的技术, 在病例对照研究中使用UroMuTERT检测143例尿

表 1 尿液DNA标志物概况

Table 1 Landscape of urine DNA biomarkers

尿液检测技术	标志物	检测技术	应用场景	患者数量	性能 ^{a)}	研究类型	参考文献
UroMuTERT	端粒酶逆转录酶基因(<i>TERT</i>)启动子区的C228T和C250T突变	NGS	早期诊断	143例尿路上皮癌患者和144例对照	Se.=87.1%, Sp.=94.7% PPV=87.6%, NPV=94.4%	病例对照研究	[21]
UroMuTERT	端粒酶逆转录酶基因(<i>TERT</i>)启动子区突变	NGS	早期预警	30例膀胱癌患者和101例健康对照	Se.=46.67%, Sp.=100%	病例对照研究	[23]
UroSEEK	<i>TERT</i> 启动子及 <i>FGFR3</i> , <i>TP53</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>ERBB2</i> , <i>HRAS</i> , <i>KRAS</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>MET</i> , <i>VHL</i> , <i>MLL</i> 突变 和非整倍性	SANGER/ NGS	早期诊断、 复发监测	早期检测队列: 175例膀胱癌患者及395例非膀胱癌患者 监测队列: 187例膀胱癌复发患者及135例未复发患者	Se.=83%, Sp.=93% Se.=68%, Sp.=80%	前瞻性队列研究	[24]
				上尿路上皮癌队列: 56例上尿路上皮癌患者	Se.=75%		
			早期诊断、 复发监测	早期检测队列: 348例既往无膀胱癌病史但出现血尿或下尿路症状患者 监测队列: 496例膀胱癌患者	Se.=96%, Se.=88%, NPV=99% Se.=74%, Se.=72%, NPV=53%	前瞻性队列研究	[25]
			早期诊断、 复发监测	54例膀胱癌患者和34例非膀胱癌对照患者 37例膀胱癌复发患者及27例未复发患者	Se.=83%, Sp.=97% AUC=0.98, Se.=91%, Sp.=94%	前瞻性研究	[26]
uCAPP-Seq	尿液肿瘤DNA(utDNA)突变	NGS	肿瘤残留 判断	42例局限性膀胱癌患者(16例完全病理缓解, 26例在手术中监测到肿瘤残留患者)	Se.=81%, Sp.=81%, Ac.=81%	前瞻性研究	[27]
UroCAD	DNA拷贝数变异(CNV)	LC-WGS	早期诊断	发现队列: 126例尿路上皮癌患者和64例非肿瘤患者 验证队列: 56例膀胱癌患者和39例非膀胱癌患者	最佳界值 $ Z \geq 3.21$ 时, Se.=82.5%, Sp.=96.9%, Ac.=89.0% AUC=0.91, Se.=80.4%, Sp.=94.9%, 检测Ta低级别肿瘤的Se.=71.4%, 检测低级别的Se.=60.0%, 检测高级别尿路上皮癌的Se.=86.7%	双中心前瞻性 单盲临床试验 研究	[33]
			预测预后	137例尿路上皮癌患者(行经尿道膀胱肿瘤电切术队列73例, 行根治性膀胱切除术队列38例, 行根治性肾输尿管切除术队列26例)	UroCAD阴性患者DFS优于UroCAD阳性患者($P=0.091$); 经尿道膀胱肿瘤电切术队列中, UroCAD阴性亚组和UroCAD阳性亚组的3年复发率分别为16.67%及56.36% ($P<0.01$)	前瞻性研究	[34]
utMeMA	OTX1/SOX1-OT DNA 甲基化	飞行时间质谱	早期诊断、 肿瘤残留判断	251例膀胱癌患者, 225例良性疾病患者和12例健康对照	总体Se.=90.0%, Sp.=83.1%, Ac.=86.7% 检测Ta期低级别肿瘤: Se.=64.5% 检测微小肿瘤: Se.=81.0% 检测术后残留肿瘤: Se.=93.3%, Sp.=87.5%	多中心前瞻性临床 研究	[37]
			复发监测	38例膀胱癌术后复发患者和43例无复发患者	Se.=89.5%, Sp.=81.4%	单中心队列研究	
UriFind	<i>ONECUT2/VIM</i> DNA 甲基化	RT-PCR	早期诊断	队列1: 116例膀胱癌患者和76例非膀胱癌患者	AUC=0.898, Se.=87.1%, Sp.=82.9%, PPV=88.6%, NPV=80.8%	回顾性队列研究	[38]
				队列2: 59例膀胱癌患者和39例非膀胱癌	AUC=0.921, Se.=88.1%, Sp.=89.7%, PPV=92.9%,	回顾性队列研究	

(表1续1)

尿液检测技术	标志物	检测技术	应用场景	患者数量	性能 ^{a)}	研究类型	参考文献
5种DNA甲基化标志物组	ONECUT2, VIM, OSTM1, SLC4A10, AC092805.1 DNA 甲基化	RT-PCR	危险度分层	患者	NPV=83.3%		
				队列3: 34例膀胱癌和140例非膀胱癌患者	AUC=0.935, Se.=91.2%, Sp.=85.7%, PPV=60.8%, NPV=97.6%	前瞻性队列研究	
				队列1: 116例膀胱癌患者和76例非膀胱癌患者	非膀胱癌患者: AUC=0.78, Se.=87.8%, Sp.=82.9% PPV=88.6%, NPV=81.8%	回顾性队列研究	
					低中危NMIBC患者: AUC=0.78, Se.=46.2%, Sp.=93.9% PPV=54.5%, NPV=91.7%		
					高危NMIBC+MIBC患者: AUC=0.78, Se.=83.1%, Sp.=82.4%, PPV=80.4%, NPV=84.8%		
Bladder Epicheck	15种DNA甲基化	RT-PCR	复发监测	353例NMIBC患者	AUC=0.82, Se.=68.2%, Sp.=88.0%, PPV=44.8%, NPV=95.1%	多中心前瞻性临床研究	[39]
			复发监测	357例NMIBC患者	NPV=94.4%, Sp.=88%	多中心前瞻性临床研究	[40]
9种DNA甲基化标志物组	FAM 19 A4, GHSR, MAL, miR-129, miR-935, PHACTR 3, PRDM 14, SST和ZIC 1 DNA甲基化	RT-PCR	定性诊断, 复发检测	108例膀胱癌患者和100例年龄和性别匹配对照者	Se.=81%, Sp.=93% 其中GHSR/MAL: AUC=0.89, Se.=80%, Sp.=93%	前瞻性临床前研究	[42]
UCseek	DNA甲基化和CNV特征	NGS	早期诊断, 复发监测	发现队列: 90例尿路上皮癌患者和77例非肿瘤患者 验证队列: 109例肿瘤患者和97例非肿瘤患者, 其中包括42例尿路上皮癌患者的监测队列	— 验证队列: Se.=92.7%, Sp.=90.7%, Ac.=91.7% 监测队列: Ac.=90.91%	多中心前瞻性队列研究	[43]
utLIFE-UC	DNA突变和CNV	NGS	早期诊断	膀胱癌队列: 281例膀胱癌患者和393例正常对照 UTUC队列: 11例UTUC患者和11例非肿瘤对照	AUC=0.942, Se.=94.31%, Sp.=98.73% Se.=90.91%, Sp.=90.91%	前瞻性临床试验研究	[44]
			肿瘤残留判断	训练集: 8例术后病理完全缓解(pCR)患者和8例有肿瘤病变患者	Se.=100%, Sp.=87.5%, NPV=100%		
				验证集: 15例术后患者	Se.=100%, Sp.=80%, NPV=100%		

