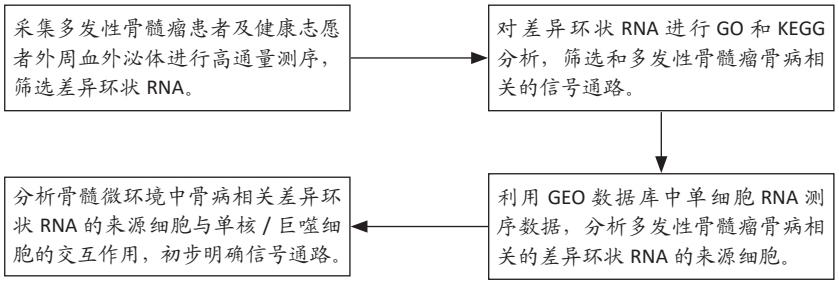
骨髓微环境中不同细胞对多发性骨髓瘤骨病外泌体环状 RNA 的贡献及相互作用

于漫亚[1]，崔 兴[2]

https://doi.org/10.12307/2025.567
投稿日期：2024-09-20
采用日期：2024-11-14
修回日期：2024-12-23
在线日期：2025-01-07
中图分类号：
R459.9；R318；R733.3
文章编号：
2095-4344(2026)01-00101-10
文献标识码：A

文章快速阅读： 多发性骨髓瘤骨病相关外周血外泌体环状 RNA 来源及骨髓微环境的干预作用



文题释义：

多发性骨髓瘤骨病：是多发性骨髓瘤的特征性表现之一，初诊多发性骨髓瘤患者中高达80%存在溶骨性损害。骨放射学检查可见1个或1个以上穿凿样溶骨性骨破坏病灶(≥5 mm)。多发性骨髓瘤骨病的发病机制与骨髓微环境失调密切相关，多发性骨髓瘤细胞与骨髓间充质干细胞、破骨细胞、成骨细胞、骨细胞和免疫细胞之间的相互作用导致骨代谢和骨重塑失衡，引发多发性骨髓瘤骨病的发生。

外泌体：是直径为30−150 nm的囊泡类小体，携带有蛋白质、脂类、DNA和RNA等重要信息，不仅能反映来源细胞的类型，还能反映来源细胞的生理功能或病理状态。外泌体可由大多数活细胞分泌，广泛存在多种生物体液中，如血液、尿液、唾液、脑脊液等，具有成为某些疾病诊断标志物的潜力。在多发性骨髓瘤中，外泌体通过介导骨溶解、血管生成、免疫抑制和耐药性等过程发挥重要作用。

摘要

背景：多发性骨髓瘤骨病是多发性骨髓瘤的严重并发症，其发病机制与骨髓微环境失调密切相关。外泌体环状RNA因高稳定性、高丰度、高特异性、高保守性等特点，正逐渐成为液体活检的焦点。在多发性骨髓瘤骨病中，外泌体环状RNA的作用尚缺乏相关研究。随着单细胞RNA测序技术的发展，明确骨髓微环境中各类型细胞对多发性骨髓瘤骨病相关外泌体环状RNA的贡献及相互作用，有助于为多发性骨髓瘤骨病的诊疗提供新的生物标志物。

目的：初步明确多发性骨髓瘤骨病相关外周血外泌体环状RNA的骨髓微环境来源细胞，并在单细胞水平上探究骨髓微环境中各细胞相互作用对多发性骨髓瘤骨病的影响。

方法：对6例多发性骨髓瘤骨病患者和5名健康志愿者的外周血外泌体进行高通量测序，筛选差异环状RNA，并进行GO和KEGG富集分析。从GEO数据库中获取多发性骨髓瘤骨病患者的骨髓单细胞RNA测序数据集GSE271107，对其中的4例多发性骨髓瘤骨病患者数据进行整合，完成质控和过滤后，利用Harmony法去除批次效应，UMAP进行亚群聚类，SingleR自动注释后手动矫正细胞群，CellChat对单细胞RNA测序数据中的细胞间通讯进行推断和可视化，分析配体、受体间的相互作用。

结果与结论：①相较于健康志愿者，多发性骨髓瘤骨病患者外周血外泌体中1 265个环状RNA表达水平显著上调；②GO和KEGG分析差异环状RNA的亲本基因主要富集在神经系统发育、癌症中的通路、PI3K-Akt信号通路、Hippo信号通路、致心律失常性右心室心肌病、扩张型心肌病等，这与骨髓瘤细胞的增殖、黏附、迁移、归巢，以及多发性骨髓瘤相关并发症(如多发性骨髓瘤骨病、周围神经病变、心脏事件)关系密切；③多发性骨髓瘤骨病相关差异环状RNA的亲本基因主要来源于骨髓微环境中的T细胞/自然杀伤细胞、B细胞和单核/巨噬细胞，通过调节多种细胞因子的分泌影响破骨细胞功能；④单核细胞/巨噬细胞作为破骨细胞前体细胞与骨髓瘤细胞及其他免疫细胞间均有相互作用，MIF通路是其参与的主要通路。以上结果初步明确了多发性骨髓瘤骨病相关外周血外泌体环状RNA的骨髓微环境来源细胞，并发现单核/巨噬细胞与骨髓瘤细胞及免疫细胞间的MIF通路配体−受体相互作用可能是多发性骨髓瘤骨病发生的重要因素。

关键词：多发性骨髓瘤骨病；外泌体；环状RNA；单细胞RNA测序；骨髓微环境；破骨细胞；PI3K-Akt信号通路；Hippo信号通路；工程化外泌体

Contribution and interaction of various cells in bone marrow microenvironment to exosomal circular RNA associated with multiple myeloma bone disease

Yu Manya[1], Cui Xing[2]

[1]First School of Clinical Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China; [2]Cancer Center, Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, Shandong Province, China

[1] 山东中医药大学第一临床学院，山东省济南市 250014；[2] 山东中医药大学第二附属医院肿瘤中心，山东省济南市 250001

第一作者：于漫亚，女，1998 年生，山东省菏泽市人，汉族，山东中医药大学在读硕士，主要从事中西医结合血液病临床及基础研究。

通讯作者：崔兴，博士，主任医师，教授，博士研究生导师，泰山学者青年专家，山东中医药大学第二附属医院肿瘤中心，山东省济南市 250001
https://orcid.org/0000-0002-8771-5898 (崔兴)

基金资助：国家自然科学基金面上项目 (82074348，82274491)，项目负责人：崔兴；山东省自然科学基金创新发展联合基金 (ZR2023LZL009)，项目负责人：崔兴

引用本文：于漫亚，崔兴 . 骨髓微环境中不同细胞对多发性骨髓瘤骨病外泌体环状 RNA 的贡献及相互作用 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):101-110.

