

网络出版时间:2025-10-28 11:18:01 网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251027.1508.017>

骨髓基质细胞来源的外泌体 miRNA 在 AML 患者 骨髓上清液中表达差异及其预后意义

戴 炜¹,王小婷¹,付雯娟²,李秋霜²,周天慧²,卢梦媛²,黄慧芳¹

(¹福建医科大学附属协和医院中心实验室,福州 350001;

²福建医科大学医学技术与工程学院检验系,福州 350004)

摘要 目的 研究骨髓基质细胞(BMSCs)来源的外泌体中微小核糖核酸(miRNA)在急性髓系白血病(AML)患者骨髓上清液中的异常改变及其对AML患者预后的影响。方法 首先,收集3例AML患者和3例健康供者骨髓上清液,利用试剂盒提取骨髓上清液中外泌体并鉴定后,进行miRNA测序并分析差异表达的miRNA。然后,将差异表达的miRNA与原代AML细胞体外培养上清液外泌体miRNA表达谱(GSE64029)取交集,排除AML细胞来源的外泌体差异表达miRNA(DE-miRNA),筛选出BMSCs来源外泌体DE-miRNA。接着,基于TCGA数据库运用Cox回归和Lasso回归分析筛选出候选miRNA,构建AML预后风险模型并根据中位数区分低风险组和高风险组,验证预后价值及临床相关性。最后,预测候选miRNA的靶基因,对靶基因进行通路富集、关键网络构建以及关键miRNA与靶基因表达相关性分析。结果 提取的外泌体外观呈茶托状且结构完整,粒径为30~150 nm,表达CD63、ALIX和TSG101蛋白。miRNA测序结果显示,与健康供者相比,AML患者骨髓上清液外泌体中存在103个DE-miRNA,与GSE64029数据集交集后筛选出83个BMSCs来源的DE-miRNA。从83个DE-miRNA中确定了miR-25-3p、miR-532-5p、miR-194-5p、miR-10a-5p和miR-20a-5p等5个候选miRNA建立预后模型。Kaplan-Meier生存分析显示低风险组患者的总生存期较高风险组长($P < 0.05$),训练/验证集在1、2、3年随访的ROC曲线下面积依次为0.80/0.74、0.80/0.78、0.79/0.64,与AML患者的预后分层、年龄以及FAB分型有关($P < 0.05$)。KEGG通路富集结果表明,候选miRNA的靶基因与肝癌、乳腺癌以及非小细胞肺癌等癌症信号通路密切相关,相关性分析显示候选miRNA与其靶基因HIF1A、CREB1、PIK3CA、IGF1R、PIK3R1、TIAM1、CRK和PTEN等表达存在不同程度相关性($P < 0.05$)。结论 AML患者BMSCs外泌体中miRNA存在差异表达,其中miR-25-3p、miR-532-5p、miR-194-5p、miR-10a-5p和miR-20a-5p等5个候选miRNA构建的风险预后模型诊断效能较好,可评估AML患者预后。

关键词 急性髓系白血病;预后;骨髓上清液;外泌体;微小核糖核酸;骨髓基质细胞

中图分类号 R 733.71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)11-2113-11

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.11.017

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是成年人最常见的急性白血病,具有高度异质性^[1]。骨髓微环境在AML发生、发展中发挥重要作用^[2]。骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)是骨髓微环境的重要成分,可通过分泌外泌体与AML细胞间传递信号,影响AML的进展和治疗结局^[3]。

外泌体是在细胞间传递微核糖核酸(microRNA, miRNA)的重要载体^[4],miRNA通过与信使核

糖核酸作用以调控靶基因表达。已有多个miRNA被报道在AML细胞中异常表达,并参与AML细胞的增殖、凋亡等过程^[5]。但是,目前在AML有关外泌体方面的探索大部分聚焦在AML细胞来源的外泌体^[6-7],而且,运用外泌体miRNA评估AML患者预后的相关研究绝大多数来源于外周血液^[8-9],未见骨髓上清液方面的相关报道。然而,骨髓微环境更能体现AML细胞的真实生存环境。因此,本文利用多个数据集探讨AML患者骨髓上清液中来源BMSCs外泌体的差异表达miRNA(differential expression miRNA, DE-miRNA)的预后价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 骨髓液标本来自福建医科大学附属协和医院收治的3例初诊AML患者(表1)和3例异基因造血干细胞移植的健康供者(男2例,女1

2025-09-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81902125);福建省高水平实验
研究平台建设项目(编号:闽201704);福建医科大学大学
生创新创业训练计划项目(编号:C23193)

作者简介:戴 炜,男,博士研究生;
黄慧芳,女,博士,教授,主任技师,博士生导师,通信作者,
E-mail:huanghuif@fjmu.edu.cn

表 1 患者临床信息
Tab. 1 Patients' clinical characteristics

No.	Gender /Age	FAB	WBC (×10 ⁹ /L)		Blast (%) PB BM	Immunophenotype	Cytogenetics	Genetic abnormalities
			PB	BM				
1	M/ 45	M5	2.85	24.0	57.5	Not available CD34 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD38 ⁺ , CD4 ⁺ ,	46, XY[20]	<i>EVII</i> gene mutation
2	M/ 63	M5	6.11	38.0	46.0	CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD33 ⁺ , CD117 ⁺ , CyMPO ⁺ , CD64 ⁺ CD34 ⁺ , HLA-DR ⁺ , CD38 ⁺ , CD4 ⁺ ,	Not available	None
3	F/ 26	M5	26.58	28.0	68.5	CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD33 ⁺ , CD117 ⁺ , CD64 ⁺ , CyMPO ⁺	47, XX, +22[8] /46, XX[10]	<i>KIT</i> gene mutation <i>CBFβ</i> :: <i>MYH11</i> fusion gene

FAB: French-American-British classification; M5: acute monocytic leukemia; PB: peripheral blood; BM: bone marrow; WBC: white blood cell counts.

例),患者年龄 26~63 (44.67 ± 18.53) 岁,供者年龄 28~59 (41.00 ± 15.72) 岁。两组在年龄 ($P = 0.809$) 及性别 ($P = 1.000$) 方面差异均无统计学意义。AML 诊断参照成人 AML(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2023 年版)^[10],且均在初次治疗前留取骨髓液。本研究已通过该医院伦理委员会审批(伦理号:2018KY063),且上述标本的获得均取得患者及家属的知情同意,并签署知情同意书。

1.2 数据库 将从骨髓上清液中提取的外泌体标本交予北京诺禾致源科技股份有限公司测序,获得 miRNA 测序数据(即 SmallRNA 测序)。从基因表达综合数据库 (gene expression omnibus, GEO) 的 GSE64029 数据集获取 2 例来自 AML 初诊患者(非急性早幼粒细胞白血病)骨髓中原代 AML 细胞体外单独培养的上清液外泌体 miRNA 表达谱。从癌症基因组图谱计划(the cancer genome atlas, TCGA)中获取 145 例 AML 患者(非急性早幼粒细胞白血病)标本的 miRNA 表达谱和临床信息。

1.3 研究方法

1.3.1 骨髓液涂片及细胞化学染色的采集和分析

患者经骨髓穿刺术后,缓慢抽吸出新鲜骨髓液,立即推制涂片,然后进行瑞氏染色及多种细胞化学染色,包括髓过氧化物酶(MPO)、醋酸 AS-D 莨酚酯酶(AS-DCE)、过碘酸雪夫反应(PAS)、 α -醋酸萘酚酯酶(α -NAE)及氟化钠(NaF)抑制实验。染色后的涂片在显微镜下观察并采集图像,结合细胞形态学及化学染色结果,确定患者 AML 形态学分型。

