· 论著 ·

基于 36 基因标签的非肌层浸润性膀胱癌复发预测模型及中国队列验证

董丽媛*,彭 云*,宋宇轩,李晓阳,杜依青△,徐 涛
(北京大学人民医院泌尿外科,北京 100044)

[摘 要] **目的**:构建基于 RNA 表达的非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)的复发预测模型,在中国队列中验证其有效性,并探讨潜在的生物学机制。**方法**:基于欧洲尿路上皮癌分子分型联盟(Urothelial Cancer Molecular Classification Consortium, UROMOL)多中心队列(n=535)的转录组数据,采用最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)Cox 回归筛选预后基因并构建风险评分模型,并根据评分将患者分为高风险组和低风险组。通过 Bootstrap 重抽样和 10 折交叉验证进行内部验证,在北京大学人民医院独立的中国队列(n=85)中进行外部验证。采用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)探索高风险组和低风险组的生物学差异。**结果**:从 12 170 个基因中筛选出 36 个构建模型,训练队列中,模型一致性指数(concordance index, C-index)为 0.702(95% *CI*:0.664~0.740),1、3、5 年曲线下面积(area under curve, AUC)分别为 0.782、0.811、0.799;高风险组与低风险组 5 年无复发生存率相比,差异有统计学意义(35.2% *vs.* 72.8%,Log-rank P<0.001)。内部验证显示,模型稳定性良好(C-index 分别为 0.702 和 0.708),在独立的中国验证队列中,模型的 C-index 为 0.685(95% *CI*:0.631~0.739),1、3、5 年的 AUC 分别为 0.705、0.743、0.665,预测效能与欧洲癌症研究与治疗组织(European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC)评分(C-index=0.652)相当。GSEA 分析显示,低风险组富集于能量代谢和蛋白质稳态通路,高风险组富集于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑和细胞黏附通路。**结论**:本研究构建的 36 基因模型在独立的中国队列中显示出稳定的预测效能,与经典 EORTC 系统的预测效能相当,并揭示了能量代谢和 ECM 重塑等关键通路在 NMIBC 复发中的作用,为中国患者的个体化治疗提供了分子依据。

[关键词] 非肌层浸润性膀胱癌;肿瘤复发;预测;基因标签;队列研究
[中图分类号] R737.14 [文献标志码] A [文章编号] 1671-167X(2026)04-0794-09
doi:10.19723/j.issn.1671-167X.2026.04.016

Development of a 36-gene signature for predicting recurrence in non-muscle-invasive bladder cancer and validation in a Chinese cohort

DONG Liyuan*, PENG Yun*, SONG Yuxuan, LI Xiaoyang, DU Yiqing△, XU Tao
(Department of Urology, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China)

ABSTRACT **Objective**: To develop a transcriptomic-based recurrence prediction model for non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), to comprehensively validate its efficacy in an independent Chinese cohort, and to explore the underlying biological mechanisms driving tumor recurrence. **Methods**: Transcriptome profiling data from the multicenter European Urothelial Cancer Molecular Classification Consortium (UROMOL) cohort (n=535) were used as the training cohort. The least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) Cox regression was employed to identify prognostic genes and construct a risk score model. Internal validation was strictly performed using Bootstrap resampling and 10-fold cross-validation. External validation was conducted in an independent Chinese cohort (n=85) from Peking University People's Hospital. Gene set enrichment analysis (GSEA) was applied to elucidate the distinct biological differences between high- and low-risk groups. **Results**: A 36-gene prognostic signature was identified from 12 170 genes to construct the risk score model. In the training cohort, the model achieved a concordance index (C-index) of 0.702 (95% *CI*: 0.664–0.740), with 1-, 3-, and 5-year areas under the receiver operating characteristic curve (AUC) of 0.782, 0.811, and 0.799, respectively. The 5-year recurrence-free survival (RFS) rates for the high- and low-risk groups were 35.2% and 72.8%,

基金项目:科技创新 2030-"癌症、心脑血管、呼吸和代谢性疾病防治研究"国家科技重大专项(2024ZD0525700)、国家自然科学基金(82471866、82472912)、北京市自然科学基金(L252190) Supported by the Noncommunicable Chronic Diseases-National Science and Technology Major Project (2024ZD0525700), the National Natural Science Foundation of China (82471866, 82472912) and the Beijing Natural Science Foundation (L252190)

△ Corresponding author's e-mail, duyiqing@bjmu.edu.cn
* These authors contributed equally to this work

网络出版时间:2026-05-13 15:32:34 **网络出版地址**:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20260513.1435.002.html

respectively (Log-rank $P < 0.001$). Internal validation via Bootstrap (C-index = 0.702) and 10-fold cross-validation (C-index = 0.708) demonstrated robust stability. In the independent Chinese validation cohort, the model maintained a favorable C-index of 0.685 (95% *CI*: 0.631 – 0.739), with 1-, 3-, and 5-year AUC of 0.705, 0.743, and 0.665, respectively. Its predictive performance was comparable to the traditional European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) risk score (C-index = 0.652). GSEA revealed that the low-risk group was enriched in energy metabolism and protein homeostasis pathways, while the high-risk group was associated with extracellular matrix (ECM) remodeling and cell adhesion pathways. **Conclusion**: The 36-gene signature developed in this study demonstrates favorable predictive performance and stability across both the training and independent Chinese cohorts. While exhibiting comparable predictive efficacy to the traditional EORTC scoring system, the model serves as an independent prognostic factor that provides crucial supplementary molecular stratification. Furthermore, the model underscores the critical roles of energy metabolism and ECM remodeling in NMIBC recurrence, providing a valuable molecular basis for precise individualized management of NMIBC patients in China.