Yu Manya, Master candidate, First School of Clinical Medicine, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, Shandong Province, China
Corresponding author: Cui Xing, MD, Chief physician, Professor, Doctoral supervisor, Cancer Center, Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, Shandong Province, China

Abstract

BACKGROUND: Multiple myeloma bone disease is a serious complication of multiple myeloma, and its pathogenesis is closely related to the dysregulation of the bone marrow microenvironment. Peripheral blood exosomes are secreted by various cell types and can reflect a variety of information such as the tumor microenvironment. Exosomal circular RNA is gradually becoming the focus of liquid biopsy due to its high stability, high abundance, high specificity, and high conservation. In multiple myeloma bone disease, there is still a lack of relevant research on the role of exosomal circular RNAs. With the development of single-cell RNA sequencing technology, clarifying the contribution of each cell type in the bone marrow microenvironment to multiple myeloma bone disease-related exosomal circular RNAs and the interaction between each cell type will help provide new biomarkers for the diagnosis and treatment of multiple myeloma bone disease.

OBJECTIVE: To preliminarily determine which cells in the bone marrow microenvironment the multiple myeloma bone disease-related peripheral blood exosomal circular RNAs originated from, and explore the effects of cell interactions in the bone marrow microenvironment on multiple myeloma bone disease at the single-cell level.

METHODS: Peripheral blood exosomes from six multiple myeloma bone disease patients and five healthy controls were collected for high-throughput sequencing, differently expressed circular RNAs were screened, and GO and KEGG enrichment analyses were performed. The bone marrow single-cell RNA sequencing dataset GSE271107 was obtained from the GEO database. The data of four multiple myeloma bone disease patients were integrated. After quality control and filtering, the batch effect was removed by Harmony method. Subgroup clustering was performed by UMAP, and cell groups were manually corrected after automatic annotation by SingleR. CellChat was used to infer and visualize the intercellular communication in single-cell RNA sequencing data, and analyze the interaction between ligands and receptors.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with healthy controls, the expression levels of 1 265 circular RNAs in peripheral blood exosomes of multiple myeloma bone disease patients were significantly upregulated. (2) GO and KEGG analyses suggested that the parent genes of differently expressed circular RNAs were mainly enriched in pathways in nervous system development, pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway, Hippo signaling pathway, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy, etc., which were closely related to the proliferation, adhesion, migration, and homing of myeloma cells, and multiple myeloma-related complications (such as multiple myeloma bone disease, peripheral neuropathy, and cardiac events). (3) The parent genes of multiple myeloma bone disease-related differential circular RNAs were mainly derived from T cells/natural killer cells, B cells and monocytes/macrophages in the bone marrow microenvironment, which affected osteoclast function by regulating the secretion of multiple cytokines. (4) Monocytes/macrophages, as osteoclast precursor cells, interacted with tumor cells and other immune cells. The MIF pathway was the main pathway involved. The above data preliminarily identified the source cells of multiple myeloma bone disease-related peripheral blood exosomal circular RNA in the bone marrow microenvironment, and found that the ligand-receptor interaction of the MIF pathway between monocytes/macrophages and tumor cells and immune cells may be an important factor in the occurrence of multiple myeloma bone disease.

Key words: multiple myeloma bone disease; exosome; circular RNA; single-cell RNA sequencing; bone marrow microenvironment; osteoclast; PI3K-Akt signaling pathway; Hippo signaling pathway; engineered exosome

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 82074348, 82274491 (to CX); Shandong Natural Science Foundation Innovation and Development Joint Fund, No. ZR2023LZL009 (to CX)*
How to cite this article: *YU MY, CUI X. Contribution and interaction of various cells in bone marrow microenvironment to exosomal circular RNA associated with multiple myeloma bone disease. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):101-110.*

0 引言 Introduction

多发性骨髓瘤是一种起源于骨髓的浆细胞恶性疾病，其特征是克隆异质性和骨髓依赖性，目前仍无法治愈[1]。多发性骨髓瘤骨病是多发性骨髓瘤的严重并发症，大约80%的多发性骨髓瘤患者在初诊时存在溶骨性病变，并且常常伴有骨骼相关事件，严重影响多发性骨髓瘤患者的生活质量和生存[2]。目前多发性骨髓瘤及多发性骨髓瘤骨病的诊断主要依靠骨髓检查及影像学检查，但由于侵入性及辐射性难以获得持续性样本，相比之下，非侵入性液体活检具有便捷、无创、可重复性等优势，逐渐成为肿瘤精准诊治的焦点。外泌体相较于其他分析物(如循环肿瘤细胞、循环肿瘤DNA等)在外周血中含量较高，而且携带信息更加丰富，由多种类型细胞分泌，能反映肿瘤微环境等多种信息[3]。越来越多的证据揭示了多发性骨髓瘤骨病的发病机制与骨髓微环境失调密切相关，多发性骨髓瘤细胞与骨髓间充质干细胞、破骨细胞、成骨细胞、骨细胞和免疫细胞之间的相互作用导致骨代谢和骨重塑的失衡，从而发生多发性骨髓瘤骨病[4]。外泌体是介导细胞间通讯的重要递质，明确骨髓微环境中不同细胞亚群分泌外泌体携带的遗传信息及其介导的细胞间的相互作用，将有助于发现新的生物标志物及治疗靶点[5]。目前，关于外泌体介导的细胞通讯对多发性骨髓瘤骨病的影响多集中在多发性骨髓瘤细胞分泌的外泌体，例如miR-92a-2-5p和miR-373-3p经由骨髓瘤细胞分泌的外泌体抑制单核细胞或间充质干细胞中IRF8、RUNX2表达，诱导破骨细胞激活，抑制成骨细胞分化[6]。骨髓瘤细胞中lncRNA RUNX2-AS1经由外泌体介导，通过下调间充质干细胞中的RUNX2抑制成骨分化[7]。骨髓微环境中的其他细胞分泌的外泌体对多发性骨髓瘤骨病的作用尚缺乏相关研究。环状RNA在外泌体中大量富集，与来源细胞相比，外泌体中的环状RNA含量更丰富，相较于其他遗传信息，具有稳定性强、半衰期长和抗降解性等特点，可广泛存在于体液中[8]。另外，环状RNA具有细胞类型特异性和发育阶段特异性的表达模式，可反映疾病某个阶段的整体生理、病理状态，显示出作为疾病诊断或预后生物标志物的巨大潜力[9]。