a) Se.: 敏感性, Sp.: 特异性, Ac.: 准确性

路上皮癌患者和144例对照者尿液*TERT*启动子C228T和C250T突变^[22], 结果显示该模型检测尿路上皮癌的敏感性、特异性、阳性预测值(positive predictive value, PPV)及阴性预测值(negative predictive value, NPV)分别为87.1%, 94.7%, 87.6%和94.4%, 检测非肌层浸润性尿路上皮癌(non-muscle invasive bladder cancer, NMIBC)的敏感性显著优于细胞学(86.1%:23.5%)。此外, Florence教授团队^[23]在半乳糖体队列研究(纳入50045名伊朗人尿液样本并开展10余年的随访)的基础上开展一项纳入131名参与者(30例膀胱癌患者和101名健康对照)的巢式病例对照研究, 结果显示, 在原发性膀胱癌临床诊断前10年, UroMuTERT可在无症状个体的诊断前尿液样本中检测到*TERT*启动子突变, 特异性为100%, 敏感性为46.67%, 预计PPV为100%, 预计NPV为99.95%。这项前瞻性病例对照研究对大量无症状成年人群进行了超过10年的随访, 结果表明, 使用UroMuTERT检测尿液中*TERT*启动子突变可用于膀胱癌的早期预警。UroMuTERT在检测尿路上皮癌方面展现出较好的敏感性和特异性, 但病例对照研究的数据质量有限, 目前仍缺乏前瞻性的数据。

美国Netto教授团队^[24,25]开发的UroSEEK技术, 通过SANGER法联合二代测序检测11个尿路上皮癌相关基因(包括*FGFR3*, *TP53*, *CDKN2A*, *ERBB2*, *HRAS*, *KRAS*, *PIK3CA*, *MET*, *VHL*, *MLL*和*TERT*)突变和非整倍性, 与尿液细胞学检测相结合可提升早期诊断尿路上皮癌的敏感性。在一项队列研究中^[24], 使用UroSEEK对570名膀胱癌高危患者进行术前检测, 结果显示单独使用UroSEEK时检测到了83%的膀胱癌患者, 将UroSEEK与尿液细胞学检测结合后敏感性提升到95%, 特异性为93%。复发监测队列纳入322名既往诊断为膀胱癌的患者, 单独使用UroSEEK时敏感性为68%, 与尿液细胞学相结合后敏感性为71%, 特异性为80%。在前瞻性队列中^[25], UroSEEK诊断348名既往无膀胱癌病史但出现血尿或下尿路症状患者的敏感性、特异性及阴性预测值分达到96%, 88%和99%, 但在纳入496名膀胱癌患者的监测队列中UroSEEK的NPV仅为53%, 表明UroSEEK不能减少复发监测的膀胱镜检查。

美国Diehn教授团队^[26]开发的uCAPP-Seq是基于二代测序检测尿液游离肿瘤DNA(urinary tumour DNA, utDNA)的技术, 可用于检测微小残留病变(mini-

mal residual disease, MRD)。一项研究使用定制的uCAPP-seq成功诊断了91%(32/37)的复发性NMIBC患者, 且在92%的患者中, 基于utDNA的检测先于临床检测复发(中位数为2.7月)^[26]。另一项分析了42例局限性膀胱癌患者的研究中^[27], uCAPP-Seq判断肿瘤MDR的准确性为81%, 将utDNA水平高于阈值2.3%的患者定义为utDNA MRD阳性时, utDNA MRD阳性患者有更差的术后疾病特异生存率(progression-free survival, PFS)(HR=7.4; $P=0.02$)。该技术使用非侵入性的手段监测新辅助治疗后有无肿瘤残留, 为新辅助化疗后有无肿瘤残留提供判断依据, 但仍有待大样本多中心临床研究进一步验证。

3.2 尿液拷贝数变异诊断技术

CNV是指在不同个体的基因组中, 特定DNA片段的拷贝数量存在差异的情况, 是一种重要的遗传学现象, 涉及基因组DNA中片段的插入、缺失、重复等^[28]。膀胱癌中常见的拷贝数变异为染色体3, 8, 9, 11, 13和17的缺失^[29]。UroVysion是使用FISH技术探测3, 7, 17和9p21染色体改变的尿液标志物, 总体敏感性为30%~86%, 特异性为63%~95%^[8], 对低分期和低级别肿瘤的准确性差, 成本高, 缺乏广泛的多中心验证。

中山大学孙逸仙纪念医院黄健/林天歆教授团队^[30]使用多次退火环状循环扩增技术结合二代测序的全基因组染色体畸变分析策略(MALBAC-NGS strategy)开发了尿液细胞的染色体畸变检测模型, 该模型在训练集可有效检测膀胱癌, 敏感性、特异性、准确性、NPV和PPV分别为83.1%, 94.5%, 89.0%, 85.4%和93.7%, AUC=0.917。在由120名膀胱癌患者和60名对照组成的验证集中, 该模型检测膀胱癌的敏感性和特异性为89.2%和90.0%, 检测Tis/Ta膀胱癌的敏感性达83.3%, 可作为无创诊断和监测膀胱癌的工具。

染色体不稳定性(chromosomal instability, CIN)是指从点突变到染色体重排等一系列不断发生的基因组改变, 涉及染色体拷贝数变异或染色体结构变化的频率增加^[31], 与高肿瘤分期、预后不良、免疫逃逸、肿瘤转移和肿瘤耐药相关^[32]。海军军医大学许传亮教授团队^[33]开发的尿脱落细胞拷贝数畸变检测(UroCAD)是应用低覆盖全基因组测序(low-coverage whole-genome sequencing, LC-WGS)检测190例患者的尿液脱落细胞DNA拷贝数变异负荷而构建的诊断模型, 可在基

基因组面对尿液脱落细胞进行染色体不稳定性分析,在对包含56名膀胱癌患者和39名非癌症患者的验证队列中,UroCAD的总体敏感性和特异性分别为80.4%和94.9%,检测局限于Ta低级别肿瘤的敏感性为71.4%,总体性能优于尿细胞学及UroVysion.在预测预后方面^[34],使用UroCAD对术前收集137例尿路上皮癌患者尿样进行全基因组测序,结果显示UroCAD阴性患者无复发生存期(disease-free survival, DFS)优于UroCAD阳性患者($P=0.091$),在行经尿道膀胱肿瘤电切术的患者队列中,UroCAD阴性亚组和UroCAD阳性亚组的3年复发率有显著差别(16.67%:56.36%, $P<0.01$).