KEY WORDS Non-muscle-invasive bladder cancer; Neoplasm recurrence; Prediction; Gene signatures; Cohort studies

非肌层浸润性膀胱癌(non-muscle-invasive bladder cancer, NMIBC)约占新发膀胱癌的70% ~75%[1],是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。尽管NMIBC患者的整体生存预后较好,但其极高的术后复发率仍是临床诊疗中的重大挑战。据统计,患者在接受经尿道膀胱肿瘤切除术(transurethral resection of bladder tumor, TURBT)后,5年内复发风险高达30% ~70%,且10% ~20%的患者会进展为肌层浸润性膀胱癌[2]。频繁的复发不仅严重损害患者的生活质量,还意味着长期、高频率的膀胱镜随访及重复手术治疗,给患者家庭及社会医疗资源造成了沉重的负担。因此,精准识别复发高危群体并制定个体化诊疗方案,是改善NMIBC患者预后的关键。

目前,NMIBC的风险分层主要依赖于传统临床病理特征,其中,欧洲癌症研究与治疗组织(European Organization for Research and Treatment of Cancer, EORTC)的风险评分系统是国际上应用最广泛的预测工具[3],该系统综合考虑肿瘤数目、大小、既往复发史、T分期、是否伴原位癌和肿瘤分级6个临床病理因素对预后进行评估。然而,EORTC评分系统存在区分效能有限、对中危患者的分层能力不足等问题[4-5]。更重要的是,EORTC评分主要基于欧美人群建立,在中国人群中的适用性和准确性不佳[6-7],无法全面反映NMIBC复发的分子异质性,难以捕捉肿瘤在基因表达、代谢重编程和微环境改变等层面的复杂生物学特征。这些问题凸显了开发基于分子标志物、适用于中国人群的精准预测模型的临床需求。

近年来,高通量转录组测序技术的迅速发展为构建基于基因表达谱的预后模型提供了技术基础[8]。最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)Cox回归作为处理高维数据的有效筛选手段,能在保留关键预后特征的同时防止模型过拟合,具备良好的临床实用性[9]。尽管已有部分基于分子标志物的预后模型问世,但多数研究缺乏中国人群队列的独立验证,或因生物学机制解析不足、模型纳入基因过多导致临床转化成本高昂。

本研究基于大样本公共数据库——欧洲尿路上皮癌分子分型联盟(Urothelial Cancer Molecular Classification Consortium, UROMOL)队列($n = 535$)构建基于RNA表达的预后模型,并结合本中心独立的中国NMIBC验证队列($n = 85$)对其预测效能进行评估,旨在为中国NMIBC患者的风险评估提供更精准的分子工具,并探讨复发背后的生物学机制。

1　资料与方法

1.1　研究对象

训练队列:采用欧洲UROMOL多中心队列数据[10],纳入535例NMIBC患者,具有完整的RNA测序数据和临床随访信息。纳入标准:(1)病理确诊的NMIBC[原位癌(carcinoma *in situ*, CIS)、Ta或T1期];(2)具有合格的RNA测序数据。排除标准:(1)既往接受过根治性膀胱切除术;(2)合并其他恶性肿瘤;(3)RNA测序数据质量不合格。

验证队列:收集北京大学人民医院泌尿外科2018年7月至2023年4月收治的85例NMIBC患者。纳入标准与训练队列相同。

所有患者均签署知情同意书,本研究获得北京大学人民医院医学伦理委员会批准(2019PHB268-01)。

所有患者术后均规律随访。随访方案:术后的前2年每3个月复查膀胱镜,第3 ~5年每6个月复查一次,5年后每年复查一次,直至复发、进展、死亡或末次随访。复发定义为膀胱镜检查发现新发肿瘤并经病理证实。截至末次随访,本研究队列无患者

失访。因非膀胱癌原因死亡的 3 例患者(3.5%),在无复发生存期(recurrence-free survival, RFS)分析中作截尾处理。

1.2 RNA 测序和数据处理

UROMOL 队列的 RNA 测序原始数据已由原研究团队完成质控、比对和定量[10]。采用 edgeR 包进行组间标准化,为减少噪声,本研究对基因进行筛选:(1)去除非编码 RNA(除长链非编码 RNA 外);(2)去除线粒体基因;(3)去除低表达基因(定义为跨样本平均表达量 >0),最终保留 12 170 个蛋白编码基因。验证队列的组织样本 RNA 提取采用 TRIzol 试剂,文库构建采用 TruSeq 链特异性 mRNA 文库制备试剂盒,在 Illumina NovaSeq 6000 平台进行双端 150 bp 测序。原始数据采用 fastp 软件进行质控,使用 Hisat2 比对至 GRCh38 参考基因组,采用 StringTie 软件进行定量,最终以每百万转录本数(transcripts per million, TPM)标准化值呈现。

1.3 预后模型的构建

采用两步特征选择策略:(1)单因素 Cox 回归预筛选:对 12 170 个基因分别进行单因素 Cox 比例风险回归,以 RFS 为结局指标,以 $P<0.01$ 标准筛选出 2 670 个候选基因;(2)LASSO-Cox 回归建模:采用 10 折交叉验证的 LASSO-Cox 回归进一步筛选特征,根据“一个标准误规则”选择最优正则化参数(lambda.1se),最终纳入 36 个非零系数基因。使用 LASSO 导出的系数,为每位患者计算连续的 RNA 风险评分作为 36 个基因表达值的加权线性组合。风险评分计算公式:风险评分 = $\Sigma(\beta i \times$ 基因 i 表达量),其中,βi 为基因 i 的 LASSO 系数。以风险评分中位数为界,将患者分为高风险组和低风险组。

1.4 模型评估和验证

模型评价指标包括 Harrell's 一致性指数(concordance index, C-index)、时间依赖性受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线下面积(area under curve, AUC)、Kaplan-Meier 生存曲线和 Log-rank 检验。内部验证采用 Bootstrap 验证(1 000 次重采样)评估稳定性,10 折交叉验证评估泛化能力。两种验证均使用固定的 36 基因和系数计算风险评分。外部验证在独立验证队列中应用训练队列得到的模型参数计算风险评分,评估 C-index、时间依赖性 AUC 和生存分层能力。

1.5 敏感性分析

采用 4 项敏感性分析评估模型稳健性:(1)留一基因法(leave-one-gene-out)分析:逐个移除基因,评估对 C-index 的影响;(2)噪声鲁棒性(robustness):添加不同水平(0 ~ 50%)的高斯(Gaussian)噪声,每个水平重复 100 次;(3)样本量敏感性:随机抽取 30% ~ 100% 样本,每个比例重复 50 次;(4)基因数量敏感性:按系数绝对值排序,依次选择排名前 5、10、15、20、25、30、36 个基因,评估性能变化。

