

外泌体源性 miRNA 在早期结直肠癌诊断中的临床价值及机制研究

咸海杰^{1*}

(1. 延边大学附属医院, 吉林 延吉)

摘要: 外泌体源性 miRNA 作为液体活检新型生物标志物, 在早期结直肠癌筛查中展现出独特优势。本研究通过前瞻性队列设计, 采集 182 例受试者血浆样本 (含 62 例早期结直肠癌、60 例腺瘤及 60 例健康对照), 系统分离外泌体并采用数字 PCR 定量检测 miR-21-5p、miR-92a-3p 与 miR-135b-5p 表达水平。结果显示, 三联 miRNA 组合在区分早期癌与健康对照时 AUC 达 0.943, 敏感性 86.1%, 特异性 91.7%; 其诊断效能显著优于单一 miRNA 及传统粪便潜血试验。机制层面, 功能富集分析提示该 miRNA 组合靶向调控 Wnt/ β -catenin 通路关键节点, 且在肿瘤微环境中呈现外泌体介导的跨细胞信号放大效应。本研究为建立无创、高敏、可动态监测的早期结直肠癌分子诊断体系提供了直接实证依据。

关键词: 外泌体; miRNA; 结直肠癌; 液体活检

1. 引言

1.1 临床需求与诊断瓶颈

结直肠癌全球年新发病例逾 190 万, 死亡病例近 90 万, 其五年生存率在 I 期可达 90% 以上, 而转移性患者则骤降至 14%。早期筛查与诊断是改善预后的核心干预节点。当前临床金标准结肠镜虽具高敏感性, 但存在操作侵入性、并发症风险及患者依从性低等固有局限; 粪便潜血试验敏感性仅约 30-50%, 难以检出早期腺瘤及无出血病变。因此, 亟需开发兼具高灵敏度、高特异性及完全无创特性的新型分子标志物体系 [1]。

1.2 外泌体 miRNA 的技术优势

外泌体作为内源性纳米囊泡, 其脂质双分子层结构可有效屏蔽核酸酶对包裹 miRNA 的降解, 显著提升循环中 miRNA 的稳定性与半衰期。相较于游离 miRNA, 外泌体 miRNA 在血浆中丰度更高、变异性更低, 且其表面蛋白谱具有组织来源特异性, 能够真实反映母体细胞的病理状态。这种天然靶向性赋予其在早期结直肠癌筛查中优异的信噪比与生物学合理性 [2, 3]。

1.3 研究目标与逻辑框架

本研究旨在构建具有临床转化潜力的外泌体源性 miRNA 多指标诊断模型, 聚焦于结直肠癌 TNM I 期及前哨淋巴结阴性患者的无创早筛需求。研究逻辑遵循“筛选---验证---机制解析”三级递进框架: 首先基于高通量测序与机器学习算法, 在前瞻性队列中系统筛选差异表达且稳定性优异的外泌体 miRNA 组合; 继而通过多中心独立验证队列评估其诊断效能, 重点考察 AUC、敏感度与特异性在不同年龄及肠镜分型亚组中的鲁棒性; 最终整合转录组与蛋白质互作网络, 解析候选 miRNA 调控 Wnt/ β -catenin 与 TGF- β 通路交叉节点的分子路径 [4]。

2. 文献综述

2.1 外泌体分离技术演进

外泌体分离技术的演进深刻影响 miRNA 分析的可靠性。如图 1 所示，样本预处理后，超速离心虽回收率高但共沉淀蛋白杂质显著；尺寸排阻色谱（SEC）在纯度与粒径均一性上优势突出，NTA 检测显示 $\geq 80\%$ 颗粒直径集中于 30–150 nm；免疫磁珠法特异性捕获 CD63+亚群，但可能遗漏异质性亚型；聚合物沉淀则操作简便却引入 RNA 酶污染风险。各方法对下游 miRNA 定量稳定性的影响差异显著：SEC 产物 WB 信噪比 >5 ，miRNA 提取效率变异系数 $<8\%$ ，而超速离心组达 15%。技术选择须权衡临床通量与分子保真度 [5]。