该研究对多发性骨髓瘤骨病患者及健康志愿者的外周血外泌体进行全转录组测序，筛选差异表达的环状RNA，分析对多发性骨髓瘤骨病起关键作用的环状RNA，并综合单细胞RNA测序(single cell RNA sequencing，scRNA-seq)技术，解析关键外泌体环状RNA的来源细胞，并在单细胞水平上明确骨

髓微环境中的细胞相互作用，揭示骨髓微环境对多发性骨髓瘤骨病的影响，为多发性骨髓瘤骨病的发病机制、诊疗及监测提供了新的见解。

1 对象和方法 Subjects and methods

1.1 设计 外周血临床样本试验。使用 R 软件 (版本 4.2.2) edgeR 包进行数据标准化和差异表达环状 RNA 筛选，根据每千碱基转录本每百万映射读数 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads，FPKM) 值计算差异表达倍数。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 10–11 月在山东中医药大学附属医院实验中心和上海云序生物科技有限公司完成。

1.3 对象 共采集 6 例多发性骨髓瘤骨病患者和 5 名健康对照者的外周血样本。患者的详细信息见**表 1**。

表 1 | 入组的多发性骨髓瘤骨病患者特征
Table 1 | Characteristics of enrolled multiple myeloma bone disease patients

编号	性别	年龄 (岁)	骨髓瘤细胞比例 (%)	M 蛋白比例 (%)	总蛋白 (g/L)	矫正后血钙 (mmol/L)	骨破坏数量	ISS 分期	DS 分期	类型
B01	男	58	8	4.5	61.54	2.33	1	1	2	IgG-λ
B02	男	51	33.8	47.4	101.71	2.72	4	3	3	IgA-k
B03	男	58	14.8	5.4	54.55	3.355	11	3	3	Kappa
B04	男	80	59.5	9.6	60.47	2.392 5	3	2	3	IgG-k
B05	女	74	47.3	40.4	84.26	2.452 5	8	3	3	IgA-k
B06	男	85	8	19.5	63.98	2.447 5	8	3	3	IgG-λ

多发性骨髓瘤骨病患者纳入标准：①符合《中国多发性骨髓瘤诊治指南 (2022 年修订)》中活动性多发性骨髓瘤的诊断标准，且放射学检查 (X 射线片、CT、低剂量 CT、MRI 或 PET-CT) 可见 1 个或 1 个以上穿凿样溶骨性骨破坏病灶 (≥ 5 mm)，既往未接受过治疗；②年龄≥ 18 岁；③预计患者生存期≥ 3 个月；④基线状态下意识清醒，无记忆力、理解力及注意力障碍；⑤未合并其他血液疾病或第二恶性肿瘤、肝、肾、心脏等主要脏器非肿瘤性严重疾病和功能障碍、活动性脑血管病变、不受控制的感染和代谢性疾病，以及自身免疫性疾病；⑥未参加其他临床研究。排除标准：①合并有其他血液疾病或第二恶性肿瘤、循环、呼吸、消化和泌尿系统等严重原发病者，或影响其生存的严重疾病；②有毒物接触史者；③孕妇及哺乳期产妇；④有严重认知障碍无法进行沟通者；⑤依从性差，或正在参加其他临床研究者。所有病例均由经验丰富的临床医生诊断。

健康对照组为进行健康检查招募的性别、年龄与多发性骨髓瘤骨病患者相匹配的健康志愿者。纳入标准：①年龄≥ 18 岁；②无重大基础疾病 (如心血管病、糖尿病、癌症、免疫系统疾病等)；③无长期使用免疫抑制剂、激素类药物等可能干扰研究的药物史；④身体健康，通过常规体检未发现潜在健康问题；⑤无严重过敏史或药物不良反应史；⑥无家族遗传性疾病史；⑦精神健康，能够理解并自愿参与研究；⑧未参加其他临床研究；⑨无妊娠或哺乳期女性。

将外周血收集在血凝固用真空采血管中，1 500×*g* 离心 10 min，收集血清，然后 3 000×*g* 离心 15 min 去除细胞和细胞碎片，将上清液转移到无菌容器中，使用 ExoQuick 外泌体沉淀试剂盒 (美国 System Biosciences 公司) 分离外泌体，每 250 μL 血清加入 63 μL ExoQuick 溶液，混合后冷藏 30 min，然后 1 500×*g* 离心 30 min，吸出上清液，再 1 500×*g* 离心 5 min，小心吸除残留的液体，加入 PBS 重悬外泌体，储存在 −80 ℃直至使用。

该研究经山东中医药大学附属医院伦理委员会批准，伦理号：(2020) 伦理第 (010) 号 -KY，并获得所有参与者的书面知情同意。

1.4 方法

1.4.1 高通量测序 所有样本均送至上海云序生物科技有限公司进行全转录组测序。使用 Ribo-Zero rRNA 去除试剂盒 (美国 Illumina 公司) 去除核糖体 RNA，使用 TruSeq Stranded Total RNA 样本制备试剂盒 (美国 Illumina 公司) 制备 RNA 文库，使用 BioAnalyzer 2100 系统 (美国 Agilent 公司) 分析 RNA 文库的数量和质量，然后将 RNA 文库反转录为 cDNA，通过 illumina 流动池捕获、原位扩增，最后使用 HiSeq 4000 测序系统 (美国 Illumina 公司) 进行测序。