1.6 生物学功能分析

采用 clusterProfiler 包[11]对 36 个基因进行基因本体(gene ontology, GO)富集分析,包括生物学过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞组分(cellular component, CC)。采用基因集富集分析(gene set enrichment analysis, GSEA)比较高风险组和低风险组的差异通路。假发现率(false discovery rate, FDR)校正后 < 0.05 视为显著。

1.7 统计学分析

采用 R 4.3.0 软件进行统计分析。生存分析使用 survival 包,LASSO 建模使用 glmnet 包,通路分析使用 clusterProfiler 和 enrichplot 包。连续变量以中位数[四分位数间距(interquartile range, IQR)]表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验(Wilcoxon 秩和检验);分类变量采用 χ^2 检验;等级资料采用 Mann-Whitney U 检验;生存曲线比较采用 Log-rank 检验。所有检验均为双侧检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UROMOL 队列和中国验证队列的基线特征

本研究中,UROMOL 训练队列($n=535$)的复发例数为 348 例,复发率为 65.0%;独立的中国验证队列($n=85$)的复发例数为 29 例,复发率为 34.1%,中位随访时间为 61.5(95% *CI*: 59.8 ~ 63.2)个月。两队列基线特征的比较见表 1。在人口学特征方面,两队列表现出较高的一致性,中位年龄分别为 69(IQR: 62.0 ~ 76.0)岁和 67(IQR: 60.0 ~ 74.0)岁,男性占比分别为 77.4% 和 77.6%($P=0.541$),符合膀胱癌流行病学特征。

两队列的临床病理特征存在部分差异。T 分期方面,UROMOL 训练队列以 T1 期为主(74.2%),验证队列以 Ta 期为主(71.8%);肿瘤分级[世界卫生组织(World Health Organization, WHO) 2004/2016 标准]方面,UROMOL 训练队列低级别和高级别肿瘤分别占 59.8% 和 40.2%,验证队列分别占 40.0% 和 47.1%,在整体等级分布上差异无统计学意义($P=0.881$)。值得注意的是,验证队列包含 11 例(12.9%)乳头状尿路上皮肿瘤-低度恶性潜能,而训

练队列无此类病例。EORTC风险分组方面,训练队列由低风险组(60.6%)和高风险组(39.4%)构成,验证队列由低风险组(63.5%)和中风险组(36.5%)构成。上述这些差异反映了不同队列来源、纳入标准和疾病谱的异质性。

表1　训练队列和验证队列患者基线特征的比较

Table 1　Comparison of baseline clinical characteristics between the training and validation cohorts

Variables	Training cohort (n=535)	Validation cohort (n=85)	P
Age/years	69 (62.0-76.0)	67 (60.0-74.0)	0.065
Sex			0.541
Male	414 (77.4)	66 (77.6)	
Female	121 (22.6)	19 (22.4)	
T stage			<0.001
CIS	3 (0.6)	1 (1.2)	
Ta	135 (25.2)	61 (71.8)	
T1	397 (74.2)	23 (27.1)	
Tumor grade			0.881
PUNLMP	0 (0)	11 (12.9)	
Low grade	320 (59.8)	34 (40.0)	
High grade	215 (40.2)	40 (47.1)	
EORTC risk group			0.003
Low risk	324 (60.6)	54 (63.5)	
Intermediate risk	0 (0)	31 (36.5)	
High risk	211 (39.4)	0 (0)	

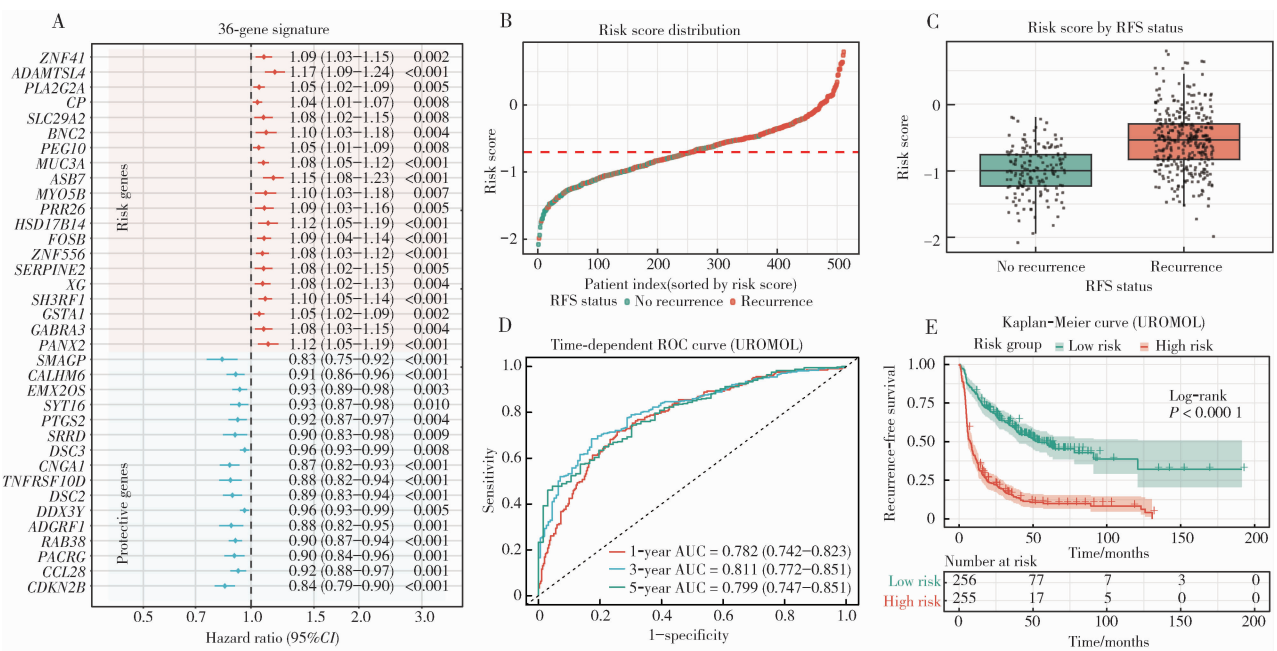
Data are presented as median (interquartile range) or n(%). CIS, carcinoma *in situ*; PUNLMP, papillary urothelial neoplasm of low malignant potential; EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer.