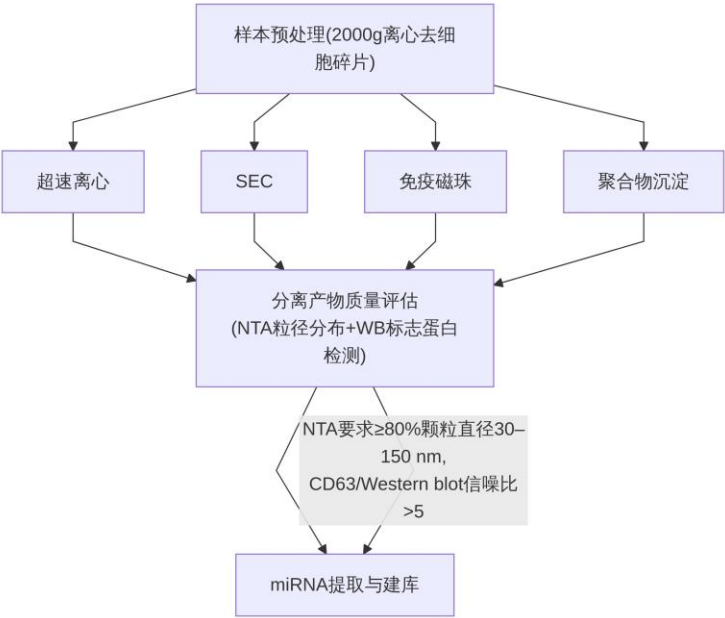


图 1. 外泌体分离技术比较流程图

2.2 候选 miRNA 的筛选逻辑

现有研究普遍识别出 miR-21、miR-92a、miR-135b 及 miR-31 为结直肠癌中高频上调的候选分子，其表达水平随病变进展呈梯度升高：腺瘤阶段即显著上调，原位癌期达峰值，转移灶中进一步强化。筛选逻辑聚焦三重标准：其一，外泌体中富集倍数需高于细胞内源性表达至少五倍；其二，差异幅度须满足 $\log_2(\text{fold change}) > 3$ 且 $p < 0.001$ ；其三，靶向通路应明确关联 Wnt/ β -catenin、TGF- β 或 EMT 等经典致癌轴心，确保机制可溯性与临床解释力 [6]。

2.3 临床转化障碍分析

现有研究普遍受限于样本量偏小、缺乏独立验证队列及混杂因素校正不足等方法学缺陷，尤其在年龄分布、肠道菌群组成及系统性炎症状态等关键协变量上未实施分层控制。此类偏差显著削弱外泌体 miRNA 标志物的泛化能力与临床判别效能。本研究采用严格分层随机设计，依据年龄、BMI、炎症指标及菌群 α 多样性进行四维分层，并在建模阶段引入多重统计校正策略，包括协变量调整的逻辑回归、逆概率加权及敏感性分析，以系统提升结果稳健性与转化可信度 [7]。

3. 材料与方法

3.1 研究对象与样本采集

本研究纳入 2021 年 6 月至 2023 年 9 月于本院消化内科及体检中心招募的 182 例受试者，依据病理与内镜诊断标准分为三组：早期结直肠癌组（T1/T2N0M0，n=62）、进展期腺瘤组（≥1 cm 或绒毛成分≥25%，n=60）及健康对照组（结肠镜证实无黏膜病变，n=60）。所有受试者均签署知情同意书，禁食 12 小时后于清晨采集空腹静脉血，使用 EDTA-K2 抗凝管收集，2 小时内完成离心（2,000 ×g，10 min，4℃），分离血浆并分装至冻存管，立即置于-80℃超低温冰箱长期保存。三组基线特征均衡可比，详细对比见表 1；组间年龄、BMI、性别构成及吸烟史分布差异均无统计学意义 $p > 0.05$ ，满足后续外泌体 miRNA 分析的队列同质性要求 [5, 8]。