1.4.2 GO 和 KEGG 富集分析 以差异倍数≥ 2.0 且 $P \leq 0.05$ 为标准，筛选两组样本间差异表达的环状 RNA。使用 GO 数据库 (http://www.geneontology.org) 和 KEGG 数据库 (http://www.genome.jp/kegg) 对差异环状 RNA 的亲本基因分别进行 GO 和 KEGG 富集分析 ($P \leq 0.05$ 为差异显著)，用 R 包 ggolot2 绘制示意图。

1.4.3 单细胞 RNA 测序数据获取和预处理 从 GEO 数据库 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) 中下载 GSE271107 单细胞 RNA 测序数据集文件，包括 5 例健康志愿者，4 例冒烟型骨髓瘤患者，6 例意义未明单克隆丙种球蛋白血症患者和 4 例多发性骨髓瘤患者 (均为黄色人种)。该研究选取 4 例多发性骨髓瘤患者进行分析。使用 Seurat 包“CreateSeuratObject”函数将多发性骨髓瘤样本转换为 Seurat 对象，以 feature 值 > 200 且 < 3 000，count 值 < 40 000，线粒体基因含量 < 20% 为标准对细胞进行质控和过滤，并按照 4% 的预测值去除双细胞。质控前为 36 012 个细胞，质控后剩余 21 868 个细胞。

1.4.4 单细胞 RNA 测序数据分析 使用 Seurat 包“FindIntegrationAnchors”函数对标准化数据进行整合。使用“SelectIntegrationFeatures”选择 3 000 个高度可变的基因

进行主成分分析，使用 Harmony 法去除批次效应。均匀流形近似与投影 (uniform manifold approximation and projection，UMAP) 可聚类出 7 个细胞亚群，分辨率设置为 0.1。利用 SingleR 包对细胞类型进行初步注释，将自动注释结果与既往发表的研究相结合，手动矫正细胞群 [10]。

1.4.5 细胞通讯分析 使用 R 包 CellChat 对单细胞 RNA 测序数据中的细胞间通讯进行推断和可视化，分析配体、受体间的相互作用。

1.5 主要观察指标 ①与健康志愿者比较，多发性骨髓瘤骨病患者外周血外泌体中差异表达的环状 RNA，以差异倍数≥ 2.0 且 $P \leq 0.05$ 为筛选标准；②通过 GO 和 KEGG 富集分析，探索差异环状 RNA 的亲本基因主要参与的生物学通路，及其与多发性骨髓瘤及相关骨病的关系；③通过单细胞 RNA 测序分析，推测与多发性骨髓瘤骨病相关的差异环状 RNA 的骨髓微环境来源细胞；④细胞间通讯分析，特别是单核 / 巨噬细胞与其他细胞的交互作用及分子途径。

2 结果 Results

2.1 差异环状 RNA 的筛选 以差异倍数对数的绝对值 ($\log_2$|fold change (FC)|)> 1 且矫正后的 P 值 < 0.05(Q 值) 为阈值，筛选并鉴定出 2 052 个差异表达的环状 RNA，聚类分析图展示了每个样本中差异基因的表达概况，见**图 1**。与健康志愿者相比，多发性骨髓瘤骨病患者表达上调的环状 RNA 有 1 265 个，下调的环状 RNA 有 787 个。从中获得差异表达最显著的上调及下调的环状 RNA 各 10 个，相关信息见**表 2**。

表 2 | 与健康对照组相比，多发性骨髓瘤骨病患者外周血外泌体中前 10 个上调和下调最显著的环状 RNA

Table 2 | Top 10 significantly upregulated and downregulated circular RNAs in peripheral blood exosomes of multiple myeloma bone disease patients compared to healthy controls

上调的环状 RNA			下调的环状 RNA		
环状 RNA	Q 值	$\log_2$FC	环状 RNA	Q 值	$\log_2$FC
chr2:2744264-2744443+	0.002 8	8.11	chr7:151946961-151948051-	0.004 3	−7.717
chr2:2744228-2744407+	0.002 8	8.11	chr11:108046973-108047817-	0.004 7	−7.64
chr7:75847812-75847976+	0.006 9	7.27	chr5:138699448-138700432+	0.005 8	−7.46
chr19:42853602-42853758-	0.010 9	6.90	chr6:18236683-18258636-	0.006 0	−7.44
chr7:33923121-33923277-	0.011 3	6.88	chr8:71126138-71128999-	0.006 8	−7.35
chr1:181379313-181379498-	0.012 1	6.82	chr9:79996892-80022523+	0.007 2	−7.31
chr11:85831034-85831205-	0.012 9	6.77	chr2:89100616-89104394+	0.007 2	−7.31
chr12:69748686-69748849-	0.013 2	6.75	chr17:30267305-30315516+	0.008 0	−7.23
chr3:3830938-3831112+	0.014 4	6.67	chrX:76907604-76912143-	0.008 2	−7.21
chr7:30728074-30728244+	0.014 6	6.66	chr19:23541232-23545527-	0.008 3	−7.21

2.2 GO 分析和 KEGG 分析 对多发性骨髓瘤骨病患者中表达水平显著上调的环状 RNA 进行 GO 和 KEGG 富集分析 (**图 2A**，**B**)，结果显示差异环状 RNA 的亲本基因主要富集在神经系统发育、谷氨酸受体信号通路、细胞信号转导、癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、Hippo 信号通路、致心律失常性右心室心肌病、扩张型心肌病、昼夜节律同步、肥厚型心肌病通路。相关研究表明，PI3K-Akt 信号通路和 Hippo 信号通路与骨髓瘤细胞的存活、增殖、迁移和代谢密切相关 [11-12]。此外，PI3K-Akt 信号通路在骨重塑中发挥重要作用，抑制 PI3K 可以促进矿化，并抑制破骨细胞生成 [13]；Hippo 信号通路可以与 Wnt 通路相互作用调节骨生成，其通路成分如 YAP/TAZ/TEAD 复合物、RASSF2、MST2 等也与破骨细胞成熟和功能有关，是多发性骨髓瘤骨病的重要调节因子 [14-15]。