2.2　36基因模型的构建与评估

通过LASSO-Cox回归从2 670个候选基因中筛选出36个基因构建预后模型(附加材料图1A,本文的附加材料见网络版,网址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20260513.1435.002.html,以下同),其中16个为保护性因素[风险比(hazard ratio, *HR*)<1],包括 *CDKN2B*、*CCL28*、*PACRG*、*RAB38* 和 *ADGRF1* 等肿瘤抑制和免疫调节相关基因;20个为危险因素(*HR*>1),包括 *ZNF41*、*ADAMTSL4*、*PLA2G2A*、*CP* 和 *SLC29A2* 等癌症进展和治疗耐药相关基因(图1A)。

在训练队列中,模型显示出优异的判别能力,C-index为0.702(95% *CI*:0.664~0.740),复发患者的风险评分显著高于未复发患者(图1B、C)。1、3、5年的AUC分别为0.782(95% *CI*:0.742~0.823)、0.811(95% *CI*:0.772~0.851)、0.799(95% *CI*:0.747~0.851),见图1D。校准曲线显示,预测概率与实际观察值一致性良好(附加材料图1B)。

风险分层分析显示,高风险组和低风险组(按中位数截断)的5年无复发生存率分别为35.2%和72.8%(*HR*=3.68,95% *CI*:2.85~4.76,Log-rank P<0.000 1,图1E)。三分位数分层的低、中、高风险组5年无复发生存率分别为82.1%、62.4%和35.3%(Log-rank P<0.000 1,附加材料图1C),显示出良好的预后分层能力。



A, forest plot of univariate Cox regression results for the 36 selected genes; B, RNA risk score distribution in the training cohort; C, comparison of risk scores between recurrent and non-recurrent patients; D, time-dependent ROC curves for 1-, 3-, and 5-year RFS prediction; E, Kaplan-Meier RFS curves for low-risk (green) and high-risk (red) groups based on the median cutoff. ROC, receiver operating characteristic; AUC, area under curve; RFS, recurrence-free survival; UROMOL, Urothelial Cancer Molecular Classification Consortium.

图1　训练队列中36基因模型的构建与性能评估

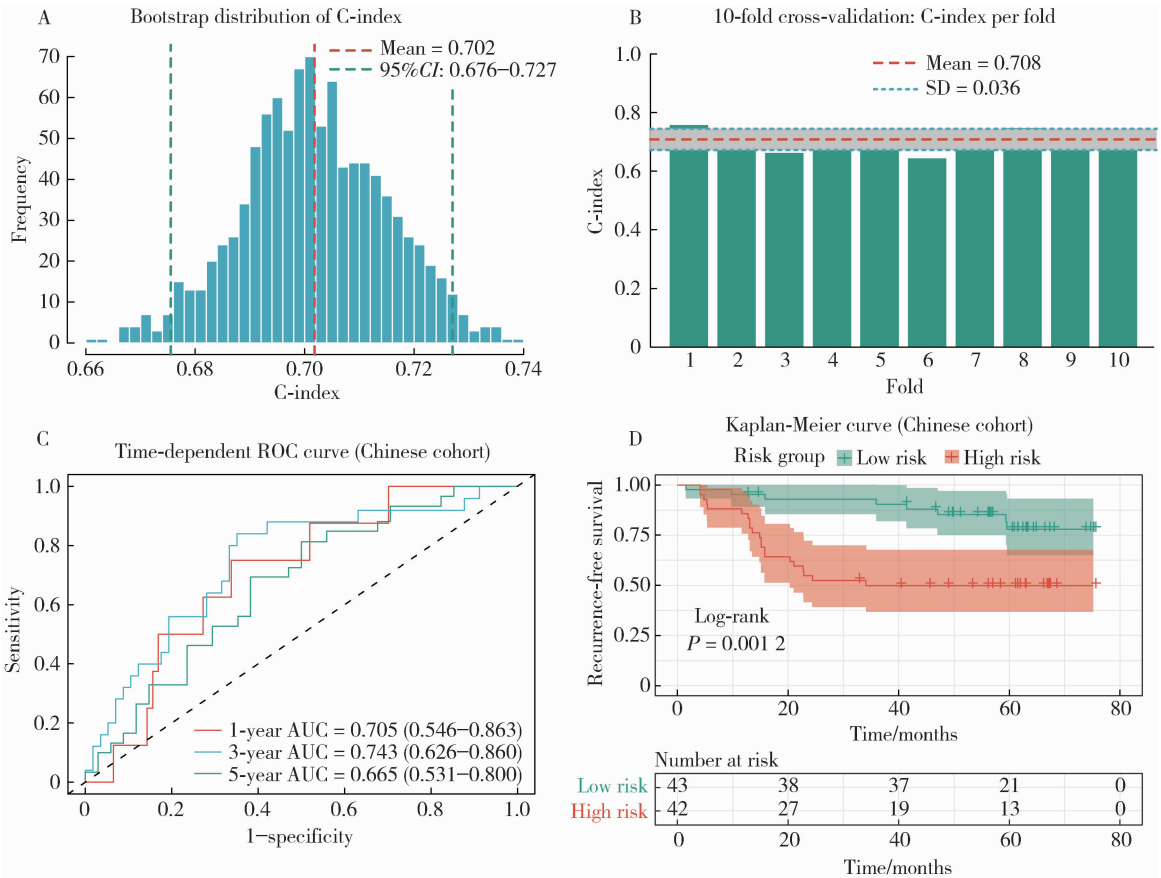
Figure 1　Construction and performance evaluation of the 36-gene signature

2.3 模型的内部和外部验证

在内部验证层面，Bootstrap 验证（1 000 次）显示 C-index 均值为 0.702（95% *CI*：0.676 ~ 0.727），分布稳定（图 2A）。10 折交叉验证平均 C-index 为 0.708 ±0.036，各折间差异无统计学意义（图 2B），证实模型稳定性良好。

在独立中国队列（n = 85）中，模型 C-index 为 0.685（95% *CI*：0.631 ~ 0.739），1、3、5 年的 AUC 分别为 0.705、0.743、0.665（图 2C）。高风险组和低风险组 5 年无复发生存率分别为 38.6% 和 69.4%（*HR* = 3.42，95% *CI*：2.31 ~ 5.07，Log-rank *P* = 0.001 2，图 2D），与训练集结果一致，验证了模型在中国人群中的适用性。