1.3.2 骨髓上清液外泌体的分离、纯化和鉴定 EDTA 抗凝骨髓液,在 4 ℃ 条件下 3 000 r/min 离心 5 min,吸取上清液,再用 6 200 r/min 离心 30 min 去除细胞碎片,然后将骨髓上清液用 0.22 μ m 的滤网过滤,保存于 -80 ℃。使用外泌体提取纯化试剂盒(购自上海宇致博生物科技有限公司,货号:

UR52141)提取并纯化骨髓上清液外泌体,简要步骤如下:① 将骨髓上清液取出置于冰上解冻,离心去除细胞碎片;② 在上清液中加入 Exosome Concentration Solution, 涡旋振荡后 4 ℃ 过夜;③ 在 4 ℃ 条件下(后续离心温度均为 4 ℃),12 400 r/min 离心 30 min,弃上清液,底部沉淀即外泌体;④ 用无菌 PBS 重悬外泌体,12 400 r/min 离心 2 min,得到上清液即外泌体悬液;⑤ 将外泌体悬液加到 Exosome Purification Filter 纯化柱上室,6 200 r/min 离心 10 min,底部液体即纯化的外泌体悬液可保存于 -80 ℃。取部分外泌体悬液,通过透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察分离的外泌体形态,纳米颗粒跟踪分析技术(nanoparticle tracking analysis, NTA)检测外泌体粒径,并利用 Western blot 法检测外泌体标志物 ALIX、CD63 和 TSG101 蛋白表达。

1.3.3 BMSCs 来源的 DE-miRNA 的筛选 首先,通过采用 R 语言 DESeq2 包对骨髓上清液中外泌体的 SmallRNA 测序进行差异分析,得到 DE-miRNA,并绘制了火山图和热图。然后,对 GSE64029 数据集进行分析,得到 AML 原代细胞培养上清液外泌体中未检出表达量的外泌体 miRNA。由于 SmallRNA 测序中的 DE-miRNA 包含了 BMSCs 和 AML 细胞来源,为了进一步筛选出 BMSCs 来源的外泌体 DE-miRNA,通过分析 GSE64029 数据集中 AML 细胞未分泌的 miRNA(即在该数据集中未检测到表达的 miRNA)与本研究中鉴定的 DE-miRNA 进行交集分析,筛选出 BMSCs 来源的 miRNA。DE-miRNA 的筛选标准设置为多重校验后(Benjamini-Hochberg 方法) $P_{adj} < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 。

1.3.4 预后风险模型构建与验证 为了防止过度拟合,提供可靠的模型,将 TCGA 数据库 AML 患者的 miRNA 表达谱以 7:3 的比例随机分为训练集和

测试集,并对两组临床特征进行组间差异比较。在训练集中,使用“surviva”包进行单因素 Cox 回归分析,筛选出与生存时间显著相关的 DE-miRNA ($P < 0.05$),并绘制森林图展示。随后,使用“glmnet”包进行基于最小绝对收缩和选择算法(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)和多因素 Cox 回归分析来确定候选 miRNA 并建立预后风险模型,根据以下公式计算风险得分:风险得分 = $\sum \text{coef(候选 miRNA)} \times (\text{候选 miRNA})$ 表达量。

在训练集中根据风险得分的中位数(1.154),将 TCGA 数据集的 AML 患者分为高风险组和低风险组。根据模型划分,整体数据集最终区分为:高风险组 75 例,低风险组 70 例。使用“survival”包绘制 Kaplan-Meier(KM)生存曲线,分别比较高、低风险组在训练集、测试集之间的生存差异,采用 Log-rank 法进行检验。为了评估基于候选 miRNA 风险模型的预测能力,使用“timeROC”包进行 1、2、3 年的受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic curve, ROC)分析,并绘制 ROC 曲线,并计算曲线下面积(area under curve, AUC)。然后,比较预后风险模型与 AML 临床特征之间的联系。

1.3.5 预测候选 miRNA 的靶基因及其生物信息学分析 采用 TargetScan(https://www.targetscan.org/vert_72/) 和 miRDB(<http://www.mirdb.org/mirdb/index.html>) 两个数据库分别预测候选 miRNA 的靶基因,并绘制韦恩图以展示预测结果的重叠情况。利用 clusterProfiler 包对候选 miRNA 的靶基因进行了京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,筛选条件设置为 $P_{\text{adj}} < 0.05$,确定在 KEGG 中具有显著富集的

通路。然后,在 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 上分析靶基因的蛋白质互作,利用 Cytoscape 软件(v3.7.1)的 cytoHubba 插件对蛋白质互作网络进行关键靶基因的筛选。为了确保关键靶基因可信度高,选择了不同的四种算法筛选并取交集,绘制韦恩图,并依据候选 miRNA 与关键靶基因的相互作用绘制 miRNA-mRNA 关键网络图。四种算法分别为 Betweenness、Degree、Radiality 及 Edge Percolated Component(EPC),每种算法均运行并输出前 30 个关键基因进行交集。最后,使用 Pearson 相关性评估候选 miRNA 与靶基因表达量之间的关系,绘制散点图。

1.4 统计学处理 所有统计分析和图形均由 R4.3.0 和 SPSS 25.0 统计软件分析和绘制。采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法对分类资料进行差异比较,对符合正态分布的两组数据进行 Pearson 相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者骨髓液涂片细胞形态学及细胞化学染色

患者骨髓液涂片瑞氏染色后,镜下可见原始单核细胞体积较大,细胞核通常圆形,染色质细致,可见 1~2 个大而明显的核仁,胞质丰富呈灰蓝色,可有少量嗜天青颗粒;幼稚单核细胞较原单核细胞大,核形更不规则,明显扭曲折叠,胞质量相对较多(图 1A)。细胞化学染色结果显示,MPO 弱阳性,颗粒细小,弥散性分布(图 1B),AS-DCE 阴性(图 1C),PAS 阳性(图 1D), α -NAE 阳性(图 1E),在加入 NaF 后被明显抑制(图 1F)。细胞形态学、细胞化学染色结合免疫表型分析(表 1)结果确定这 3 例患者均患急

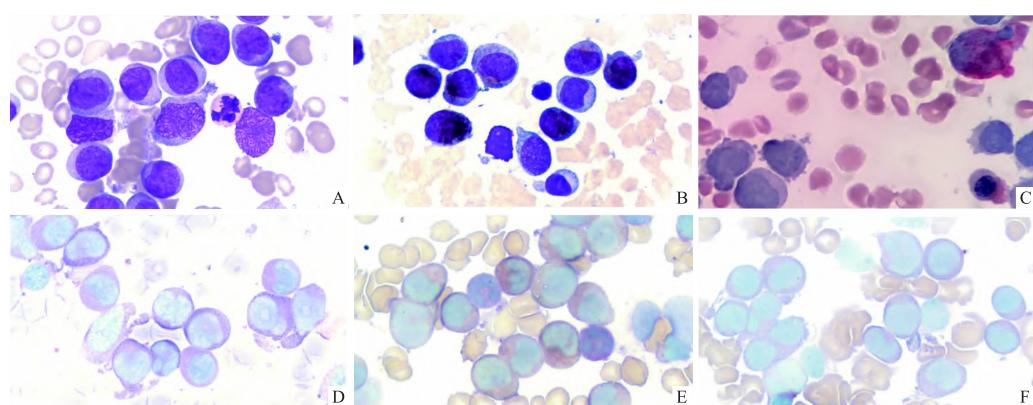


图 1 骨髓涂片及细胞化学染色结果 $\times 1000$

Fig. 1 Bone marrow smear and cytochemical staining results $\times 1000$

A: Wright's stain; B: POX stain; C: AS-DCE stain; D: PAS stain; E: α -NAE stain; F: α -NAE stain + NaF.