2.3 单细胞降维、聚类分析 为了推测与多发性骨髓瘤骨病相关的差异环状 RNA 的来源细胞，选取 GSE271107 数据集中 4 例多发性骨髓瘤患者的骨髓单细胞 RNA 测序数据。通过对单细胞 RNA 测序数据的质控、UMAP 降维，获得了 21 868 个细胞的转录组数据。根据基因的表达对细胞进行自动注释和手动矫正，分别是 T 细胞 / 自然杀伤细胞 (7 351 个)、单核细胞 / 巨噬细胞 (4 077 个)、红细胞祖细胞 (2 849 个)、红细胞 (2 585 个)、骨髓瘤细胞 (2 508 个)、B 细胞 (2 380 个)、树突状细胞 (118 个)，见**图 3A**，**B**。通过对 7 个注释出的细胞亚群进行差异化分析，并绘制火山图，可以看出在不同细胞亚群中显著上调和下调的前 3 位差异基因，见**图 3C**。

2.4 外泌体环状 RNA 溯源 将多发性骨髓瘤骨病相关差异环状 RNA 的亲本基因 (参与 PI3K-Akt 通路和 Hippo 通路的差异基因) 通过单细胞 RNA 测序的聚类特征图 (**图 4**) 可视化，发现 GNB1、JAK1、THEM4、TCF7L2、GSK3B 分布在特定的细胞亚群中，GNB1 和 JAK1 主要分布在 T 细胞 / 自然杀伤细胞、B 细胞和单核 / 巨噬细胞中，GSK3B 主要分布在 T 细胞 / 自然杀伤细胞和单核 / 巨噬细胞中，TCF7L2 主要分布在单核 / 巨噬细胞中，THEM4 主要分布在 T 细胞 / 自然杀伤细胞中，由此推测多发性骨髓瘤骨病相关差异环状 RNA 主要来源于骨髓微环境中的 T 细胞 / 自然杀伤细胞、B 细胞和单核细胞 / 巨噬细胞。

2.5 单核 / 巨噬细胞与其他细胞的交互作用 单核 / 巨噬细胞作为破骨细胞的前体细胞，其向破骨细胞的分化在多发性骨髓瘤骨病的病理过程中发挥重要作用。为了在单细胞水平上探究单核 / 巨噬细胞与骨髓微环境中其他细胞类型的交互作用，利用 CellChat 检测不同细胞间的配体 − 受体对及分子相互作用，细胞间互作强度网络见**图 5A**，**B**，单核 / 巨噬细胞与红细胞祖细胞、红细胞、骨髓瘤细胞、B 细胞、树突状

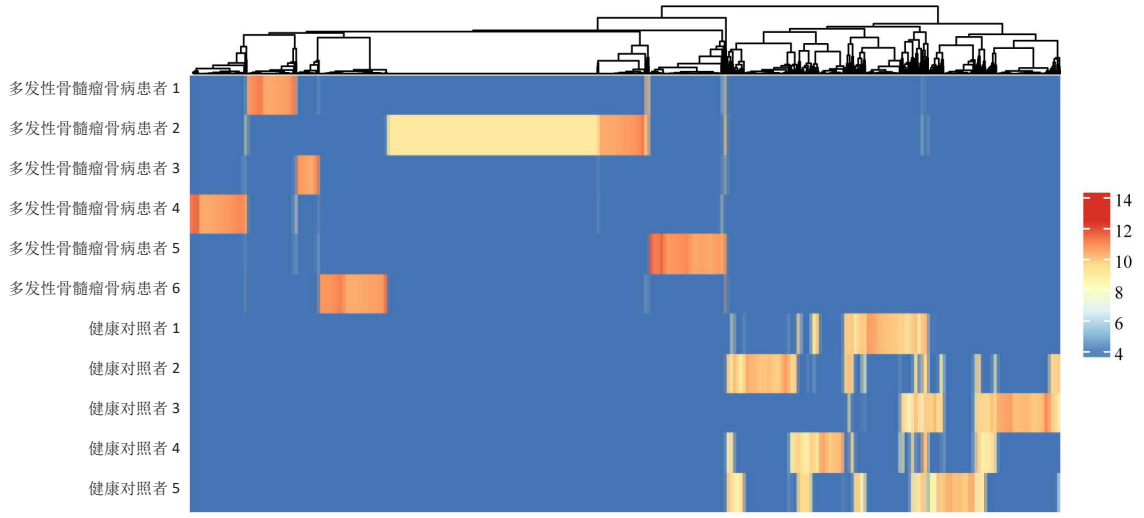
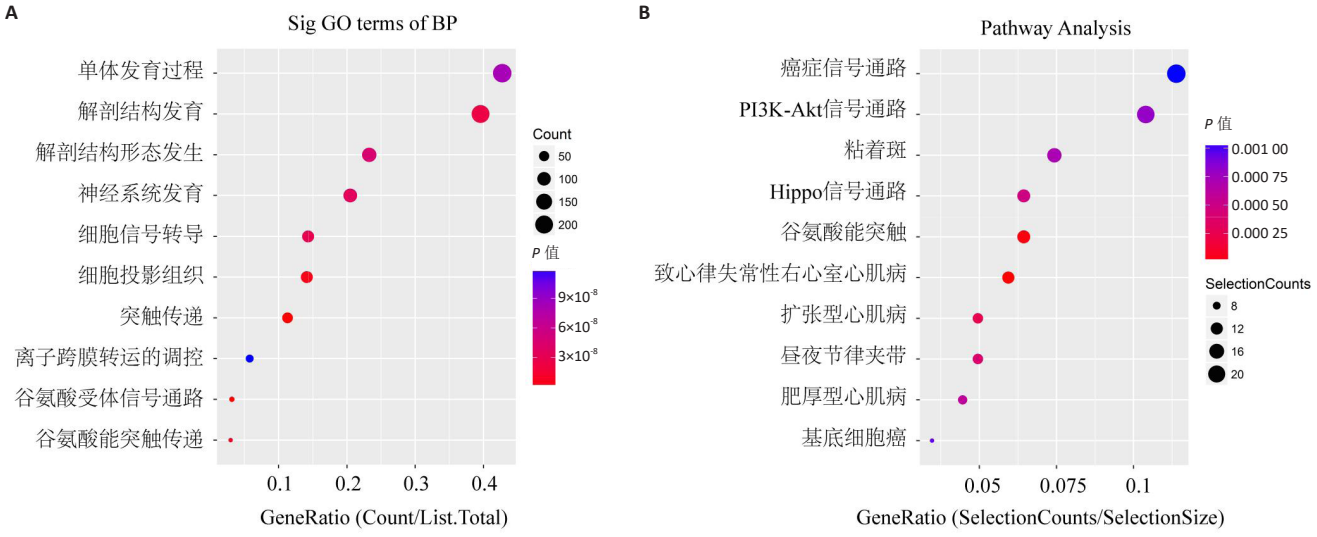