此外，4 项敏感性分析也进一步证实了模型的稳健性（附加材料图 2）：留一基因法分析显示，单基因缺失对 C-index 的影响均 < 0.015（附加材料图 2A），表明预测能力分布于多个基因；噪声鲁棒性分析显示，模型可耐受 30% 高斯噪声而保持≥95% 性能（C-index≥0.667）（附加材料图 2B）；样本量敏感性分析显示，≥300 例样本即可达到近最优性能（附加材料图 2C）；基因数量敏感性分析显示，前 25 个基因即可达 C-index = 0.698（附加材料图 2D），但保留全部 36 个基因可以最大化预测能力和生物学可解释性。



A, Bootstrap distribution of concordance index (C-index) from 1 000 resamples; B, bar plot of C-index across 10-fold cross-validation; C, time-dependent ROC curves for 1-, 3-, and 5-year RFS prediction in the independent Chinese validation cohort; D, Kaplan-Meier RFS curves for low-risk (green) and high-risk (red) groups in the validation cohort. SD, standard deviation; Other abbreviations as in Figure 1.

图 2 模型内部验证及独立中国队列的外部验证

Figure 2 Internal validation and external validation of the model in an independent Chinese cohort

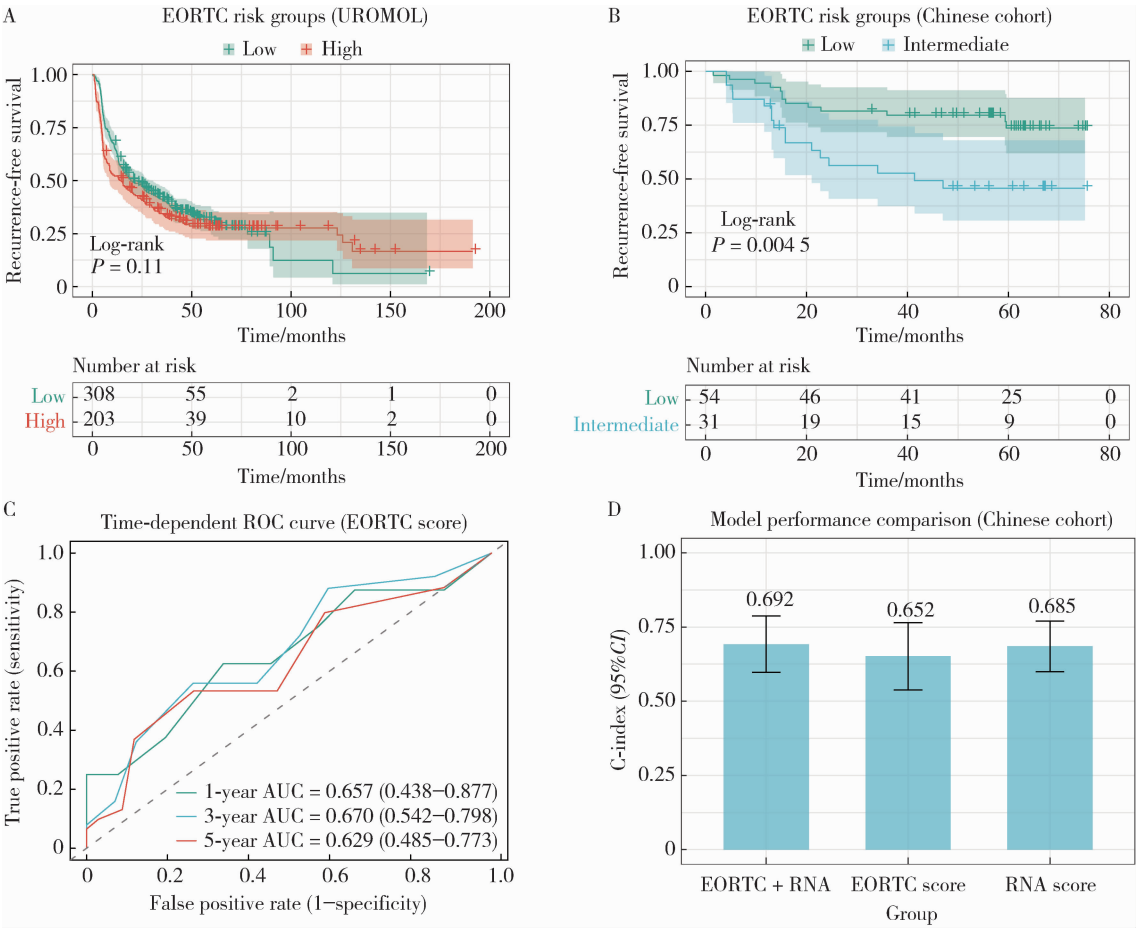
2.4 36 基因模型与 EORTC 评分在中国患者中的预测效能比较

在训练队列中，EORTC 评分在低风险组和高风险组间的生存差异无统计学意义（Log-rank *P* = 0.11，图 3A），提示传统临床病理指标在部分患者亚组中的风险分层能力有限。而在中国验证队列中，EORTC 评分在低风险组和中风险组间显示出一定的预后分离（Log-rank *P* = 0.004 5，图 3B）。EORTC 评分的 C-index 为 0.652（95% *CI*：0.566 ~ 0.738），1、3、5 年 AUC 分别为 0.657、0.670、0.629（图 3C）。尽管 36 基因模型在各项预测指标的数值上略高（C-index = 0.685，1、3、5 年 AUC 分别为 0.705、0.743、0.665），但进一步的 C-index 组间比较显示，两模型的总体预测效能差异无统计学意义（*P* =

0.403)。这表明 36 基因模型在中国 NMIBC 患者中提供了与经典 EORTC 系统相当的预后预测能力。此外,在 EORTC 评分基础上整合 RNA 特征后,预测性能展现出微弱的提升趋势(图 3D),提示分子标志物和传统临床指标在现阶段更多体现为多维度的平行参考,其深层次的互补潜力仍需在未来更大规模的队列中加以验证。