性单核细胞白血病(M5)。3例患者的白血病细胞比例均大于90%，图示展示了最具代表性的患者涂片结果。

2.2 骨髓上清液中外泌体的鉴定 TEM下观察到骨髓上清液中的外泌体外观呈茶托状结构且形态完整(图2A)；NTA检测到外泌体样品粒径为30~150 nm(图2B)；应用Western blot方法，在外泌体中检出外泌体标志蛋白ALIX、CD63和TSG101(图2C)。以上结果表明从骨髓上清液中成功提取了外泌体。

2.3 筛选 AML 患者骨髓上清液中 BMSCs 来源的 DE-miRNA SmallRNA 测序中包含了1 204 个外泌体 miRNA 表达谱，在 AML 患者骨髓上清液的外泌体中上调的 miRNA 有 59 个，下调的 miRNA 有 44 个(图3A、B)。进一步与 GSE64029 数据集(原代 AML 细胞体外培养上清液外泌体 miRNA 测序)交集后得到 83 个 BMSCs 来源的 DE-miRNA(图3C)。

2.4 基于 AML 患者 BMSCs 来源的 DE-miRNA 的预后风险模型的建立并评价 卡方检验分析结果显示，训练集和测试集中的患者临床特征分布差异无统计学意义(表2)，提示可用于后续预后风险模型的建立。在训练集中通过单因素 Cox 回归分析得到 9 个与 AML 预后相关 BMSCs 来源的 DE-miRNA ($P < 0.05$) (图4A)。进行 LASSO 回归分析和多因

表2 训练集和测试集的 AML 患者的临床特征关系 [n (%)]

Tab. 2 Relationship between clinical characteristics

of AML patients in the training and test sets [n (%)]

Characters	Training set (n = 102)	Test set (n = 43)	P value
Gender			0.295 4
Female	50 (49.0)	17 (39.5)	
Male	52 (51.0)	26 (60.5)	
Age (year)			0.375 4
≥60	44 (43.1)	22 (51.2)	
<60	58 (56.9)	21 (48.8)	
Cytogenetics risk category			0.780 8
Favorable	12 (11.8)	7 (16.3)	
Intermediate	65 (63.7)	27 (62.8)	
Poor	23 (22.5)	9 (20.9)	
FAB			0.655 0
M0	10 (9.8)	3 (7.0)	
M1	26 (25.5)	9 (20.9)	
M2	27 (26.5)	9 (20.9)	
M4	26 (25.5)	13 (30.2)	
M5	11 (10.8)	6 (14.0)	
M6	1 (1.0)	1 (2.3)	
M7	1 (1.0)	2 (4.7)	

M0: AML with minimal differentiation; M1: AML without maturation; M2: AML with maturation; M4: acute myelomonocytic leukemia; M5: acute monocytic leukemia; M6: erythroleukemia; M7 is acute megakaryoblastic leukemia.

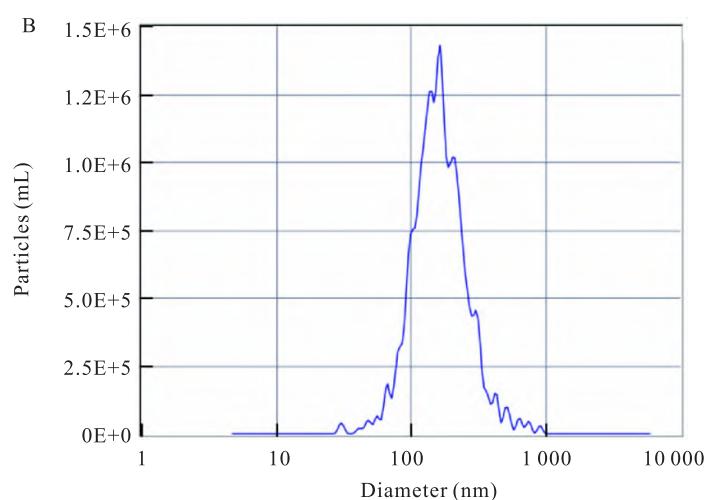
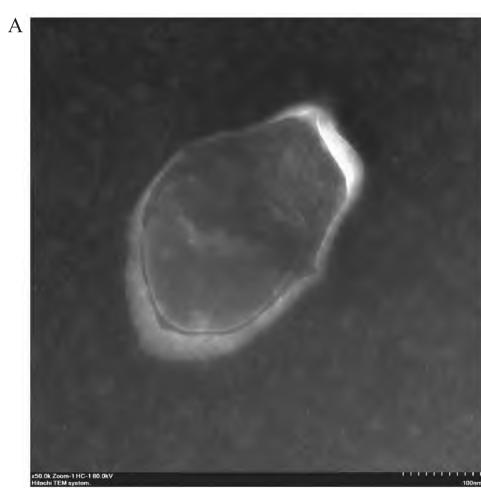
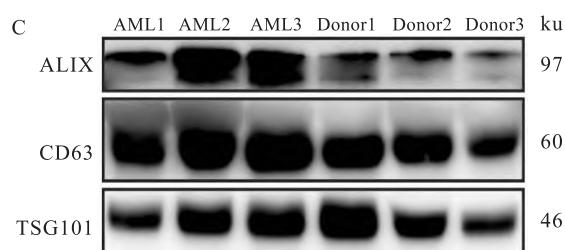


图2 外泌体的鉴定结果

Fig. 2 Identification results of exosomes

A: TEM observation of exosome morphology (bar = 100 nm)；
B: Exosome particle size map detected by NTA method；C: Electrophoretic map of exosome ALIX, CD63, and TSG101 protein expression.