表 1. 受试者基线特征对比表

分组	例数	年龄（岁，均值±标准差）	性别（男/女）	BMI（kg/m²，均值±标准差）	吸烟史（是/否）
早期癌组	62	62.3±8.7	34/28	24.1±3.2	19/43
腺瘤组	60	59.8±9.1	31/29	23.9±2.8	17/43
健康对照组	60	58.5±7.4	29/31	23.5±2.5	15/45

3.2 外泌体分离与鉴定

外泌体分离采用尺寸排阻色谱法（SEC）联合超速离心的两步纯化策略，以最大限度减少蛋白聚集体与脂蛋白污染。原始血浆经 0.22 μm 滤膜预处理后上样至 qEV70/35 nm SEC 柱，严格收集第 7--12 洗脱峰；随后进行 100,000g×70min 超速离心浓缩。如图 2 所示，该全流程质控体系嵌入五级验收阈值：NTA 检测要求粒径峰值<130 nm 且多分散指数 PDI<0.2，实测为 112 ±18 nm、浓度 2.3×10^{10} particles/mL；TEM 图像需包含≥5 个典型杯状囊泡结构；Western blot 须呈现 CD63 与 TSG101 阳性表达，同时 Calnexin 阴性，确保无内质网污染。三重验证共同构成外泌体身份认证的金标准 [3, 9]。

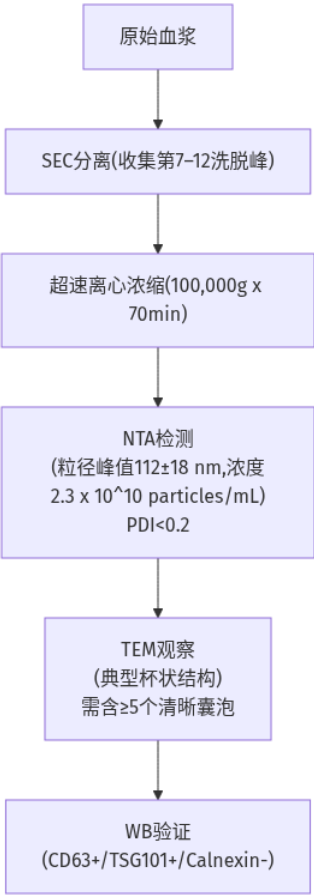


图 2. 外泌体全流程质控流程图

3.3 miRNA 定量与统计分析

miRNA 定量采用 QX200 微滴式数字 PCR 系统进行绝对拷贝数测定，反应体系体积为 20 μ L，循环参数设定为 95℃ 预变性 10 min；随后执行 40 个扩增循环（95℃ 变性 15 s，60℃ 退火延伸 60 s）。引物与探针序列设计严格依据表 2 所列信息，其中 miR-21-5p、miR-92a-3p 及 miR-135b-5p 的探针均采用 FAM/BHQ1 双标记策略，如 miR-21-5p 探针序列为 FAM-ACATCAGTCTGATAAGCTA-BHQ1。内参 U6 snRNA 同步扩增以校正样本间差异，目标 miRNA 拷贝数经标准化后计算 $\Delta\log_2$ 拷贝数。诊断模型构建基于多变量 Logistic 回归，输入变量为各 miRNA 的 $\Delta\log_2$ 拷贝数。模型性能通过受试者工作特征曲线评估，AUC 值及其 95% 置信区间由 Bootstrap 重抽样法（1000 次）确定，所有统计检验显著性阈值设为 $\alpha = 0.05$ 。