3.3 尿液DNA甲基化标志物和诊断技术

基于遗传学DNA序列改变的尿液DNA标志物在检测膀胱癌方面已经取得了显著进展,但仍不能完全解释膀胱癌所有的生物学现象.近十余年来发现表观遗传学在肿瘤发生发展中发挥重要作用,其中DNA甲基化是一种重要的表观遗传修饰,涉及DNA甲基转移酶(DNA methylation transferase, DNMT)将甲基共价转移到DNA序列的5'-胞嘧啶-磷酸-鸟嘌呤-3'二核苷酸位点的胞嘧啶5'碳原子上^[35].DNA甲基化程度与基因的表达呈现负相关,进而影响肿瘤的生物学行为.抑癌基因的DNA高度甲基化是多种恶性肿瘤发生的早期改变,并被证实可用于肿瘤的早期诊断.此外,同一个基因上不同位点的DNA甲基化程度相近,并且存在多个基因甲基化程度相近的“共甲基化”现象,提示某些位点的甲基化程度可代表该基因,甚至一类基因的甲基化程度,在临床中展示出良好前景和便捷的方式^[36].因此,尿液DNA甲基化标志物可被用于膀胱癌的诊断和预后评估.

DNA甲基化检测技术utMeMA是中山大学孙逸仙纪念医院林天歆/陈旭团队^[37]开发的基于飞行时间质谱检测尿液OTX1/SOX1-OT DNA甲基化的技术.研究纳入了251例膀胱癌患者、225例良性疾病患者和12例健康对照.该技术诊断膀胱癌的准确性、敏感性和特异性分别为86.7%、90.0%和83.1%.检测Ta期低级别肿瘤、微小肿瘤和术后残留肿瘤的敏感性分别为64.5%、81.0%和93.3%,均超过尿细胞学和FISH检测.此外,utMeMA可以有效监测81例膀胱癌的复发,敏感性为89.5%,特异性为81.4%.

UriFind是一个在中国获批上市,通过荧光定量

PCR来检测ONECUT2和VIM基因DNA甲基化标志物的技术^[38].该技术基于utMeMA研发而成,在膀胱癌的早期诊断和复发监测有良好的性能.使用UriFind检测98例疑似膀胱癌患者,结果显示UriFind检测膀胱癌的总敏感性为88.1%,检测低级别膀胱癌的敏感性为77.8%,显著高于细胞学和FISH(均为22.2%),检测Ta期肿瘤敏感性为83.3%,显著高于细胞学的41.2%和FISH的52.9%,检测非肌层浸润性膀胱癌80.0%的敏感性也高于细胞学的51.5%和FISH的59.4%;在纳入174例血尿患者的单中心前瞻性队列研究中,UriFind检测低级别膀胱癌、Ta期膀胱癌及非肌层浸润性膀胱癌的敏感性分别达到了91.2%、83.3%、89.7%,再次证明显著优于细胞学和FISH检测.在UriFind基础上添加OSTM1, SLC4A10, AC092805.1甲基化标志物构建的危险度分层模型能以90.5%的高敏感性和86.8%的高特异性从98例疑似膀胱癌患者识别出了高危NMIBC和MIBC患者.上述研究提示,UriFind在检测膀胱癌尤其是低级别、Ta期膀胱癌有卓越的敏感性,可减少因尿细胞学或FISH检测漏诊的病例.UriFind是林天歆/陈旭团队联合广州基准医疗有限公司开发的技术,目前已获得中国体外诊断试剂盒注册证,是中国首个获批的尿路上皮癌辅助诊断的DNA甲基化技术,已在全国多个医院应用.该技术也获美国FDA突破性医疗器械认定和欧盟CE认证,未来有望在欧美地区应用,为膀胱癌的全程管理提供无创和精准的诊断技术.

Bladder EpiCheck是一种在欧盟上市的膀胱癌诊断技术,它通过荧光定量PCR检测尿液中的15个DNA甲基化标志物来诊断膀胱癌^[39,40].荷兰Witjes教授团队^[39]开展一项多中心前瞻性临床研究,纳入353名NMIBC患者,结果显示Bladder EpiCheck在敏感性、特异性、NPV、PPV分别为68.2%、88.0%、95.1%和44.8%,受试者工作特征曲线下面积(area under curve, AUC)为0.82,在排除低级别Ta复发后,Bladder EpiCheck敏感性为91.7%,NPV为99.3%,AUC为0.94.澳大利亚Andrea教授团队^[40]开展一项前瞻性多中心的NMIBC复发监测临床研究,纳入357例NMIBC患者,数据分析表明Bladder EpiCheck的特异性为88%,阴性预测值为94.4%,检测高级别膀胱癌的阴性预测值为99.3%.上述研究提示,Bladder EpiCheck在膀胱癌复发监测上,具有较高的阴性预测值,有助于减少不必要的膀胱镜检查,降低患者的医疗成本.但Bladder Epi-

Check的临床研究主要集中在白种人上, 其性能尚未在中国开展临床研究和证实。

阿姆斯特丹自由大学Steenbergen教授团队^[41,42]开发了基于荧光定量PCR检测9个尿液DNA甲基化标志物组合(FAM 19 A4, GHSR, MAL, miR-129, miR-935, PHACTR 3, PRDM 14, SST和ZIC 1)的技术。在一项前瞻性研究中, 他们对108例膀胱癌患者和100名年龄和性别匹配对照者的尿液样本进行甲基化分析, 发现这9个DNA甲基化标志物在膀胱癌患者中的水平显著高于对照者($P<0.001$), 敏感性为81%, 特异性为93%, 其中标志物组GHSR/MAL诊断膀胱癌的AUC为0.89, 敏感性为80%, 特异性为93%^[42], 在膀胱癌早期诊断和非肌层浸润膀胱癌患者随访中的具有临床价值, 有待临床研究中进一步验证。

基于上述临床研究的结果, 针对DNA甲基化的检测是一种高度敏感和特异的方法, 可满足膀胱癌非侵入性诊断和预后的临床需求。

3.4 尿液DNA标志物联合诊断技术

通过拷贝数变异联合甲基化特征有助于改善对低级别尿路上皮癌检出率。北京大学第一医院李学松教授团队^[43]使用二代测序对90例尿路上皮癌患者和77例非肿瘤患者的尿沉渣样本中的DNA进行了甲基化特征和拷贝数变异特征分析, 然后使用基于读取的方法构建了甲基化模型, 使用支持向量机算法构建拷贝数变异模型, 最后根据最佳权重将两模型整合, 创建了一个高敏感性的诊断监测模型UCseek, 该模型可以对早期、低级别、非浸润的尿路上皮癌进行有效诊断和监测。在纳入206例患者(109名尿路上皮癌患者和97名无肿瘤对照)的队列中, 该模型的准确性、敏感性和特异性分别为91.7%、92.7%和90.7%, 对低级别尿路上皮癌及Ta/T1期尿路上皮癌的准确性分别为91.8%和94.3%。该模型在0.3X~0.5X的超低测序深度下AUC值仍达到了0.88。此外, 使用UCseek能够准确区分患者有无复发(准确率为90.91%)。因此, 通过联合检测拷贝数变异及甲基化特征, 可以提升诊断的准确性。

utLIFE-UC模型是北京大学第一医院何志嵩教授团队^[44]基于机器学习方法构建的联合检测DNA突变和拷贝数变异的尿路上皮癌诊断模型, 该模型区分膀胱癌患者($n=281$)和对照($n=393$)的AUC、敏感性以及特异性分别为0.942, 94.31%以及98.73%, 区分上尿路上