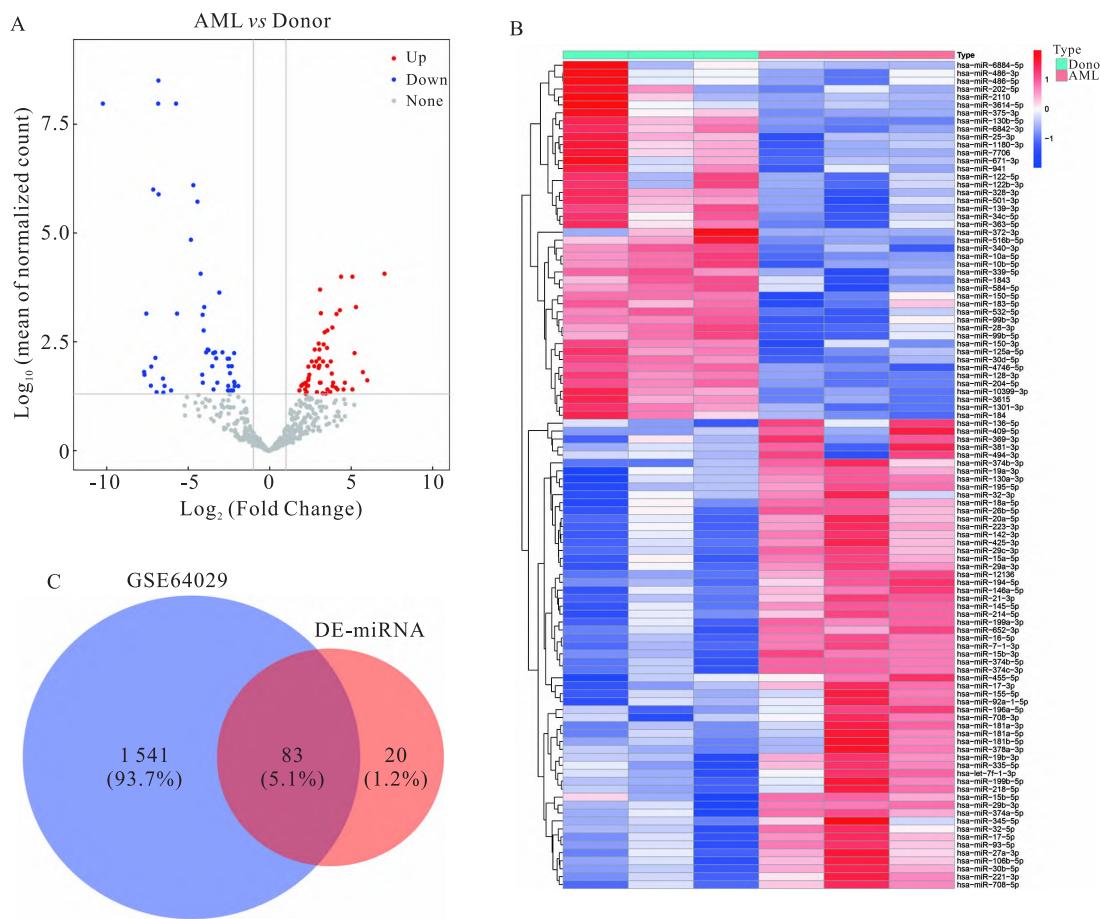


图3 AML患者与健康供者骨髓上清液外泌体miRNA差异表达情况

Fig.3 Differential expression of exosomal miRNA in bone marrow supernatants of AML patients and healthy donors

A: Volcano plot of exosomal differentially expressed miRNAs; B: Heat map of exosomal differentially expressed miRNAs; C: Venn diagram showing the intersection between non-secreted miRNAs from AML cells in the GSE64029 dataset and the differentially expressed miRNAs (DE-miRNAs) identified in this study.

素 Cox 回归分析,从上述 9 个与预后相关的 DE-miRNA 中得到 5 个候选 miRNA 并构建生存预后模型(图 4B、C)。风险得分的计算公式为:

风险得分 = 0.417 7 × (miR-532-5p) 表达量 + 0.381 4 × (miR-194-3p) 表达量 + 0.299 8 × (miR-20a-5p) 表达量 + 0.074 3 × (miR-10a-5p) 表达量 - 0.529 2 × (miR-25-3p) 表达量

KM 生存曲线显示高风险组的生存率低于低风险组($P < 0.05$)(图 4D、E)。ROC 分析结果显示,在训练集、测试集中,预后模型预测训练集、测试集 1、2、3 年总生存期的 AUC 分别为 0.80、0.80、0.79;0.74、0.78、0.64(图 4F、G),表明该模型对 AML 患者全因死亡风险具有较好的评估能力。

2.5 预后风险模型与 AML 患者临床特征的相关性分析

与高风险组相比,低风险组中预后良好者

增多($25.7\% vs 1.3\%, P < 0.05$)、年龄小于 60 岁的患者更多($67.1\% vs 42.7\%, P < 0.05$)以及在低风险组中可以识别到更多的 AML 伴成熟型患者(FAB-M2, $35.7\% vs 14.7\%, P < 0.05$),高风险组中急性单核细胞白血病(FAB-M5)患者比例明显高于低风险组($20.0\% vs 2.9\%, P < 0.05$)。见表 3。

上述结果表明,预后风险模型能够有效区分 AML 患者临床特征。低风险组患者更倾向于呈现以下特征:年轻患者比例、FAB-M2 亚型比例、良好预后细胞遗传学分级比例更高。相比之下,高风险组与侵袭性 M5 亚型表现出强相关性。这一结果揭示了 BMSCs 来源外泌体 miRNA 预后模型与 AML 年龄、细胞遗传学分级以及 FAB 分型之间相关。见表 3。