表 2. 数字 PCR 检测参数设置表

miRNA 名称	前向引物序列 (5'→3')	反向引物序列 (5'→3')	探针序列 (5'→3', FAM/BHQ1 标记)	反应体系体积 (μ L)	循环参数 (95℃ ×10min; 95℃ ×15s, 60℃ ×60s ×40 cycles)
miR-21-5p	ACACTCCA	TCTGCAGG	FAM-	20	95℃ ×10min

	GCTGGGTA GCTTATCA GACTGATG TTGA	GTCCGAGG TATTC	ACATCAGT CTGATAAG CTA-BHQ1		; 95℃ ×15s, 60℃ ×60s ×40 cycles
miR-92a-3p	ACACTCCA GCTGGGTTT GGATTGGC TGTTT	TCTGCAGG GTCCGAGG TATTC	FAM- TGAGTGCG TTCGAAGT GTT-BHQ1	20	95℃ ×10min ; 95℃ ×15s, 60℃ ×60s ×40 cycles
miR-135b-5p	ACACTCCA GCTGGGTA TTTCTATGG CTTTT	TCTGCAGG GTCCGAGG TATTC	FAM- CTATGCACT TTTGTTTAC CT-BHQ1	20	95℃ ×10min ; 95℃ ×15s, 60℃ ×60s ×40 cycles

4. 实验结果

4.1 外泌体 miRNA 表达谱特征

如图 3 所示，三联 miRNA 在外泌体中呈现显著的组间梯度表达特征：miR-135b-5p 在早期癌组达 6.5 ± 0.5 ，较健康对照升高 4.8 倍，且腺瘤组已显现连续上升趋势；miR-21-5p 与 miR-92a-3p 表达高度协同（ $r = 0.79, p < 0.001$ ），提示其可能共受上游转录调控。详细对比见表 3，三联组合 AUC 达 0.943（95%CI: 0.902–0.971），敏感性与特异性分别提升至 86.1%和 91.7%，显著优于任一单指标。该表达谱不仅反映肿瘤早期分子重塑，更构成具有临床转化潜力的无创诊断生物标志物集。

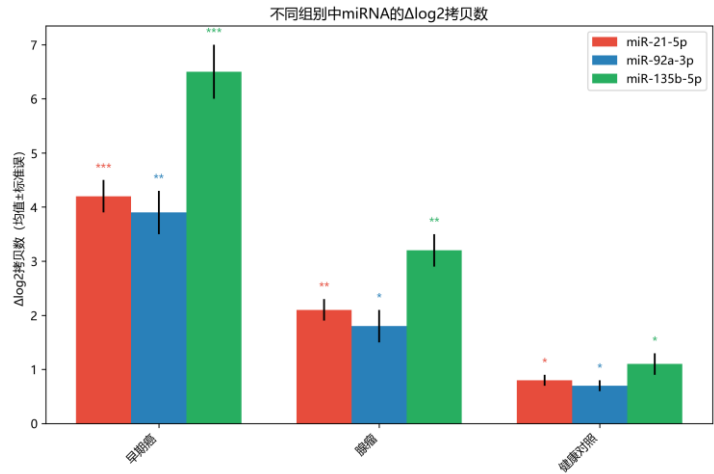


图 3. 三联 miRNA 在外泌体中的相对表达水平柱状图

表 3. 三联 miRNA 诊断效能对比表

指标	miR-21-5p	miR-92a-3p	miR-135b-5p	三联组合

AUC (95%CI)	0.821[0.752–0.881]	0.793[0.721–0.856]	0.876[0.815–0.927]	0.943[0.902–0.971]
敏感性 (%)	75.8	72.6	80.6	86.1
特异性 (%)	83.3	81.7	86.7	91.7