2.5　36 基因模型的生物学特征

通路富集分析显示,36 个基因主要富集于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、细胞黏附和能量代谢等生物学过程(图 4A)。GSEA 揭示了高风险组与低风险组的分子机制差异(图 4B),其中,低风险组显著富集于能量代谢通路(图 4C)和蛋白质稳态通路(图 4D),提示这类肿瘤保持较完善的线粒体氧化代谢和蛋白质质量控制机制,可能经历较少的蛋白毒性应激,从而具有更低的复发倾向;而高风险组则富集于细胞黏附与 ECM 重塑相关通路(图 4E)。上皮间质转化和 ECM 重塑是肿瘤侵袭转移的关键驱动因素[12-13],在 NMIBC 中可能促进肿瘤细胞侵入膀胱壁,增加复发和进展风险,这些发现为高风险肿瘤的侵袭性临床行为提供了分子机制解释。



A, Kaplan-Meier RFS curves according to EORTC risk groups in the training cohort; B, Kaplan-Meier RFS curves according to EORTC risk groups in the validation cohort; C, time-dependent ROC curves for the EORTC score in the validation cohort; D, performance comparison across three models in the validation cohort. EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer; C-index, concordance index; Other abbreviations as in Figure 1.

图 3　36 基因模型与 EORTC 评分预测性能的比较

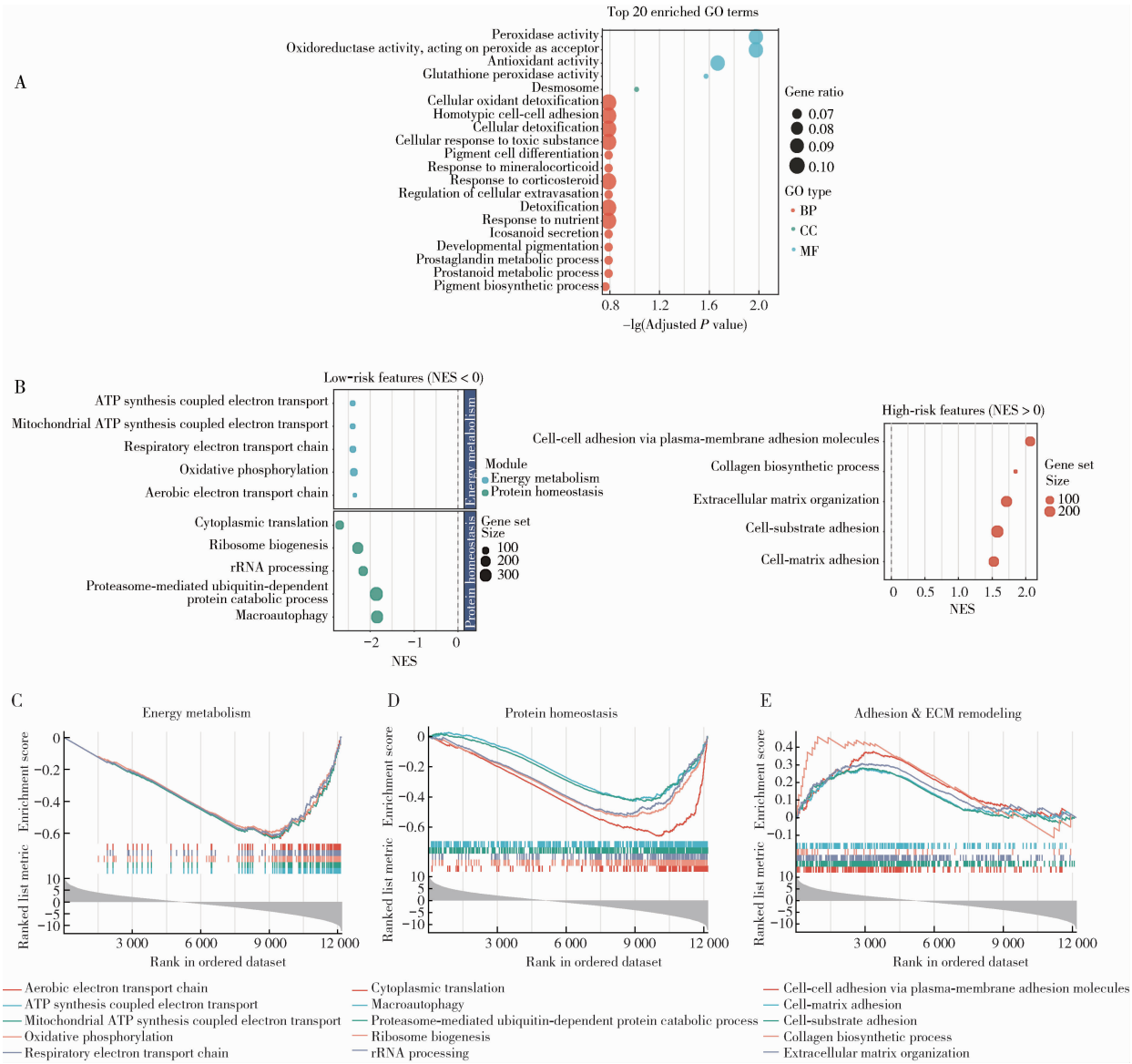
Figure 3　Predictive efficacy in the 36-gene signature and EORTC score

3　讨论

本研究基于大样本 NMIBC 队列转录组数据,通过 LASSO-Cox 回归构建了 36 基因预测模型,在训练队列(C-index = 0.702)和独立中国验证队列(C-index = 0.685)中均显示出良好的判别能力,与 EORTC 评分系统的预测价值(C-index = 0.652)相当,为 NMIBC 患者的精准风险分层提供了分子层面的工具。

EORTC 评分是目前 NMIBC 风险预测的金标准,但多项研究表明,其在亚洲人群中的预测效能不佳[4,14],这凸显了开发适用于中国人群的分子预测

模型的必要性。近年来,有多项研究报道了基于分子标志物的 NMIBC 预后模型,但均存在不同程度的局限性。Lindskrog 等[15]基于 UROMOL 队列开发了分子分型系统,但其依赖于复杂的多组学整合,临床应用门槛较高;Hedegaard 等[10]构建的 12 基因分类器仅在单一队列中被验证,外推性有限;Aine 等[16]报道的 38 基因标签在 C-index 上低于本研究,且未进行独立外部验证。



A, GO enrichment analysis of the 36 signature genes (top 20 pathways ranked by adjusted *P* value shown); B, GSEA bubble plot in high- and low-risk patients; C, GSEA plot of the "Energy metabolism" pathway; D, GSEA plot of the "Protein homeostasis" pathway; E, GSEA plot of the "Adhesion and ECM remodeling" pathway. GO, gene ontology; NES, normalized enrichment score; GSEA, gene set enrichment analysis; ECM, extracellular matrix; BP, biological process; CC, cellular component; MF, molecular function.