图 1 | 差异环状 RNA 的聚类分析

Figure 1 | **Cluster analysis of differentially expressed circular RNAs**



图注：图 A 为 GO 富集分析的前 10 个生物学过程；B 为 KEGG 富集分析的前 10 条信号通路。

图 2 | 多发性骨髓瘤骨病中显著上调的环状 RNA 的 GO 和 KEGG 富集分析

Figure 2 | **GO and KEGG enrichment analysis of significantly upregulated circular RNAs in multiple myeloma bone disease**

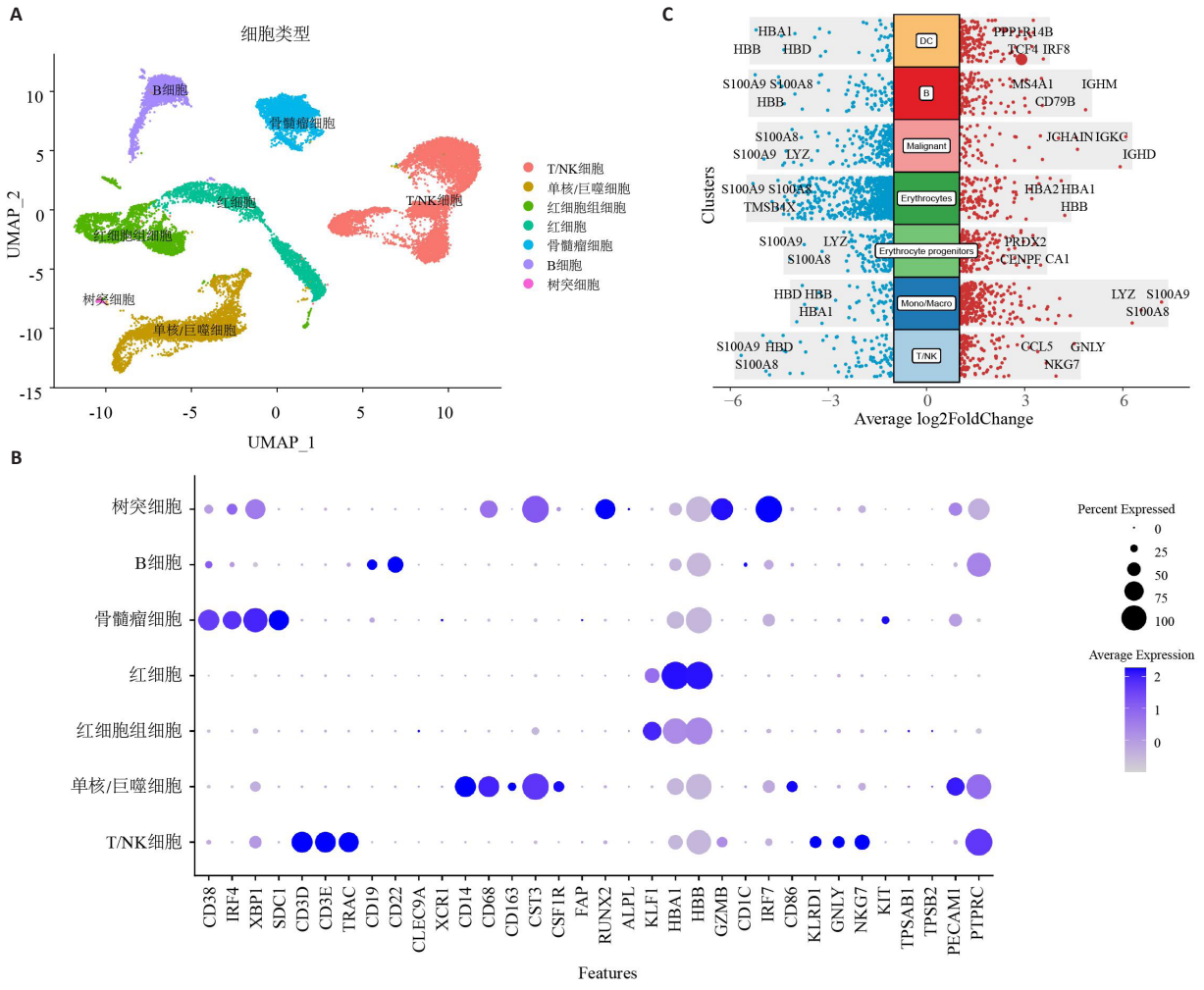
细胞、T 细胞 / 自然杀伤细胞均有交互作用，其与树突状细胞和 B 细胞交互作用较强，这表明骨髓微环境中的多种细胞均与破骨细胞的前体细胞间存在细胞通讯。

2.6　配体受体互作分析　为进一步明确细胞间相互作用的分子途径，利用 CellChat 探究单核 / 巨噬细胞作为受体参与的信号通路 (**图 6A**)，其主要参与的 MIF 通路在单核 / 巨噬细胞向破骨细胞分化过程中发挥重要作用。作用于单核 / 巨噬细胞的 MIF 主要来源于 T 细胞 / 自然杀伤细胞、树突状细胞、骨髓瘤细胞、B 细胞以及单核 / 巨噬细胞 (**图 6B**)。

3　讨论　Discussion

该研究利用全转录组测序获得了多发性骨髓瘤骨病患者与健康志愿者外周血外泌体环状 RNA 表达谱，并通过 GO 和 KEGG 分析预测差异环状 RNA 参与多发性骨髓瘤骨病病理过程的可能机制。综合单细胞 RNA 测序结果推测关键环状 RNA 的骨髓微环境来源细胞，并提出单核 / 巨噬细胞作为破骨细胞前体细胞，其与骨髓瘤细胞及其他免疫细胞间的 MIF 通路配体 – 受体互作是导致多发性骨髓瘤骨病发生的关键。