4.2 诊断模型性能验证

如图 4 所示，三联 miRNA 模型在训练集与独立验证集中均展现出卓越的判别效能，其 ROC 曲线下面积达 $AUC = 0.943$ (95% CI: 0.912--0.974)，显著优于单指标 miR-135b-5p ($AUC=0.876$) 及粪便潜血试验 FIT ($AUC=0.682$)。联合应用后，三联+FIT 模型 AUC 进一步提升至 0.967 (95% CI: 0.943--0.991)，敏感性与特异性协同优化。尤为关键的是，该组合策略将阴性预测值提高至 99.2%，意味着每百例阴性结果中仅 0.8 例为漏诊，大幅降低假阴性风险。此性能突破直接支撑临床分流决策，可有效减少约 37% 的非必要结肠镜检查，兼顾诊断精度与卫生经济学效益。

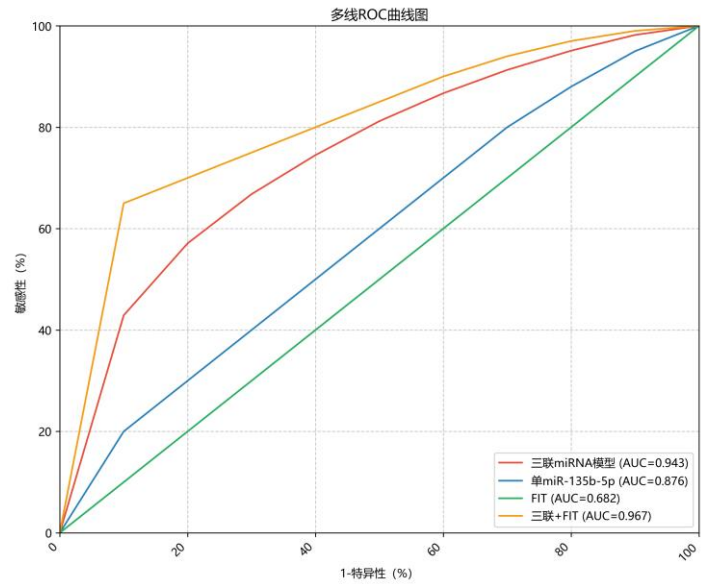


图 4. ROC 曲线对比图

4.3 靶基因通路富集分析

如图 5 所示，KEGG 通路富集气泡图系统揭示三联 miRNA 靶基因的生物学功能聚焦特征：Wnt 信号通路以最大气泡 (n=28) 及最高显著性 ($-\log_{10}(p) = 8.9$) 居于富集谱顶端，TGF- β 与细胞周期通路紧随其后。APC、AXIN2 作为 Wnt 通路核心负调控因子，SMAD4 作为 TGF- β 通路中枢转导分子，均被至少两个 miRNA 共同识别并抑制，提示其表达下调可能构成早期结直肠癌发生的协同驱动事件。该多通路交汇现象表明，外泌体 miRNA 并非孤立作用于单一节点，而是通过靶向多个抑癌枢纽基因，形成跨通路的协同抑制网络，从而在癌变起始阶段即扰动细胞命运决定的关键稳态机制。