2.6 候选 miRNA 的靶基因通路富集分析及调控

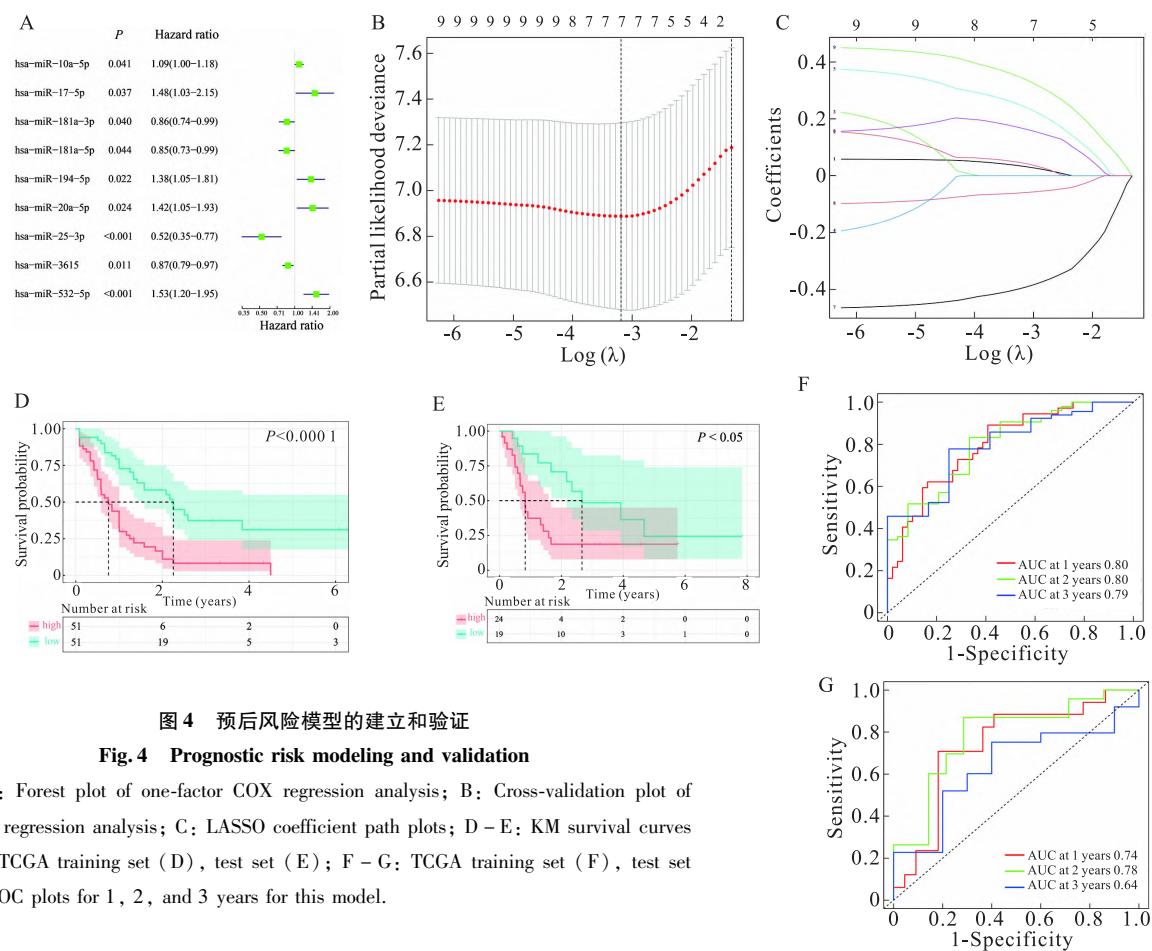


图 4 预后风险模型的建立和验证

Fig. 4 Prognostic risk modeling and validation

A: Forest plot of one-factor COX regression analysis; B: Cross-validation plot of LASSO regression analysis; C: LASSO coefficient path plots; D – E: KM survival curves for the TCGA training set (D), test set (E); F – G: TCGA training set (F), test set (G) ROC plots for 1, 2, and 3 years for this model.

表 3 预后风险模型与 AML 患者临床特征的关系 [n (%)]
Tab. 3 Relationship between prognostic models and clinical characteristics of AML patients [n (%)]

Characters	Low risk (n = 70)	High risk (n = 75)	P value
Gender			0.581 1
Female	34 (48.6)	33 (44.0)	
Male	36 (51.4)	42 (56.0)	
Age (year)			0.003 1
≥60	23 (32.9)	43 (57.3)	
<60	47 (67.1)	32 (42.7)	
Cytogenetic risk			<0.000 1
Favorable	18 (25.7)	1 (1.3)	
Intermediate	39 (55.7)	53 (70.7)	
Poor	12 (17.1)	20 (26.7)	
FAB			0.000 8
M0	8 (11.4)	5 (6.7)	
M1	17 (24.3)	18 (24.0)	
M2	25 (35.7)	11 (14.7)	
M4	18 (25.7)	21 (28.0)	
M5	2 (2.9)	15 (20.0)	
M6	0 (0)	2 (2.7)	
M7	0 (0)	3 (4.0)	

M0: AML with minimal differentiation; M1: AML without maturation; M2: AML with maturation; M4: acute myelomonocytic leukemia; M5: acute monocytic leukemia; M6: erythroleukemia; M7: acute megakaryoblastic leukemia.

网络分析 在明确预后风险模型的重要性和相关性后,需要对 5 个候选 miRNA 的靶基因进一步分析。在 TargetScan 和 RDB 数据库中对候选 miRNA 共同预测了 692 个靶基因(图 5A)。KEGG 结果显示靶基因显著富集在多种癌症相关的通路,例如肝癌、乳腺癌以及非小细胞癌等,提示这些基因可能参与癌症发生发展密切相关的生物学过程(图 5B)。进一步在 STRING 数据库获取靶基因蛋白互作关系,然后利用 Cytohubba 插件进行关键网络模块的筛选,取 4 种不同算法获得前 30 的关键基因并取交集,获得了 16 个关键靶基因(图 5C),将候选 miRNA 与其对应的关键靶基因关系导入 Cytoscape,绘制关键的 miRNA-mRNA 调控网络(图 5D)。

通过 Cytoscape 构建的 miRNA-mRNA 调控网络揭示,5 个 AML 相关的候选 miRNA 通过靶向调控关键信号通路中的核心基因,形成了 miRNA-mRNA 调控网络。这一网络为揭示 AML 发生发展的分子机制提供了新的视角,并为开发基于 miRNA 靶点的精准治疗策略提供了潜在靶点。

2.7 候选 miRNA 与其靶基因表达量的相关性

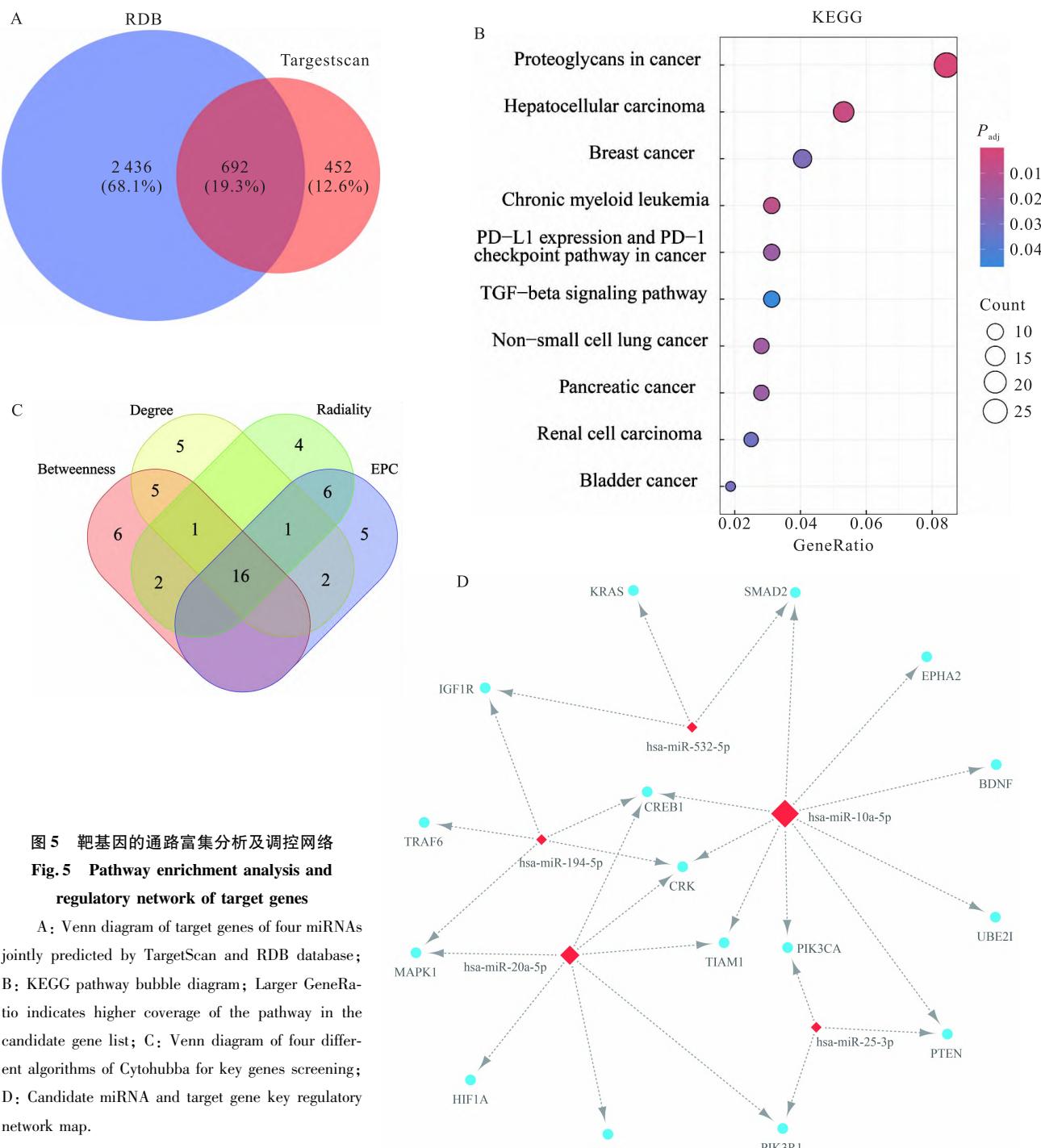


图 5 靶基因的通路富集分析及调控网络
Fig. 5 Pathway enrichment analysis and regulatory network of target genes

A: Venn diagram of target genes of four miRNAs jointly predicted by TargetScan and RDB database; B: KEGG pathway bubble diagram; Larger GeneRatio indicates higher coverage of the pathway in the candidate gene list; C: Venn diagram of four different algorithms of Cytohubba for key genes screening; D: Candidate miRNA and target gene key regulatory network map.