皮癌患者($n=11$)和对照组($n=11$)的敏感性及特异性均为90.91%。此外, 与尿细胞学相比, utLIFE-UC模型检测MIBC及NMIBC的敏感性都显著提升(分别为82.6%:69.6%, $P<0.05$ 及94.7%:31.6%, $P<0.01$); 在MRD检测方面, 该模型实现了100%的敏感性、80%的特异性和100%的NPV。该研究提示utLIFE-UC可用于尿路上皮癌的早诊及治疗过程的MRD评估。

上述DNA标志物联合检测提升了检测的敏感性和准确性, 但高通量测序检测的费用较高和时间较长, 在未来临床应用的普及性和快捷性仍面临考验。

4 尿液RNA标志物和诊断技术

信使RNA(messenger RNA, mRNA)是通过转录由DNA模板合成、携带遗传信息并指导蛋白质合成的一类单链核糖核酸, 其表达异常可以影响所产生的蛋白质, 参与肿瘤的发生和发展。Xpert Bladder Cancer Monitor®(XBM)是一种通过qRT-PCR技术检测五种mRNA(ABL1, CRH, IGF2, UPK1B和ANXA10)的技术^[45,46]。在一项NMIBC复发监测的前瞻性多中心研究中, XBM的敏感性为74%, 特异性为80%, NPV为93%, 其敏感性和NPV均优于细胞学(敏感性30%, NPV 86%)和UroVysion(敏感性51%, NPV 88%)^[45]。在另一项NMIBC研究中, XBM的敏感性和特异性分别为58%和89%, 对高级别复发敏感性为74%, 特异性为89%^[46]。因此XBM的性能仍需进一步评估。

长非编码RNA(long non-coding RNAs, lncRNAs)是长度超过200个核苷酸非编码RNA。目前研究表明, lncRNAs参与了膀胱癌的发生和发展^[47]。在一项使用qRT-PCR技术评估尿液lncRNA组合(HOTAIR, HYMA1, MALAT1和UCA1-201)区分膀胱癌和膀胱炎能力的研究中^[48], 其敏感性为95.7%, 特异性为94.3%, 初步提示lncRNA在膀胱癌诊断中具有一定价值, 但仍需在大样本和多个对照疾病中明确性能。

微小RNA(microRNA, miRNA)是长度约为22核苷酸的单链非编码RNA, 通过介导mRNA降解或阻碍翻译作用于转录后调控环节^[49]。Suarez-Cabrera等人^[50]利用盲法在包含40例膀胱癌患者和42例对照的队列中评估基于miR-145/miR-182比率开发的诊断模型BlaDi-miR, 结果显示BlaDimiR的AUC为0.96, 敏感性为93%, 特异性为86%。另一项研究使用miR-93-5p与miR-516a-

5p组合标志物区分膀胱癌患者和健康人群的AUC为0.867, 敏感性为85.2%, 特异性为82.4%^[51]。以上研究提示, miRNA在诊断膀胱癌方面具有一定潜力。

5 尿液蛋白质标志物和诊断技术

目前FDA批准的尿液蛋白质标志物诊断膀胱癌的只有尿液核基质蛋白22(NMP22)和膀胱肿瘤抗原(BTA)。NMP22在有丝分裂中参与DNA复制和基因表达调节, 在尿路上皮癌细胞中过度表达, 并随着细胞凋亡释放到尿液中。NMP22检测通过酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)来检测尿液中的核基质蛋白22, 2015年的一项meta分析报道NMP22的敏感性为69%, 特异性为77%^[52]。但在尿路感染、尿石症和血尿等导致细胞更新增快的良性病症中也可以观察到尿液中NMP22水平的增加, 导致假阳性结果^[53]。BTA测试通过ELISA检测尿液中是否存在人补体因子H相关蛋白(human complement factor H-related protein, hCFHrp), 敏感性和特异性分别为65%和74%^[52]。然而hCFHrp与补体系统旁途径主要调节因子H因子(FH)具有高度结构相似性^[54], 当患者存在血尿症状时在含血尿液中的H因子可以被BTA测试测定为阳性, 因此, 在存在结石、感染和留置支架等情况下也容易出现假阳性结果。探索新的尿液蛋白标志物的研究迫在眉睫。

微小染色体维持蛋白5(minichromosome maintenance complex component 5, MCM5)是一组与DNA复制密切相关的蛋白, 可作为增殖细胞的蛋白质标志物^[55]。正常膀胱壁的细胞几乎不含有MCM5, 因此在健康人的尿液中几乎检测不到MCM5。然而, 细胞分裂旺盛的膀胱癌尿液中MCM5的ELISA检测呈阳性^[56]。ADXBLADDER试剂盒是基于MCM5抗体检测膀胱癌商业化产品。在一项对7中心的856名出现血尿的患者进行了盲法前瞻性研究中^[57], ADXBLADDER检测膀胱癌的总敏感性为73.0%, 总体NPV为96.4%, 对肌层浸润性膀胱癌的敏感性和NPV均为100%, 对非pTa(pT1及以上)肿瘤的敏感性为97%, NPV为99.8%。在一项盲法、前瞻性、21中心的欧洲队列中纳入了1431例NMIBC患者^[58], 其监测结果显示, ADXBLADDER对非pTa-LG肿瘤的敏感性为75.6%, 阴性预测值为99.0%。以上临床研究表明, ADXBLADDER可用作

为高级别膀胱肿瘤的诊断及排除非肌层浸润性膀胱癌复发的一项辅助手段。

细胞角蛋白8, 18和19的表达在尿路上皮细胞中较高, 并且可能与较高的细胞增殖率相关^[59], 因此膀胱癌患者尿液中的角蛋白高于健康尿液。Cyfra21-1是细胞角蛋白19的可溶性片段, 尿Cyfra 21-1的高水平表达与膀胱癌患者的预后不良相关, 既往研究证实, 尿Cyfra 21-1诊断膀胱癌特异性和敏感性分别约为60%~90%和40%~92%^[60~63]。一项研究开发了一种荧光纳米球免疫层析试纸用于Cyfra 21-1的定量检测^[64], 在人尿样($n=115$)的分析中表现出良好的性能, AUC为0.989, 诊断膀胱癌的敏感性为92.86%, 特异性为100%, 该方法具有快速、灵敏、可靠的特点, 但还需更多的数据来确定敏感性和特异性。UBC®快速检测基于免疫层析技术(immunochromatography assay, ICA), 定性测量细胞角蛋白8和18的片段^[65]。一项530例膀胱癌多中心的研究表明, UBC®对高级别MIBC的敏感性为75%, 特异性为93.8%^[65]。然而, 基于细胞角蛋白的测试很容易受到尿石症或感染等良性疾病以及膀胱内治疗的干扰, 导致假阳性。