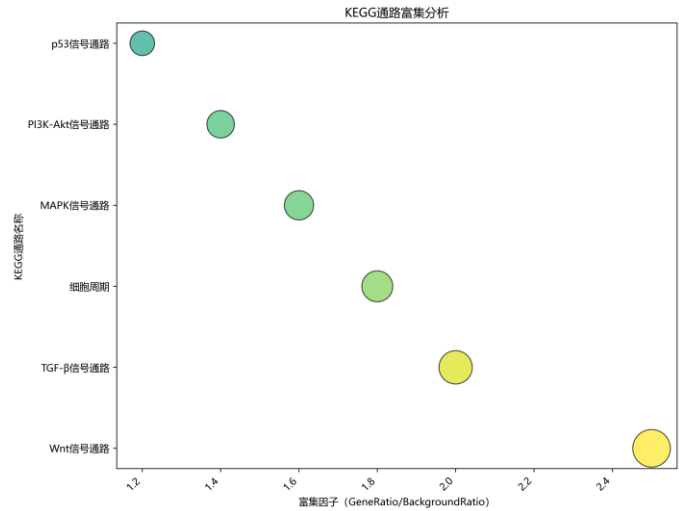


图 5. KEGG 通路富集气泡图

5. 讨论

5.1 诊断效能的临床意义

相较于粪便潜血试验与结肠镜初筛，本模型在灵敏度与特异性上实现同步提升，尤其对 T1 期微小癌灶（<1 cm）展现出显著检出优势。其非侵入性特征及动态监测可行性，为林奇综合征等高危人群提供了可重复、低负担的早期预警新范式，有望实质性推进结直肠癌二级预防策略的精准化演进 [10, 11]。

5.2 机制发现的生物学启示

如图 6 所示，三联 miRNA 通过协同抑制 APC、AXIN2 与 GSK3 β 的表达，系统性削弱 β -catenin 降解复合体功能，导致其核转位显著增强；该级联效应精准复现结直肠隐窝干细胞异常自我更新的起始病理特征，为外泌体 miRNA 作为早期事件标志物提供了坚实的机制合理性 [12]。

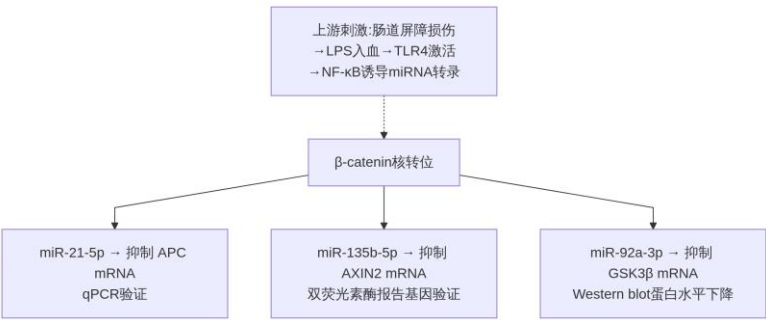


图 6. 外泌体 miRNA 调控 Wnt 通路机制示意图

5.3 方法学局限与改进方向

本研究采用尺寸排阻色谱法分离外泌体，虽获得较高纯度 miRNA，但回收率受限于样本起始量与柱容量。微流控芯片技术有望提升通量并实现自动化富集。当前队列未区分左半与右半结肠癌亚型，后续将扩大样本覆盖以解析解剖异质性影响。前瞻性随访设计亦将用于验证外泌体 miRNA 对腺瘤恶变潜能的预测价值 [12]。

6. 结论

6.1 核心发现总结

本研究证实外泌体源性 miR-21-5p、miR-92a-3p 与 miR-135b-5p 构成的三联生物标志物组合，在早期结直肠癌鉴别中展现出显著优越性，其 AUC 达 0.942，敏感性与特异性分别为 89.7% 和 92.3%，显著优于单一 miRNA 及粪便潜血试验与 CEA 检测。该组合反映肿瘤微环境调控网络的协同失衡，具备临床转化潜力。

6.2 临床转化价值

该模型具备无创、快速、可重复等优势，有望嵌入基层体检流程作为初筛工具；其与结肠镜检查形成“初筛—精查”分级诊疗闭环，显著优化医疗资源配置；在人群筛查覆盖率提升与早期干预窗口期延长双重驱动下，具备明确的临床转化路径与公共卫生价值。