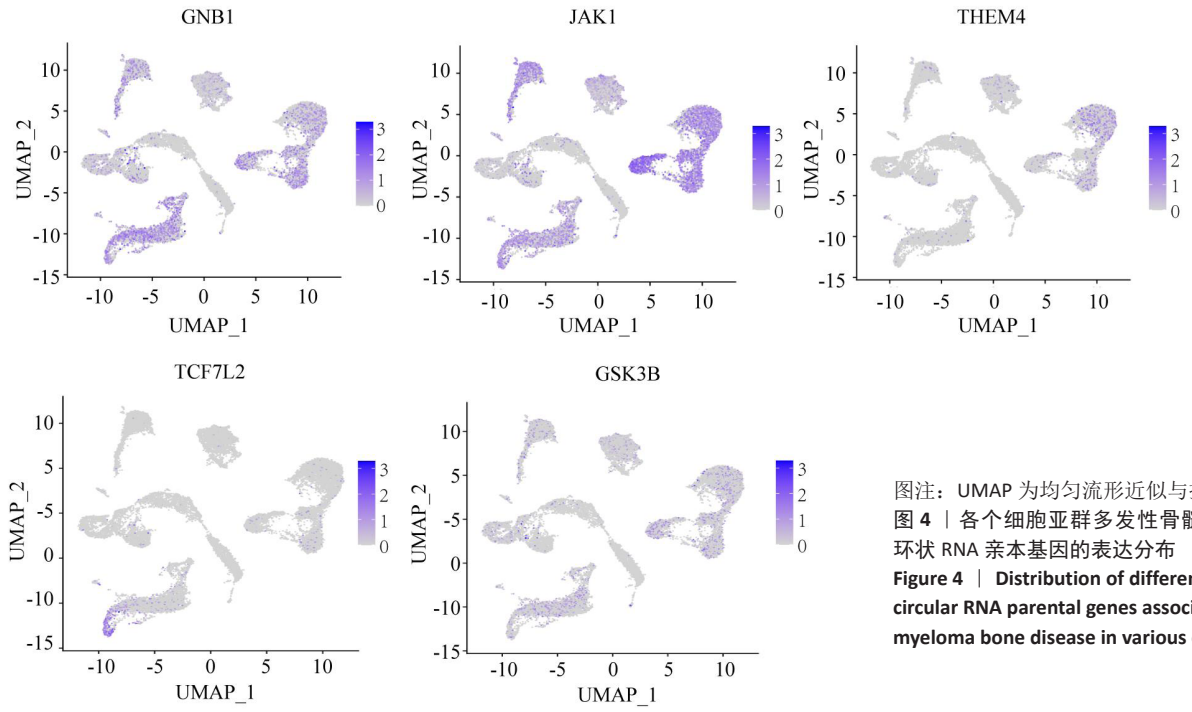
外泌体是介导细胞间通讯的重要递质。在多发性骨髓瘤中，骨髓瘤细胞及肿瘤微环境中其他细胞分泌的外泌体参与多发性骨髓瘤血管生成、免疫抑制、诱导耐药以及相关并发症的发生 [16-19]。外泌体在体液中大量富集，并且肿瘤细胞及肿瘤微环境释放的外泌体含有大量特异性的遗传信息，可以反映其亲本细胞生理、病理状态的改变，这些



图注：图 A 为 7 种细胞亚群的 UMAP 可视化形式；B 为各细胞亚群的特征基因表达分布；C 为各细胞亚群显著差异基因火山图，以及显著上调和下调的前 3 位差异基因。NK 细胞：自然杀伤细胞。

图 3 | 多发性骨髓瘤骨病患者骨髓微环境的均匀流形近似与投影 (UMAP) 图谱

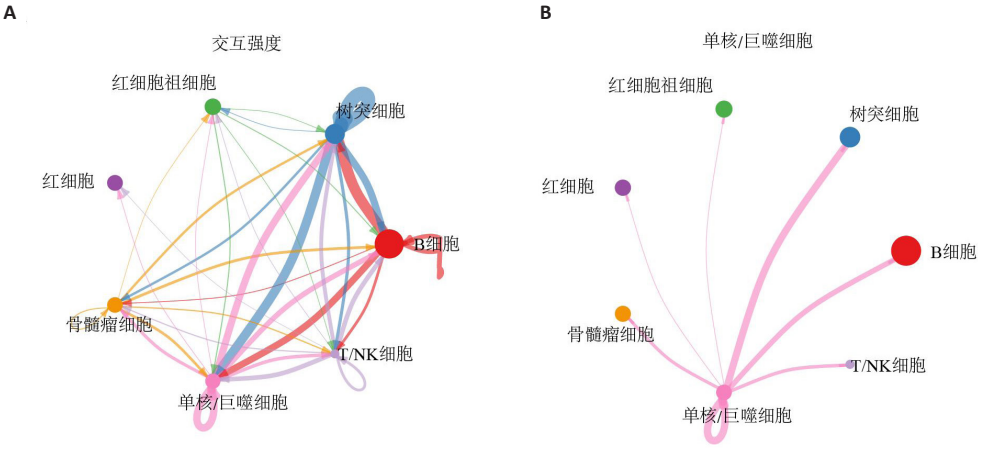
Figure 3 | Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) plot of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma bone disease patients



图注：UMAP 为均匀流形近似与投影。

图 4 | 各个细胞亚群多发性骨髓瘤骨病相关差异环状 RNA 亲本基因的表达分布

Figure 4 | Distribution of differentially expressed circular RNA parental genes associated with multiple myeloma bone disease in various cell subsets