由于膀胱癌存在较强的异质性, 同时检测尿液中的多种蛋白标志物有助于提高诊断膀胱癌的敏感性和特异性, 并降低假阳性或假阴性风险。Oncuria™是使用ELISA检测尿液中10种蛋白质(A1AT, APOE, ANG, CA9, IL8, MMP9, MMP10, PAI1, SDC1和VEGFA)的技术, 在一个纳入362名膀胱癌疑似患者(46名膀胱癌患者及316名非膀胱癌患者)的多中心前瞻性研究中^[66], 将Oncuria™与人口学指标年龄、性别、种族结合产生了新模型, 该新模型诊断膀胱癌的敏感性和特异性均达到93%, PPV和NPV分别为65%和99%, 检测低级别膀胱癌和非肌层浸润性膀胱癌的敏感性分别为89%和93%, 表明这种基于多重蛋白测定的方法有助于实现膀胱癌的有效和准确检测。

6 尿液代谢物标志物和诊断技术

尿液挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)是细胞代谢的副产物, 可作为检测膀胱癌的潜在标志物^[67]。近年来, 电子鼻技术和以气相色谱-质谱为代表的代谢组学方法的发展提高了检测尿液挥发性有机化合物用于诊断膀胱癌的性能, 西安交

通大学范晋海教授团队^[68]开发了一种识别尿液VOCs的基于化学电阻型气敏传感器阵列的高性能电子鼻系统, 在区分膀胱癌患者和健康者方面实现了96.67%准确性、100%敏感性和83.33%特异性, 诊断术后复发患者上也取得了88.89%的准确性。这种电子鼻系统不易受年龄、性别、吸烟习惯和慢性病等混杂因素的影响, 在膀胱癌非侵入性诊断和个体化管理方面具有巨大的应用潜力。另一项研究采用顶空固相微萃取-气相色谱质谱联用的方法评估了96例膀胱癌患者96例及209例对照组的VOCs特征^[69], 数据分析表明, 膀胱癌患者10种VOCs的含量相比对照组具有统计学意义, 6种VOCs的组合能较准确地用于膀胱癌的复发监测(AUC=0.796)。此外, Pal团队^[70]发现, 患者尿液VOCs中的乙苯可敏感快速检测膀胱癌, 其敏感性和特异性分别达到87%和86%。以上研究表明, 检测尿液代谢标志物可用于膀胱癌的早期诊断和预后监测。

表2 膀胱癌尿液诊断标志物 and 技术的优缺点

Table 2 Advantages and disadvantages of urinary diagnostic markers and assays for bladder cancer

标志物/检测方法		优点	缺点
人工智能		自动高效, 一致性、准确性、敏感性和特异性较高, 有助于减少低级别、早期和微小肿瘤及膀胱镜结果可疑患者的漏诊误诊; 在大规模检测方面具有优势, 可减轻细胞病理学家的工作量	需要大量的训练数据, 开发成本高, 技术复杂; 人工智能模型主要基于细胞学图像建立, 缺乏对流行病学、实验室指标等其他数据的整合; 尚处于初期研究, 缺乏前瞻性、多中心、大规模的临床验证研究证实其有效性
DNA	DNA突变	提供肿瘤基因突变的直接证据; 敏感性、特异性较高, 检测低风险非肌层浸润膀胱癌性能较好, 可用于早期诊断、预后评估、复发监测、肿瘤残留判断等场景	单基因少数位点突变敏感性低; 多基因多位点检测需要NGS, 耗时长, 费用高, 临床时效性较低
	CNV	检测尿液脱落细胞的染色体异常, 提供肿瘤细胞基因组结构变化的直接证据; 敏感性和特异性较高, 可用于膀胱癌的早期诊断和复发监测	检测需要NGS, 耗时长, 费用高, 临床时效性较低; 在识别肿瘤的生物特性上, 研究和证据较少
	DNA甲基化	DNA甲基化相对稳定, 可定量分析, 检测便捷可通过qPCR来检测, 费用较低。敏感性和特异性较高, 检测微小残留病变性能较好, 可用于膀胱癌的早期诊断、预后评估、复发监测、肿瘤残留判断	膀胱癌特异性DNA甲基化位点开发难度较大; 多位点DNA甲基化检测和建模难度较大
RNA		RNA标志物可反映膀胱癌基因表达的异常; RT-qPCR等技术的发展使检测RNA更加便捷可行; 同时检测多种类型RNA标志物的诊断性能更佳	RNA性质较不稳定, 容易降解, 且可能受炎症等因素影响; 由于肿瘤异质性导致结果不稳定; 不同RNA标志物的性能差别较大; 同时测量多种类型RNA在提高性能的同时导致检测复杂性和成本增加; 仍需开展前瞻性、多中心、大规模的临床验证研究证实其有效性
蛋白质		蛋白质性质相对稳定, 直接反映膀胱癌细胞的生物学功能; 部分蛋白标志物有较成熟的商业化检测产品, 在前瞻性环境中性能良好	易受感染、结石、膀胱内灌注治疗等干扰出现假阳性情况; 用于检测蛋白质的特异性抗体开发难度大, 周期长
挥发性有机化合物		挥发性有机化合物直接反映人体的生理和病理状态, 在检测早期肿瘤方面具有潜力; 代谢组学和电子鼻的发展为检测尿液挥发性有机化合物提供有力工具; 具有较高的准确性、敏感性和特异性	性能受膀胱癌异质性干扰; 挥发性有机化合物易受感染、结石、膀胱内灌注治疗及年龄、吸烟习惯、药物、饮食和生活方式等混杂因素影响; 检测仪器要求高, 应用普及性和便捷性受限
外泌体		由肿瘤细胞分泌, 能较好反映细胞的生物学行为; 质谱和二代测序的应用有助于鉴定和定量外泌体的内容物	分离和分析外泌体的技术复杂, 需要特殊设备; 尚处于初期研究, 缺乏高质量的临床验证研究数据