对关键的 miRNA-mRNA 调控网络进行相关性分析,结果显示,miR-20a-5p 的表达与其靶基因 *NPM1* 呈正相关,与 *HIF1A*、*TIAM1* 及 *CRK* 呈负相关(图 6A);miR-532-5p 的表达与其靶基因 *PTEN* 呈负相关(图 6B);miR-10a-5p 的表达与其靶基因 *PIK3CA*、*PTEN* 及 *CREB1* 呈负相关(图 6C);miR-194-5p 的表达与其靶基因 *CRK* 呈负相关,与 *IGF1R* 呈正相关(图 6D);miR-25-3p 的表达与其靶基因 *PIK3R1*、

PTEN 及 *PIK3CA* 呈正相关(图 6E)。

这些发现表明,候选 miRNA 可能通过调控 AML 中关键靶基因(如 *PTEN*、*HIF1A* 等)参与细胞增殖、凋亡及信号转导等生物学过程,它们的表达失衡可能与 AML 发生发展密切相关。

3 讨论

随着检测技术和实验手段的突飞猛进,AML 的

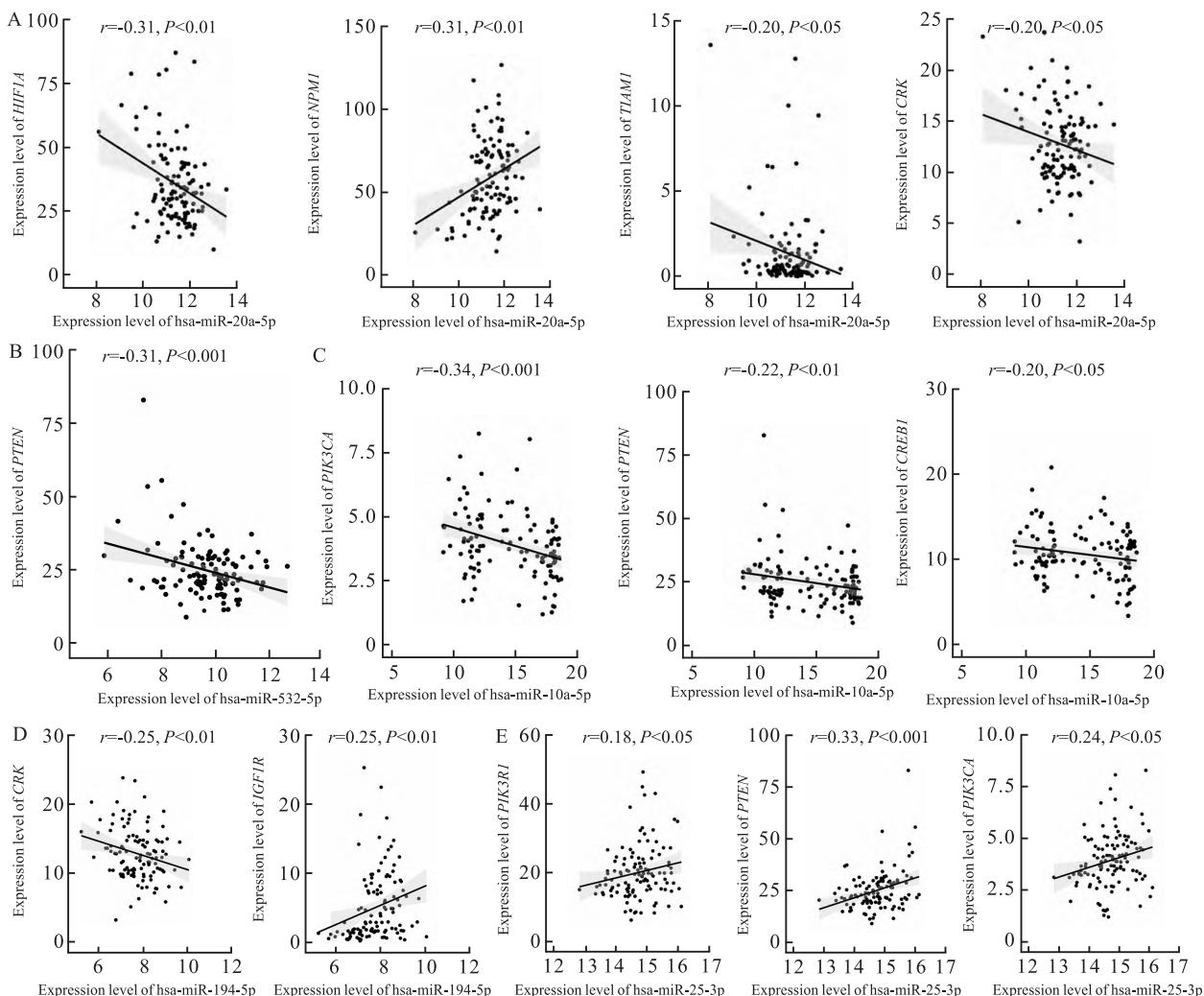


图 6 候选 miRNA 与靶基因 mRNA 表达相关性分析

Fig. 6 Correlation analysis of candidate miRNA and target gene mRNA expression

A: Scatter plot of miR-20a-5p with *HIF1A*, *NPM1*, *TIAM1* and *CRK* gene expression; B: Scatter plot of miR-532-5p with *PTEN* gene expression; C: Scatter plot of miR-10a-5p with *PIK3CA*, *PTEN* and *CREBL* gene expression; D: Scatter plot of miR-194-5p with *CRK*, *IGFIR* gene expression scatter plot; E: Scatter plot of miR-25-3p with *PIK3RI*, *PTEN* and *PIK3CA* gene expression.