图 4 36 基因模型相关的生物学通路和机制

Figure 4 Biological pathways and mechanisms associated with the 36-gene signature

相比之下,本研究具有以下优势:(1)采用两步特征选择策略(单因素 Cox 预筛选联合 LASSO 回归),既避免了超高维数据的不稳定性,又确保了入选基因的预后相关性,提高了模型的生物学可解释性;(2)采用保守的 lambda.1se 参数,有效防止过拟合;(3)双重内部验证(Bootstrap 1 000 次和 10 折交叉验证)证实模型稳定性;(4)系统的敏感性分析(留一基因法、噪声鲁棒性、样本量和基因数量敏感性)在既往 NMIBC 预后研究中较为少见,本研究结果显示,模型可耐受 30% 表达数据噪声且对单基因缺失不敏感;(5)在完全独立的中国队列中进行外部验证(C-index = 0.685),与 Zhang 等[17]的验证结果相当,且训练集样本量更充足,优于多数既往研究[18]。这种跨种族、跨平台的验证策略增强了模型

的可信度和普适性。

在本研究的训练队列中,EORTC评分未能有效区分低风险组和高风险组患者的RFS($P=0.113$),这一现象可能与该队列多中心人群构成的异质性以及随访时间分布有关,同时也凸显了传统临床病理指标在特定人群中评估预后的局限性。EORTC在中国队列中的C-index为0.652,与Cambier等[19]报道的结果相当。虽然本研究的36基因模型在中国队列中的C-index(0.685)相较于EORTC并未表现出统计学上的显著优势($P=0.403$),但该分子模型的临床价值并非在于对传统临床评分的替代,而在于提供深层次的分子维度补充。更重要的是,多因素Cox回归显示,校正EORTC评分、年龄和性别后,RNA风险评分仍为独立预后因素,提示36基因模型捕获了独立于经典临床病理参数的分子异质性信息,二者展现出了从表型到分子水平的跨维度互补潜力,为制定更加个体化的临床策略提供了参考依据。

生物学功能分析揭示了36基因模型的潜在机制。GSEA分析显示,低风险组显著富集于线粒体能量代谢通路(包括氧化磷酸化和ATP合成等),这与瓦尔堡效应(Warburg effect)逆转现象相符,虽然多数恶性肿瘤表现为有氧糖酵解增强[20],但近年来的研究表明,线粒体功能的维持与肿瘤低侵袭性和良好的预后密切相关[21]。Chen等[22]的研究发现褪黑素通过刺激SIRT3/PDH轴逆转瓦尔堡效应,从而抑制肺癌的发展。Jiang等[23]报道,恢复线粒体数量和质量可以逆转瓦尔堡效应并促进神经母细胞瘤分化。

此外,本研究观察到,低风险组富集于蛋白质稳态维持通路,包括核糖体生物发生、蛋白质翻译和泛素-蛋白酶体系统等,这与既往研究一致,即癌细胞因快速增殖和基因突变,产生大量异常蛋白质,依赖蛋白质稳态网络维持生存[24]。这些通路的上调提示肿瘤细胞保持了较完善的蛋白质质量控制机制。高风险组富集于细胞黏附与ECM重塑通路。ECM重塑是肿瘤微环境改变的核心事件,直接参与肿瘤的侵袭、转移和治疗抵抗[12-13]。目前已有多项研究证实ECM重塑促进膀胱癌的复发和进展。Zheng等[25]和Liang等[26]分别通过多组学分析证实,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts,CAFs)通过ECM重塑促进膀胱癌淋巴转移和复发。高风险组富集的细胞黏附通路反映了肿瘤细胞与微环境相互作用增强,可能为肿瘤细胞脱离、迁移和种植创造条件[27]。值得注意的是,这些生物学特征在结直肠癌[28]、乳腺癌[29]和肺癌[30]等多种实体瘤中也与复发和转移密切相关,提示36基因模型捕获了跨癌种的共性分子机制。

本研究的临床应用前景值得期待,36基因模型可在TURBT术后辅助临床医生精准分层,识别真正高风险患者,强化监测和辅助治疗,同时避免对低风险患者的过度治疗。该模型可通过RNA测序或定量PCR等成熟技术实现,具有良好的可操作性。随着测序成本持续下降和精准医学普及,将分子检测纳入NMIBC常规诊疗流程渐趋可行。

本研究也存在一定局限性:首先,中国验证队列样本量相对有限($n=85$),这在一定程度上限制了部分统计效能,未来仍需在更大规模、多中心的中国人群队列中进行前瞻性验证,以进一步确认模型的稳定性和外推性;其次,NMIBC管理的另一重要挑战是进展为肌层浸润性膀胱癌,然而,由于本验证队列的进展事件数较少,故目前仅聚焦于复发风险的预测,未能评估该模型对疾病进展的预测能力,后续应针对疾病进展风险构建专门的预测工具或进行更长期的随访探讨;第三,尽管本研究通过GSEA揭示了生物学机制,但仍属于转录组层面的关联分析,具体分子通路和关键基因在肿瘤复发及微环境重塑中的作用,仍需结合细胞实验和动物模型深入验证;最后,临床应用需经标准化临床试验评估,包括检测方法标准化、成本效益分析和伦理评估等。

综上所述,本研究成功构建并验证了基于36基因标签的NMIBC复发预测模型,该模型在国际大样本队列和独立中国队列中均显示出良好的判别能力、稳定性和可解释性,与经典EORTC系统的预测效能相当,并能提供独立的分子生物学信息。生物学分析揭示了能量代谢、蛋白质稳态和ECM重塑等关键通路在NMIBC复发中的作用,为理解复发机制提供了新视角。本模型有望为NMIBC患者的精准风险分层和个体化治疗提供新工具,未来研究应聚焦于前瞻性多中心验证、多组学整合和临床转化,推动精准医学在膀胱癌诊疗中的应用。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明　董丽媛:设计研究方案,随访患者,整理、分析数据,撰写论文;彭云:核对数据和分析结果,修改论文;宋宇轩、李晓阳:修改论文;杜依青、徐涛:总体把关和审定论文。所有作者均参与论文修改,并对最终文稿进行审读和确认。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA A Cancer J Clin, 2021, 71