7 尿液外泌体标志物

外泌体(exosomes)是由细胞分泌的直径为40~100 nm的球形脂质双层囊泡, 是细胞间信息传递的重要途径, 在生理和病理过程中均发挥重要作用。外泌体性质稳定, 可以保护内容物免受酶的降解。目前研究表明, 外泌体参与了膀胱癌细胞的增殖、转移及顺铂耐药等过程^[71]。膀胱癌尿液和健康者的外泌体表达显著不同, 例如, 膀胱癌患者的尿外泌体中 α -2-巨球蛋白、NMP 22、miR-375上调^[72,73], miR-146 a下调^[74]。尿外泌体在膀胱癌无创检测中显示出良好的性能: 由尿外泌体中3种lncRNA(MALAT 1, PCAT-1和SPRY 4-IT 1)组成的标志物在膀胱癌诊断的AUC为0.813^[75], 外泌体CEACAM1的AUC为0.907^[76], 外泌体CA9的AUC为0.837, 敏感性为85.18%, 特异性为83.15%^[77]。总的来说, 尿外泌体可以作为膀胱癌预后或诊断的非侵入性生物标志物, 但目前临床上的数据

仍然有限, 同样需要在前瞻性的大规模临床研究中验证。

8 膀胱癌尿液诊断技术小结与展望

近十年随着多组学技术发展和应用, 膀胱癌发病机制中的多组学特征被解析, 肿瘤释放于尿液的关键成分或标志物被相继鉴定, 包括DNA、RNA、蛋白质、代谢物、外泌体等。这些尿液诊断标志物在膀胱癌的精准诊疗中显示良好应用前景, 有助于膀胱癌的早期诊断、预后评估、复发监测、肿瘤残留判断, 为泌尿外科医生及时发现患者病情变化并调整治疗方案, 预测膀胱癌复发及进展提供重要科学依据。

由于肿瘤存在异质性, 某些标志物不可能在全部肿瘤中均出现。所以面对单一类型诊断标志物的局限性, 近年来不同类型标志物组合, 如DNA甲基化、突变、CNV改变中的两两联合, 展示出比单一标志物更优的诊断性能。但多标志物检测的复杂性, 也限制了

其临床应用。尤其是通过高通量测序方法来检测, 标志物检测数更多更全面, 但费用更高, 耗时更长, 难以及时给临床医生提供诊疗依据, 此外依赖测序仪检测, 也限制其难以在基层医院开展。为了更清晰地展示各类膀胱癌尿液诊断标志物和技术的优缺点, 我们将这些信息汇总在表2中。

本文介绍的研究中, 除了ONECUT2和VIM基因DNA甲基化获得了中国的医疗器械注册证, 其他新型标志物尚未在国内获批。此外, 大部分的研究队列较小且建立在回顾性研究上, 证据水平较低, 而且还未获得相应的临床上市注册证。因此, 仍需要通过开展前瞻性、多中心、大规模的临床验证研究, 获得更充分和高级别的临床证据, 真正为临床诊疗策略提供科学依据。

随着人工智能技术的发展, 多组学信息整合应用是发展的大趋势。整合尿液标志物、影像学、病理学等资料, 实现膀胱癌个体化精准诊疗, 是泌尿外科未来发展的方向和努力实现的目标。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209–249
- 2 Han B, Zheng R, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022. *J Natl Cancer Center*, 2024, 4: 47–53
- 3 Li K, Lin T, Xue W, et al. Current status of diagnosis and treatment of bladder cancer in China—analyses of Chinese Bladder Cancer Consortium database. *Asian J Urol*, 2015, 2: 63–69
- 4 Comp  rat E, Varinot J, Moroch J, et al. A practical guide to bladder cancer pathology. *Nat Rev Urol*, 2018, 15: 143–154
- 5 Huang J, Liu H. Current status of management of non-muscle invasive bladder cancer. *Chin J Urol*, 2019, 40: 481–484
- 6 Leal J, Luengo-Fernandez R, Sullivan R, et al. Economic burden of bladder cancer across the European Union. *Eur Urol*, 2016, 69: 438–447
- 7 Babjuk M, Burger M, Capoun O, et al. European Association of Urology guidelines on non-muscle-invasive bladder cancer (Ta, T1, and carcinoma *in situ*). *Eur Urol*, 2022, 81: 75–94
- 8 Dimashkieh H, Wolff D J, Smith T M, et al. Evaluation of urovisyon and cytology for bladder cancer detection. *Cancer Cytopathol*, 2013, 121: 591–597
- 9 Yafi F A, Brimo F, Steinberg J, et al. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*, 2015, 33: 66.e25–66.e31
- 10 Chakraborty A, Dasari S, Long W, et al. Urine protein biomarkers for the detection, surveillance, and treatment response prediction of bladder cancer. *Am J Cancer Res*, 2019, 9: 1104–1017
- 11 Levy J J, Chan N, Marotti J D, et al. Large-scale validation study of an improved semiautonomous urine cytology assessment tool: AutoParis-X. *Cancer Cytopathol*, 2023, 131: 637–654
- 12 Chrzanowska N M, Kowalewski J, Lewandowska M A. Use of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in diagnosis and tailored therapies in solid tumors. *Molecules*, 2020, 25: 1864
- 13 Lin T, Liu Z, Liu L, et al. Prospective evaluation of fluorescence *in situ* hybridization for diagnosing urothelial carcinoma. *Oncol Lett*, 2017, 13: 3928–3934