分子标志物层出不穷, 预后分层体系也愈发精细, 但仍有待完善。由于外周血液采集方便, 而且初诊 AML 患者外周血液中含有数量不等的肿瘤细胞, 目前在 AML 领域研究外泌体所采用的临床标本多为外周血液。该研究选择骨髓上清液作为研究材料, 有 2 个优点: 其一, 骨髓上清液含有丰富的外泌体, 能够更全面地反映骨髓微环境的状态, 这对于深入理解 AML 的病理生理过程至关重要; 其二, 利用骨髓上清液作为研究材料, 避免了额外的骨髓抽取, 减轻了患者的身体负担, 同时实现了临床标本的高效利用。

miRNA 可以稳定存在于外泌体中, 不易被降

解, 具有成为分子标志物的潜力。尽管外泌体 miRNA 的研究在 AML 领域已有诸多报道^[6-9], 但本研究聚焦于 BMSCs 这一特定细胞类型的外泌体 miRNA。BMSCs 在 AML 的病理过程中扮演着至关重要的角色, 它们与白血病细胞的相互作用对疾病的进展和治疗响应具有显著影响^[2-3]。本研究通过深入分析 BMSCs 衍生的外泌体 miRNA, 旨在揭示潜在的治疗新靶点, 这一研究方向在现有文献中尚未得到充分探索。首先提取并成功鉴定了 3 例 AML 患者和 3 例健康供者的骨髓上清液外泌体, 然后对外泌体进行 miRNA 高通量测序, 通过差异表达分析鉴定出外泌体中具有显著差异表达的 103 个 miRNA。

为了探寻 BMSCs 来源外泌体的 DE-miRNA, 本研究利用公共数据库, 将 AML 原代细胞体外单独培养上清液的外泌体中未检出表达量的 miRNA 与本研究测序交集, 排除了 AML 细胞来源外泌体的 miRNA, 最终获得 83 个 BMSCs 来源的 DE-miRNA。同时, 本研究发现 AML 患者骨髓上清液外泌体中大部分 DE-miRNA 来源于 BMSCs(80.58%), 该现象也提示 BMSCs 给 AML 细胞输出丰富的交流信号。

外泌体中富集 miRNA, 且外泌体膜能保护 miRNA 免受降解, 并可以通过与细胞膜直接融合的方式将 miRNA 分泌到 AML 细胞内, 从而调控细胞基因表达, 参与 AML 的发生发展^[11]。在本研究中, 利用 TCGA 数据库验证了 83 个 BMSCs 来源的 DE-miRNA 与 AML 患者预后的关联。接着, 经单因素 Cox 回归分析, 得到 9 个与预后密切相关的 DE-miRNA, 并进一步确定了 5 个重要的候选 miRNA (miR-25-3p、miR-532-5p、miR-194-5p、miR-10a-5p 和 miR-20a-5p)。随后, 构建了基于这 5 个候选 miRNA 的预后风险模型, 生存分析表明预后风险分组的患者生存情况存在明显差异, ROC 曲线显示该模型具有一定预测效能。此外, 研究模型与 AML 患者的临床特征密切相关, 高风险组显著富集了侵袭性强的 M5 患者以及年龄较大的患者, 预后较差, 为其转化为分层治疗决策工具提供了理论依据。以上结果均说明, 本研究构建的模型具有一定的临床应用价值, 但仍需要扩大样本量开展验证。

在该风险预后模型中, 已有部分 miRNA 被报道与 AML 患者预后密切相关, 如高表达 miR-10a-5p 的 AML 患者完全缓解率和生存率均较低, 并且容易复发^[12]; 与化疗敏感的 AML 患者相比, miR-532-5p 在化疗耐药患者中显著上调, 说明 miR-532-5p 可能是 AML 化疗耐药的重要机制之一^[13]; 本研究分析结果也显示 miR-10a-5p 和 miR-532-5p 表达量与 AML 患者不良预后相关。本研究还发现 miR-25-3p 在单因素回归分析中 HR 小于 1, 被视为保护因素, 表达高时, AML 患者预后良好, 与文献报道一致^[14]。此外, 未见 miR-194-5p 和 miR-20a-5p 与 AML 患者预后的临床报道, 但是 Dell' Aversana et al^[15] 报道 miR-194-5p 高表达可抑制 AML 细胞成熟分化, 极有可能是 AML 的促癌因子; miR-20a-5p 被报道在多种实体肿瘤中高表达^[16]。本研究表明, miR-194-5p 和 miR-20a-5p 表达量与患者预后负相

关, 与 AML 患者预后之间的关系还需要进一步临床数据证实。

对 5 个与 AML 预后高度相关的 miRNA 的靶基因进行富集, 结果发现这些靶基因显著富集在了肝癌、乳腺癌、非小细胞癌以及慢性髓系白血病癌症发生发展相关的通路, 构建的 miRNA-mRNA 调控网络揭示了候选 miRNA 与其靶基因的调控信息。为了进一步探讨 miRNA-mRNA 调控网络中关键分子的调控关系, 对 TCGA 数据库中 miRNA 及其靶基因的基因表达量分析发现, 已有部分关键靶基因在 AML 中的作用逐渐阐明, 例如 *HIF1A* 可能是 AML 的潜在治疗靶点^[17]、*PTEN* 可抑制 AML 的发展^[18]、*IGF1R* 可激活 PI3K/Akt 信号通路促进 AML 细胞生长^[19]。未来需进一步验证这些调控关系的功能机制及临床意义。

此外, 本研究纳入的 3 例患者均为急性单核细胞白血病, 其骨髓液涂片报告单均依据白血病细胞形态特征作出诊断。然而, 鉴于目前 AML 诊断分型主要依据 MICM 整合方案, 本研究样本的局限性显而易见。因此, 在分析 BMSCs 来源外泌体 miRNA 的表达改变及其与 AML 患者预后关系时, 研究对象的代表性存在不足。未来的研究应纳入更多 AML 亚型的样本, 以更全面地探讨 BMSCs 来源外泌体 miRNA 在不同 AML 亚型中的表达差异及其预后意义。同时, 本研究的标本筛选标准为白血病细胞比例大于 90%, 确保骨髓液中其他正常造血细胞比例极少, 从而最大程度保证了筛选方法的可信度。本研究还存在以下局限性: 受 TCGA 数据库样本量限制 ($n = 145$), 可能导致统计学显著性不足, AML 具有高度异质性, 存在部分罕见亚型, 小样本难以覆盖足够病例, 导致亚组分析的深度不足, 未来需要在本中心或多中心开展前瞻性研究以增加样本量。

综上所述, 研究通过测序技术挖掘出了 5 个在 AML 骨髓上清液外泌体中 BMSCs 来源的差异表达 miRNA, 并利用公共数据库进一步验证其在 AML 患者预后中的预测作用, 为将骨髓上清液中源自 BMSCs 外泌体 miRNA 作为 AML 患者预后指标提供了前期基础。

参考文献

- [1] Döhner H, Weisdorf D J, Bloomfield C D. Acute myeloid leukemia[J]. N Engl J Med, 2015, 373 (12): 1136-52. doi:10.1056/NEJMra1406184.