(3): 209 – 249.
[2] 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*) [J]. Eur Urol, 2022, 81(1): 75 – 94.
[3] Sylvester RJ, van der Meijden APM, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: A combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials [J]. Eur Urol, 2006, 49(3): 466 – 477.
[4] Ieda T, Muto S, Shimizu F, et al. Development and validation of a novel recurrence risk stratification for initial non-muscle invasive bladder cancer in Asia [J]. EBioMedicine, 2016, 12: 98 – 104.
[5] Busato WFS Jr, Almeida GL, Ribas CAPM, et al. EORTC risk model to predict progression in patients with non-muscle-invasive bladder cancer: Is it safe to use in clinical practice? [J]. Clin Genitourin Cancer, 2016, 14(2): 176 – 182.
[6] 林瑞, 杜君, 张艳辉, 等. EORTC 危险评分系统对 T1 期非肌层浸润性膀胱癌患者的预后评价 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(15): 655 – 658.
[7] Wang H, Ding W, Jiang G, et al. EORTC risk tables are more suitable for Chinese patients with nonmuscle-invasive bladder cancer than AUA risk stratification [J]. Medicine, 2018, 97(36): e12006.
[8] Weinstein JN, Akbani R, Broom BM, et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma [J]. Nature, 2014, 507(7492): 315 – 322.
[9] Tibshirani R. The lasso method for variable selection in the cox model [J]. Stat Med, 1997, 16(4): 385 – 395.
[10] Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, et al. Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma [J]. Cancer Cell, 2016, 30(1): 27 – 42.
[11] Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data [J]. Innovation (Camb), 2021, 2(3): 100141.
[12] Hu Q, Zhu Y, Mei J, et al. Extracellular matrix dynamics in tumor immunoregulation: From tumor microenvironment to immunotherapy [J]. J Hematol Oncol, 2025, 18(1): 65.
[13] Sleeboom JJF, van Tienderen GS, Schenke-Layland K, et al. The extracellular matrix as hallmark of cancer and metastasis: From biomechanics to therapeutic targets [J]. Sci Transl Med, 2024, 16(728): eadg3840.
[14] Ding W, Chen Z, Gou Y, et al. Are EORTC risk tables suitable for Chinese patients with non-muscle-invasive bladder cancer? [J]. Cancer Epidemiol, 2014, 38(2): 157 – 161.
[15] Lindskrog SV, Prip F, Lamy P, et al. An integrated multi-omics analysis identifies prognostic molecular subtypes of non-muscle-invasive bladder cancer [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 2301.
[16] Aine M, Eriksson P, Liedberg F, et al. Biological determinants of bladder cancer gene expression subtypes [J]. Sci Rep, 2015, 5: 10957.
[17] Zhang C, Yin H, Li T, et al. Identification of multicohort-based predictive signature for NMIBC recurrence reveals SDCBP as a novel oncogene in bladder cancer [J]. Ann Med, 2025, 57(1): 2458211.
[18] Zhang S, Wang C, Xia W, et al. Novel ferroptosis-related multigene prognostic models for patients with bladder cancer [J]. Int J Gen Med, 2021, 14: 8651 – 8666.
[19] Cambier S, Sylvester RJ, Collette L, et al. EORTC nomograms and risk groups for predicting recurrence, progression, and disease-specific and overall survival in non-muscle-invasive stage Ta-T1 urothelial bladder cancer patients treated with 1 – 3 years of maintenance bacillus Calmette-Guérin [J]. Eur Urol, 2016, 69(1): 60 – 69.
[20] Warburg O. On the origin of cancer cells [J]. Science, 1956, 123(3191): 309 – 314.
[21] Zhang Y, Yan H, Wei Y, et al. Decoding mitochondria's role in immunity and cancer therapy [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2024, 1879(4): 189107.
[22] Chen X, Hao B, Li D, et al. Melatonin inhibits lung cancer development by reversing the Warburg effect via stimulating the SIRT3/PDH axis [J]. J Pineal Res, 2021, 71(2): e12755.
[23] Jiang H, Tiche SJ, He CJ, et al. Restoring mitochondrial quantity and quality to reverse the Warburg effect and drive neuroblastoma differentiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2025, 122(36): e2502483122.
[24] Zhang C, Li J, Tang Q, et al. Targeting proteostasis for cancer therapy: Current advances, challenges, and future perspectives [J]. Mol Cancer, 2025, 24(1): 265.
[25] Zheng H, An M, Luo Y, et al. PDGFRα$^+$ITGA11$^+$ fibroblasts foster early-stage cancer lymphovascular invasion and lymphatic metastasis via ITGA11-SELE interplay [J]. Cancer Cell, 2024, 42(4): 682 – 700. e12.
[26] Liang T, Tao T, Wu K, et al. Cancer-associated fibroblast-induced remodeling of tumor microenvironment in recurrent bladder cancer [J]. Adv Sci (Weinh, 2023, 10(31): 2303230.
[27] Mai Z, Lin Y, Lin P, et al. Modulating extracellular matrix stiffness: A strategic approach to boost cancer immunotherapy [J]. Cell Death Dis, 2024, 15(5): 307.
[28] Lee CJ, Jang TY, Jeon SE, et al. The dysadherin/MMP9 axis modifies the extracellular matrix to accelerate colorectal cancer progression [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 10422.
[29] Wang H, Zhu YN, Zhang S, et al. Transcriptome-wide analysis reveals potential roles of CFD and ANGPTL4 in fibroblasts regulating B cell lineage for extracellular matrix-driven clustering and novel avenues for immunotherapy in breast cancer [J]. Mol Med, 2025, 31(1): 179.
[30] Wang H, Sun H, Huang J, et al. Therapeutic targeting ERRγ suppresses metastasis via extracellular matrix remodeling in small cell lung cancer [J]. EMBO Mol Med, 2024, 16(9): 2043 – 2059.

(2026-03-02 收稿)
(本文编辑:任英慧)