- 14 Soria F, Droller M J, Lotan Y, et al. An up-to-date catalog of available urinary biomarkers for the surveillance of non-muscle invasive bladder cancer. [World J Urol](#), 2018, 36: 1981–1995
- 15 Oeyen E, Hoekx L, De Wachter S, et al. Bladder cancer diagnosis and follow-up: the current status and possible role of extracellular vesicles. [Int J Mol Sci](#), 2019, 20: 821
- 16 Wolfs J R E, Hermans T J N, Koldewijn E L, et al. Novel urinary biomarkers ADXBLADDER and Bladder EpiCheck for diagnostics of bladder cancer: a review. [Urol Oncol](#), 2021, 39: 161–170
- 17 Raitanen M P, Aine R, Rintala E, et al. Differences between local and review urinary cytology in diagnosis of bladder cancer. An interobserver multicenter analysis. [Eur Urol](#), 2002, 41: 284–289
- 18 Lebre T, Paoletti X, Pignot G, et al. Artificial intelligence to improve cytology performance in urothelial carcinoma diagnosis: results from validation phase of the French, multicenter, prospective VISIOCYT1 trial. [World J Urol](#), 2023, 41: 2381–2388
- 19 Tsuji K, Kaneko M, Harada Y, et al. A fully automated artificial intelligence system to assist pathologists' diagnosis to predict histologically high-grade urothelial carcinoma from digitized urine cytology slides using deep learning. [Eur Urol Oncol](#), 2024, 7: 258–265
- 20 Wu S, Shen R, Hong G, et al. Development and validation of an artificial intelligence-based model for detecting urothelial carcinoma using urine cytology images: a multicentre, diagnostic study with prospective validation. [eClinicalMedicine](#), 2024, 71: 102566
- 21 Allory Y, Beukers W, Sagrera A, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. [Eur Urol](#), 2014, 65: 360–366
- 22 Avogbe P H, Manel A, Vian E, et al. Urinary TERT promoter mutations as non-invasive biomarkers for the comprehensive detection of urothelial cancer. [eBioMedicine](#), 2019, 44: 431–438
- 23 Hosen M I, Sheikh M, Zvereva M, et al. Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: evidence from the Golestan Cohort Study. [eBioMedicine](#), 2020, 53: 102643
- 24 Springer S U, Chen C H, Rodriguez Pena M D C, et al. Non-invasive detection of urothelial cancer through the analysis of driver gene mutations and aneuploidy. [eLife](#), 2018, 7: e32143
- 25 Rodriguez Pena M D C, Springer S U, Taheri D, et al. Performance of novel non-invasive urine assay UroSEEK in cohorts of equivocal urine cytology. [Virchows Arch](#), 2020, 476: 423–429
- 26 Dudley J C, Schroers-Martin J, Lazzareschi D V, et al. Detection and surveillance of bladder cancer using urine tumor DNA. [Cancer Discov](#), 2019, 9: 500–509
- 27 Chauhan P S, Chen K, Babbra R K, et al. Urine tumor DNA detection of minimal residual disease in muscle-invasive bladder cancer treated with curative-intent radical cystectomy: a cohort study. [PLoS Med](#), 2021, 18: e1003732
- 28 Pös O, Radvanszky J, Buglyó G, et al. DNA copy number variation: main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. [Biomed J](#), 2021, 44: 548–559
- 29 Wadhwa N, Mathew B B, Jatawa S K, et al. Genetic instability in urinary bladder cancer: genetic instability in urinary bladder cancer. [J Postgrad Med](#), 2013, 59: 284–288
- 30 Liu H, He W, Wang B, et al. MALBAC-based chromosomal imbalance analysis: a novel technique enabling effective non-invasive diagnosis and monitoring of bladder cancer. [BMC Cancer](#), 2018, 18: 659
- 31 Thompson S L, Bakhom S F, Compton D A. Mechanisms of chromosomal instability. [Curr Biol](#), 2010, 20: R285–R295
- 32 Li J, Hubisz M J, Earle E M, et al. Non-cell-autonomous cancer progression from chromosomal instability. [Nature](#), 2023, 620: 1080–1088
- 33 Zeng S, Ying Y, Xing N, et al. Noninvasive detection of urothelial carcinoma by cost-effective low-coverage whole-genome sequencing from urine-exfoliated cell DNA. [Clin Cancer Res](#), 2020, 26: 5646–5654
- 34 Ying Y, Zhang Z, Xing N, et al. Preoperative urine sediment chromosomal instability level predicts urothelial cancer prognosis. [Urol Oncol](#), 2023, 41: 433.e1–433.e7
- 35 Davalos V, Esteller M. Cancer epigenetics in clinical practice. [CA Cancer J Clin](#), 2023, 73: 376–424
- 36 Chatterjee A, Rodger E J, Eccles M R. Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis. [Semin Cancer Biol](#), 2018, 51: 149–159
- 37 Chen X, Zhang J, Ruan W, et al. Urine DNA methylation assay enables early detection and recurrence monitoring for bladder cancer. [J Clin Invest](#), 2020, 130: 6278–6289
- 38 Ruan W, Chen X, Huang M, et al. A urine-based DNA methylation assay to facilitate early detection and risk stratification of bladder cancer. [Clin Epigenet](#), 2021, 13: 91

- 39 Witjes J A, Morote J, Cornel E B, et al. Performance of the Bladder EpiCheckTM methylation test for patients under surveillance for non-muscle-invasive bladder cancer: results of a multicenter, prospective, blinded clinical trial. *Eur Urol Oncol*, 2018, 1: 307–313
- 40 D'Andrea D, Soria F, Zehetmayer S, et al. Diagnostic accuracy, clinical utility and influence on decision-making of a methylation urine biomarker test in the surveillance of non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int*, 2019, 123: 959–967
- 41 Bosschieter J, Nieuwenhuijzen J A, Hentschel A, et al. A two-gene methylation signature for the diagnosis of bladder cancer in urine. *Epigenomics*, 2019, 11: 337–347
- 42 Hentschel A E, Beijert I J, Bosschieter J, et al. Bladder cancer detection in urine using DNA methylation markers: a technical and prospective preclinical validation. *Clin Epigenet*, 2022, 14: 19
- 43 Wang P, Shi Y, Zhang J, et al. UCseek: ultrasensitive early detection and recurrence monitoring of urothelial carcinoma by shallow-depth genome-wide bisulfite sequencing of urinary sediment DNA. *eBioMedicine*, 2023, 89: 104437
- 44 Yang K, Hu H, Wu J, et al. Letter to the Editor: clinical utility of urine DNA for noninvasive detection and minimal residual disease monitoring in urothelial carcinoma. *Mol Cancer*, 2023, 22: 25
- 45 Valenberg F J P, Hiar A M, Wallace E, et al. Prospective validation of an mRNA-based urine test for surveillance of patients with bladder cancer. *Eur Urol*, 2019, 75: 853–860
- 46 Singer G, Ramakrishnan V M, Rogel U, et al. The role of new technologies in the diagnosis and surveillance of non-muscle invasive bladder carcinoma: a prospective, double-blinded, monocentric study of the XPERT[®] bladder cancer monitor and narrow band Imaging[®] cystoscopy. *Cancers*, 2022, 14: 618
- 47 Martens-Uzunova E S, Böttcher R, Croce C M, et al. Long noncoding RNA in prostate, bladder, and kidney cancer. *Eur Urol*, 2014, 65: 1140–1151
- 48 Yu X, Wang R, Han C, et al. A panel of urinary long non-coding RNAs differentiate bladder cancer from urocystitis. *J Cancer*, 2020, 11: 781–787
- 49 Bartel D P. Metazoan microRNAs. *Cell*, 2018, 173: 20–51
- 50 Suarez-Cabrera C, Estudillo L, Ramón-Gil E, et al. BlaDimiR: a urine-based miRNA score for accurate bladder cancer diagnosis and follow-up. *Eur Urol*, 2022, 82: 663–667
- 51 Lin H, Shi X, Li H, et al. Urinary exosomal miRNAs as biomarkers of bladder cancer and experimental verification of mechanism of miR-93-5p in bladder cancer. *BMC Cancer*, 2021, 21: 1293
- 52 Chou R, Gore J L, Buckley D, et al. Urinary biomarkers for diagnosis of bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, 2015, 163: 922–931
- 53 Todenhöfer T, Hennenlotter J, Kühs U, et al. Influence of urinary tract instrumentation and inflammation on the performance of urine markers for the detection of bladder cancer. *Urology*, 2012, 79: 620–625
- 54 Cserhalmi M, Papp A, Brandus B, et al. Regulation of regulators: role of the complement factor H-related proteins. *Semin Immunol*, 2019, 45: 101341
- 55 Stoeber K, Tlsty T D, Happerfield L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*, 2001, 114: 2027–2041
- 56 Stoeber K, Swinn R, Prevost A T, et al. Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94: 1071–1079
- 57 Dudderidge T, Stockley J, Nabi G, et al. A novel, non-invasive test enabling bladder cancer detection in urine sediment of patients presenting with haematuria—a prospective multicentre performance evaluation of ADXBLADDER. *Eur Urol Oncol*, 2020, 3: 42–46
- 58 Roupret M, Gontero P, McCracken S R C, et al. Diagnostic accuracy of MCM5 for the detection of recurrence in nonmuscle invasive bladder cancer followup: a blinded, prospective cohort, multicenter European study. *J Urol*, 2020, 204: 685–690
- 59 Southgate J, Harnden P, Trejdosiewicz L K. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histol Histopathol*, 1999, 14: 657–664
- 60 Sánchez-Carbayo M, Espasa A, Chinchilla V, et al. New electrochemiluminescent immunoassay for the determination of CYFRA 21-1: analytical evaluation and clinical diagnostic performance in urine samples of patients with bladder cancer. *Clin Chem*, 1999, 45: 1944–1953
- 61 Huang Y L, Chen J, Yan W, et al. Diagnostic accuracy of cytokeratin-19 fragment (CYFRA 21-1) for bladder cancer: a systematic review and meta-analysis. *Tumor Biol*, 2015, 36: 3137–3145
- 62 Leiblich A. Recent developments in the search for urinary biomarkers in bladder cancer. *Curr Urol Rep*, 2017, 18: 100
- 63 Miyake M, Morizawa Y, Hori S, et al. Diagnostic and prognostic role of urinary collagens in primary human bladder cancer. *Cancer Sci*, 2017,