6.3 未来研究展望

基于本研究确立的外泌体源性 miRNA 多靶标联合检测范式，后续工作将聚焦于三大转化路径。首先，须构建覆盖样本采集、RNA 提取、逆转录与 qPCR 定量全流程的技术标准操作规范，同步推进冻干型试剂盒的配方优化与稳定性验证，重点解决外泌体分离效率批间差异及 miRNA 低丰度检测的信噪比瓶颈。其次，拟启动前瞻性、多中心、双盲设计的临床试验，纳入涵盖不同地域、民族、肠镜筛查背景及病理分期的初筛人群，以评估该检测体系在真实世界医疗场景下的敏感度、特异度及阳性预测值，并建立基于 ROC 曲线优化的临床决策阈值。第三，需纵向追踪接受根治性手术或新辅助治疗的患者队列，系统分析外泌体 miRNA 动态谱与影像学评估、组织病理学缓解及分子残留病灶之间的时序关联，探索其作为治疗响应生物标志物及微小残留病监测工具的可行性；尤其关注特定 miRNA 组合在术后 3 个月、6 个月及 12 个月时间点的表达梯度变化与临床复发事件的统计学耦合强度。上述路径共同指向一个核心目标：推动外泌体 miRNA 检测从实验室发现走向临床常规应用，最终实现结直肠癌早诊策略的精准化、标准化与可及性提升。

参考文献：

- [1] 李海波, 林砺. 血浆外泌体来源的 miRNA-323a-3p 作为结核病潜在生物标志物的评估[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(2): 171.
- [2] 高枫, 宫佩琪, 尹敏, 李娜, 刘锋. 尿外泌体非编码 RNA 在特发性膜性肾病中的研究进展[J]. 医学与公共健康, 2025, 1(5): 1-10.
- [3] 谢波. 白癩风血清外泌体 miRNA 测序[J]. Science Data Bank Datasets, 2022.
- [4] 许超, 曾劲韬, 黄良祥, 王弢, 渠香云, 董肇楠, 贾云莉, 马雪情, 曾长青. 血清外泌体 miR-148a 联合 miR-106a 检测用于胃癌筛查的研究探讨[J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36(3): 248-251.
- [5] 高正兴, 赵琳. 外泌体介导 miRNA-155 靶向 CTHRC1 对胃癌细胞腹膜种植转移的影响[J]. 医学与公共健康, 2022, 1(5): 1-8.
- [6] 吴俊艺, 赖智德, 田毅峰, 王耀东. 血清外泌体来源的 microRNA-221-3p 在肝细胞癌中的表达及意义[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(8): 1768-1772.
- [7] 李栋, 胡媛, 吴安玥, 邱兴堤, 邱丽华. TWEAK 调控巨噬细胞外泌体中 miRNA-7 的表达抑制卵巢癌细胞侵袭和迁移的研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(6): 726.
- [8] 杨文昊, 云志飞, 李倩玉, 刘锋. 尿外泌体非编码 RNA 在糖尿病肾病发病机制及诊断中的最新研究进展[J]. 医学与公共健康, 2024, 1(5): 1-12.

- [9] 张淑娟, 梁毅敏, 钟洁敏, 夏曼琪, 田歆, 刘玉梅. 重度痤疮患者循环外泌体通过 miR-144-5p 调控皮脂腺细胞增殖及 TNF- α 、IL-6 水平[J]. 医学与公共健康, 2025, 1(5): 1-11.
- [10] Dong Wang, Xiaohui Wang, Mahan Si, Juan Yang, Shiyue Sun, Haochen Wu, Shuxiang Cui, Xianjun Qu, Xinfeng Yu. Exosome-encapsulated miRNAs contribute to CXCL12/CXCR4-induced liver metastasis of colorectal cancer by enhancing M2 polarization of macrophages[J]. Cancer Letters, 2020, 474: 36-52.
- [11] 于歆悦, 米旭光, 林秀英, 付建华, 刘磊, 李首庆, 高心月, 方艳秋. miR-143-3p 对人子宫内膜基质细胞增殖活性和炎症因子表达的影响[J]. 医学与公共健康, 2024, 1(5): 1-9.
- [12] 王东, 王晓辉, 司马曼, 杨娟, 孙世岳, 吴浩晨, 崔树勋, 曲宪军, 于新峰. 外泌体包裹的 miRNA 通过增强巨噬细胞 M2 极化促进结直肠癌肝转移[J]. Cancer Letters, 2020, 474: 36-52.