- [2] Witkowski M T, Kousteni S, Aifantis I. Mapping and targeting of the leukemic microenvironment [J]. *J Exp Med*, 2020, 217(2): e20190589. doi:10.1084/jem.20190589.
- [3] Jalilivand S, Izadirad M, Vazifeh Shiran N, et al. The effect of bone marrow mesenchymal stromal cell exosomes on acute myeloid leukemia's biological functions: a focus on the potential role of LncRNAs [J]. *Clin Exp Med*, 2024, 24 (1): 108. doi:10.1007/s10238-024-01364-6.
- [4] Amin A H, Al Sharifi L M, Kakhharov A J, et al. Role of acute myeloid leukemia (AML)-derived exosomes in tumor progression and survival [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 113009. doi:10.1016/j.biopha.2022.113009.
- [5] Liu Y, Cheng Z, Pang Y, et al. Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 51. doi:10.1186/s13045-019-0734-5.
- [6] Otmani K, Rouas R, Lagneaux L, et al. Acute myeloid leukemia-derived exosomes deliver miR-24-3p to hinder the T-cell immune response through DENN/MADD targeting in the NF-κB signaling pathways [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 253. doi:10.1186/s12964-023-01259-1.
- [7] Zhao C, Du F, Zhao Y, et al. Acute myeloid leukemia cells secrete microRNA-4532-containing exosomes to mediate normal hematopoiesis in hematopoietic stem cells by activating the LDOC1-dependent STAT3 signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 384. doi:10.1186/s13287-019-1475-7.
- [8] Huang Y, Zou Y, Lin L, et al. Identification of serum miR-34a as a potential biomarker in acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(4): 799-805. doi:10.3233/CBM-181381.
- [9] Fang Z, Wang X, Wu J, et al. High serum extracellular vesicle miR-10b expression predicts poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Biomark*, 2020, 27 (1): 1-9. doi:10.3233/CBM-190211.
- [10] 中华医学会血液学分会白血病淋巴瘤学组. 成人急性髓系白血病(非急性早幼粒细胞白血病)中国诊疗指南(2023年版) [J]. 中华血液学杂志, 2023, 44(9): 705-12. doi:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2023.09.001.
- [10] Leukemia & Lymphoma Group, Chinese Society of Hematology, Chinese Medical Association. Chinese guidelines for diagnosis and treatment of adult acute myeloid leukemia (not APL) (2023) [J]. *Chin J Hematol*, 2023, 44 (9): 705-12. doi:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2023.09.001.
- [11] 张娟娟, 李瑞玮, 贺继刚, 等. 外泌体源 miRNA 在白血病发病机制中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23 (17): 2776-81. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.1693.
- [11] Zhang J J, Li R W, He J G, et al. Research progress in the roles of exosomal miRNA in leukemia [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2019, 23 (17): 2776-81. doi:10.3969/j.issn.2095-4344.1693.
- [12] Zhi Y, Xie X, Wang R, et al. Serum level of miR-10-5p as a prognostic biomarker for acute myeloid leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2015, 102 (3): 296-303. doi:10.1007/s12185-015-1829-6.
- [13] Mosakhani N, Räty R, Tybäkinoja A, et al. microRNA profiling in chemoresistant and chemosensitive acute myeloid leukemia [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2013, 141(4): 272-6. doi:10.1159/000351219.
- [14] Niu M, Feng Y, Zhang N, et al. High expression of miR-25 predicts favorable chemotherapy outcome in patients with acute myeloid leukemia [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 122. doi:10.1186/s12935-019-0843-9.
- [15] Dell'Aversana C, Giorgio C, D'Amato L, et al. miR-194-5p/BCLAF1 deregulation in AML tumorigenesis [J]. *Leukemia*, 2017, 31(11): 2315-25. doi:10.1038/leu.2017.64.
- [16] Huang W, Wu X, Xiang S, et al. Regulatory mechanism of miR-20a-5p expression in Cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8: 262. doi:10.1038/s41420-022-01005-5.
- [17] Lawson H, Holt-Martyn J P, Dembitz V, et al. The selective prolyl hydroxylase inhibitor IOX5 stabilizes HIF-1 α and compromises development and progression of acute myeloid leukemia [J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(6): 916-37. doi:10.1038/s43018-024-00761-w.
- [18] Yilmaz O H, Valdez R, Theisen B K, et al. Pten dependence distinguishes hematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells [J]. *Nature*, 2006, 441 (7092): 475-82. doi:10.1038/nature04703.
- [19] Chapuis N, Tamburini J, Cornillet-Lefebvre P, et al. Autocrine IGF-1/IGF-1R signaling is responsible for constitutive PI3K/Akt activation in acute myeloid leukemia: therapeutic value of neutralizing anti-IGF-1R antibody [J]. *Haematologica*, 2010, 95 (3): 415-23. doi:10.3324/haematol.2009.010785.

Differential expression and prognostic significance of exosomal miRNA derived from bone marrow stromal cells in the bone marrow supernatants of patients with AML

Dai Wei¹, Wang Xiaoting¹, Fu Wenjuan², Li Qiushuang², Zhou Tianhui², Lu Mengyuan², Huang Huifang¹

(¹Central Laboratory, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001; ²Department of Medical Laboratory, College of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou 350004)

Abstract **Objective** To investigate the aberrant alterations of microRNAs (miRNAs) in exosomes derived from

bone marrow stromal cells (BMSCs) in the bone marrow supernatants of patients with acute myeloid leukemia (AML) and their impact on the prognosis of AML patients. **Methods** Bone marrow supernatant samples were collected from three AML patients and three healthy donors. Exosomes were isolated using a commercial kit, identifying the morphology and marker expression, and subjected to miRNA sequencing to determine differentially expressed miRNAs (DE-miRNAs). The DE-miRNAs were then intersected with the exosomal miRNA expression profiles of primary AML cells (GSE64029) to exclude AML cell-derived signals and to identify BMSC-derived DE-miRNAs. Subsequently, candidate miRNAs were identified through Cox regression and Lasso regression analyses based on data from The Cancer Genome Atlas (TCGA). A prognostic risk model for AML was constructed, and patients were stratified into high-risk and low-risk groups according to the median risk score. The prognostic value and clinical relevance of the model were further validated. Finally, the target genes of the candidate miRNAs were predicted, followed by pathway enrichment analysis, construction of key regulatory networks, and correlation analysis between the expression levels of key miRNAs and their corresponding target genes. **Results** Isolated exosomes exhibited a typical cup-shaped morphology with intact structures with particle size of 30–150 nm, and expressed exosomal markers CD63, ALIX, and TSG101. miRNA sequencing identified 103 DE-miRNAs in AML patients compared with healthy donors; after intersection with the GSE64029 dataset, 83 BMSC-derived DE-miRNAs were retained. Among these, five candidate miRNAs (miR-25-3p, miR-532-5p, miR-194-5p, miR-10a-5p, and miR-20a-5p) were used to construct the prognostic model. Kaplan-Meier survival analysis demonstrated significantly longer overall survival in the low-risk group compared with the high-risk group ($P < 0.05$). The areas under the ROC curve for the training/validation cohorts were 0.80/0.74, 0.80/0.78, and 0.79/0.64 at 1, 2, and 3 years, respectively. The prognostic model was significantly associated with risk stratification, patient age, and FAB classification ($P < 0.05$). KEGG pathway enrichment revealed that target genes of the candidate miRNAs were closely linked to cancer-related signaling pathways, including hepatocellular carcinoma, breast cancer, and non-small cell lung cancer. Correlation analysis indicated that the candidate miRNAs were significantly associated with key genes such as *HIF1A*, *CREB1*, *PIK3CA*, *IGF1R*, *PIK3R1*, *TIAM1*, *CRK*, and *PTEN* ($P < 0.05$). **Conclusion** AML patients exhibit distinct miRNA expression profiles in BMSC-derived exosomes. A five-miRNA signature (miR-25-3p, miR-532-5p, miR-194-5p, miR-10a-5p, and miR-20a-5p) demonstrates robust prognostic performance, supporting its potential clinical utility in risk stratification and outcome prediction for AML.

Key words acute myeloid leukemia; prognosis; bone marrow supernatant; exosomes; microRNAs; bone marrow stromal cells

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81902125); Government-funded Project for the Construction of high-level Laboratory of Fujian Province (No. Min201704); College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project in Fujian Medical University (No. C23193)

Corresponding author Huang Huifang, E-mail: huanghuif@fjmu.edu.cn