108: 2221–2228

- 64 Lei Q, Zhao L, Ye S, et al. Rapid and quantitative detection of urinary Cyfra21-1 using fluorescent nanosphere-based immunochromatographic test strip for diagnosis and prognostic monitoring of bladder cancer. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47: 4266–4272
- 65 Ecke T H, Weiß S, Stephan C, et al. UBC® rapid test—a urinary point-of-care (POC) assay for diagnosis of bladder cancer with a focus on non-muscle invasive high-grade tumors: results of a multicenter-study. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3841
- 66 Hirasawa Y, Pagano I, Chen R, et al. Diagnostic performance of Oncuria™, a urinalysis test for bladder cancer. *J Transl Med*, 2021, 19: 141
- 67 Carapito Â, Roque A C A, Carvalho F, et al. Exploiting volatile fingerprints for bladder cancer diagnosis: a scoping review of metabolomics and sensor-based approaches. *Talanta*, 2024, 268: 125296
- 68 Jian Y, Zhang N, Liu T, et al. Artificially intelligent olfaction for fast and noninvasive diagnosis of bladder cancer from urine. *ACS Sens*, 2022, 7: 1720–1731
- 69 Lett L, George M, Slater R, et al. Investigation of urinary volatile organic compounds as novel diagnostic and surveillance biomarkers of bladder cancer. *Br J Cancer*, 2022, 127: 329–336
- 70 Bhattacharyya N, Mukherjee D, Singh S, et al. “Seeing” invisible volatile organic compound (VOC) marker of urinary bladder cancer: a development from bench to bedside prototype spectroscopic device. *Biosens Bioelectron*, 2022, 218: 114764
- 71 Yang Y, Miao L, Lu Y, et al. Exosome, the glass slipper for Cinderella of cancer—bladder cancer? *J Nanobiotechnol*, 2023, 21: 368
- 72 Lee J, Park H S, Han S R, et al. Alpha-2-macroglobulin as a novel diagnostic biomarker for human bladder cancer in urinary extracellular vesicles. *Front Oncol*, 2022, 12: 976407
- 73 Yazarlou F, Mowla S J, Kholghi Oskoei V, et al. Urine exosome gene expression of cancer-testis antigens for prediction of bladder carcinoma. *Cancer Manag Res*, 2018, Volume 10: 5373–5381
- 74 Andreu Z, Otta Oshiro R, Redruello A, et al. Extracellular vesicles as a source for non-invasive biomarkers in bladder cancer progression. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 98: 70–79
- 75 Zhan Y, Du L, Wang L, et al. Expression signatures of exosomal long non-coding RNAs in urine serve as novel non-invasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Mol Cancer*, 2018, 17: 142
- 76 Igami K, Uchiumi T, Shiota M, et al. Extracellular vesicles expressing CEACAM proteins in the urine of bladder cancer patients. *Cancer Sci*, 2022, 113: 3120–3133
- 77 Wen J, Yang T, Mallouk N, et al. Urinary exosomal CA9 mRNA as a novel liquid biopsy for molecular diagnosis of bladder cancer. *Int J Nanomedicine*, 2021, Volume 16: 4805–4811

Research and application of urinary diagnostic markers and assays for bladder cancer

LIU Chu, ZHANG ChengJunYu, CHEN ZeHua, Pan BoLin & CHEN Xu

Department of Urology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Bladder cancer is one of the most prevalent malignant tumors of the urinary system, which has become a major disease threatening human health worldwide. The current gold standards for diagnosis of bladder cancer are cystoscopy and pathology of biopsy, which are invasive and painful. For decades, researchers have been working towards identifying and developing non-invasive urinary tumor markers for the detection of bladder cancer. Currently, it has been discovered that various components or markers present in urine, such as exfoliated cells, DNA, RNA, proteins, metabolites, and exosomes, perform well and may be applied widely in early detection, prognosis assessment, recurrence monitoring, and residual tumor determination of bladder cancer. Diagnostic kits like UriFind and Bladder Epicheck have already received market approval. Furthermore, artificial intelligence technology is being utilized in cytology diagnosis to not only address the issue of low sensitivity but also enhance efficiency. This article reviews the progress made in recent years regarding urine diagnostic markers and assays for precision diagnosis and treatment of bladder cancer, it also offers insights into future development and serves as a reference for clinicians and researchers.

bladder cancer, urine markers, DNA methylation, precision diagnostics, artificial intelligence

doi: [10.1360/SSV-2024-0099](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0099)



陈旭, 中山大学孙逸仙纪念医院研究员、副主任医师、泌尿外科肿瘤亚专科副主任。国家自然科学基金优秀青年科学基金获得者, 国家重点研发项目青年科学家, 广东省杰出青年基金获得者。长期从事膀胱癌发病机制和转化应用研究: 开发了尿液无创精准诊断膀胱癌技术UriFind, 已获中国医疗器械注册证和临床转化应用; 揭示了膀胱癌微环境中细胞相互作用和基因调控网络; 基于合成生物学开发了精准识别肿瘤的基因治疗技术。以第一作者和通讯作者在*Journal of Clinical Investigation*, *Clinical Cancer Research*, *Cancer Research*, *Advanced Science*等国际知名杂志发表SCI论文30余篇, 荣获国家科学技术进步奖二等奖(第三完成人), 广东省科技进步奖一等奖(第三完成人), 广东医学科技奖一等奖(第三完成人), 以及“人民好医生·金山茶花计划”优秀典范奖。