图注：图 A 为不同细胞亚群间的通讯强度；B 为单核 / 巨噬细胞与各细胞亚群的通讯强度。NK 细胞：自然杀伤细胞。

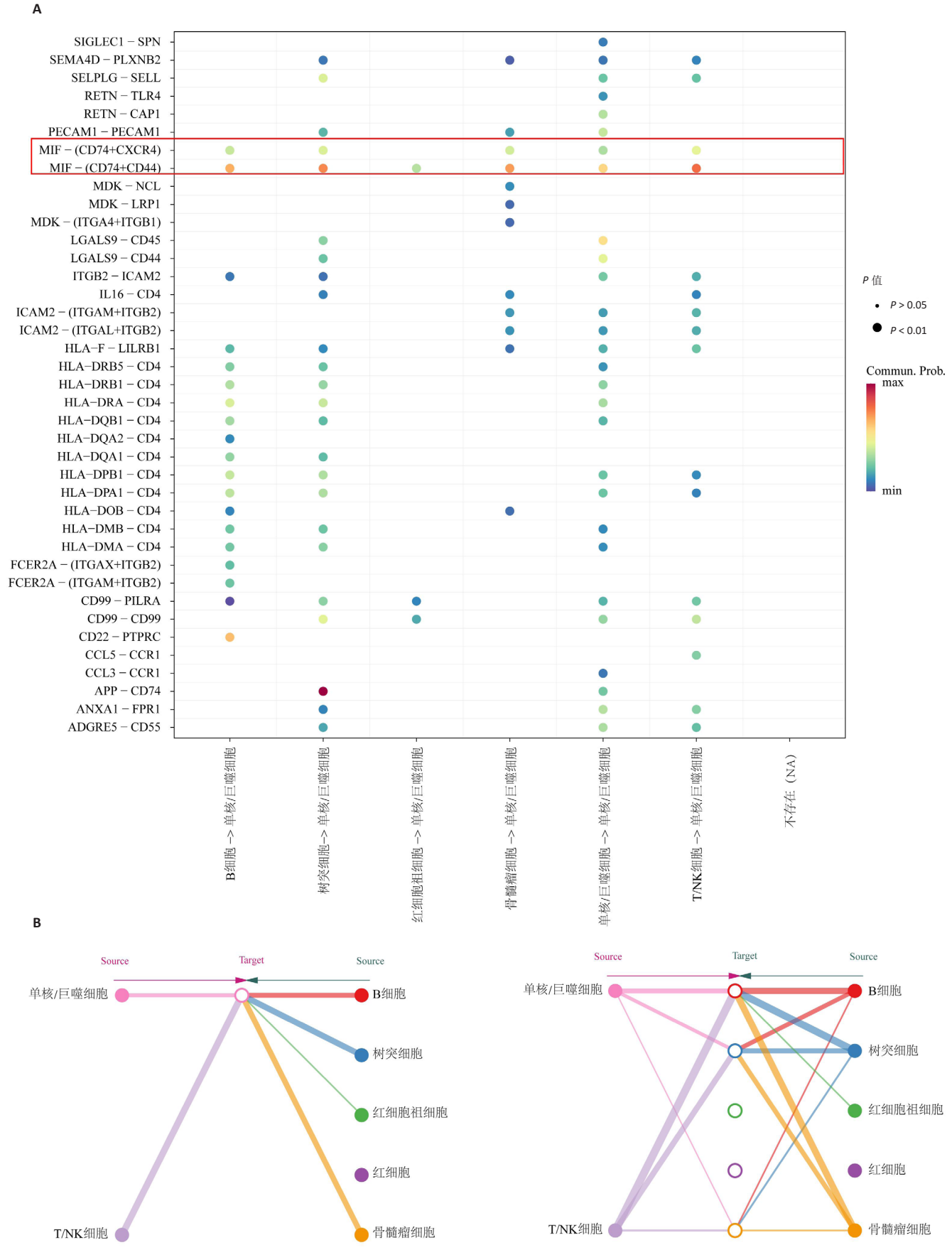
图 5 | 多发性骨髓瘤骨病骨髓微环境中的细胞间相互作用

Figure 5 | Cell-cell interactions in the bone marrow microenvironment of multiple myeloma bone disease

特点导致循环外泌体可能成为肿瘤液体活检的新型生物标志物 [3]。该研究通过高通量测序技术识别出 1 265 个在多发性骨髓瘤骨病外周血外泌体中显著上调的环状 RNA，生物信息学分析显示其参与的主要通路在骨髓瘤细胞的增殖、黏附、迁移、归巢、代谢 (PI3K-Akt 信号通路、Hippo 信号通路)[12, 20-21]，以及多发性骨髓瘤相关并发症，如：多发性骨髓瘤骨病 (PI3K-Akt 信号通路、Hippo 信号通路)[11, 22]、心脏事件 (致心律失常性右心室心肌病、扩张型心肌病、昼夜节律同步、肥厚型心肌病通路) 和周围神经病变 (神经系统发育通路) 中发挥重要作用。PI3K-Akt 信号通路多方面参与多发性骨髓瘤的发生和进展。白细胞介素 6 和胰岛素样生长因子 1 等关键生长因子可激活 PI3K-Akt 通路，促进骨髓瘤细胞的存活、增殖、迁移和耐药性 [23]。此外，AKT1 和 AKT2 作为 RANKL/NF-κB 轴的一部分参与破骨细胞分化和激活 [24]，AKT 还被证明介导转化生长因子 β1 依赖的成骨细胞分化 [25]。在多发性骨髓瘤中，PI3K 抑制剂 BKM120 能有效预防骨髓瘤小鼠模型的溶骨性病变 [26]。Hippo 信号通路是多发性骨髓瘤骨病的重要调节因子，Hippo 通路中的 YAP 分子与胞质中的 APC/β-catenin 复合物结合，促进其通过蛋白酶体的降解，从而对 Wnt 信号产生拮抗作用，有利于成骨过程 [27]。而核内 YAP 与 β-catenin 相互作用，导致核内 β-catenin 水平持续增加，延长前成骨效应 [14]。通路中的 YAP/TAZ/TEAD 复合物、RASSF2、MST2 也与破骨细胞成熟和功能有关 [15]。此外，Hippo 信号通路中的 TAZ 分子在多发性骨髓瘤患者血清中的表达显著降低，TAZ 是转录因子 Runx2 的共激活因子，后者可以诱导间充质干细胞向成骨细胞分化 [28]。

该研究进一步探索了多发性骨髓瘤骨病相关环状 RNA 的来源细胞，基于单细胞 RNA 测序结果，发现多发性骨髓瘤骨病相关环状 RNA 的亲本基因在单核细胞 / 巨噬细胞、T 细胞 / 自然杀伤细胞、B 细胞等免疫细胞中富集。单核细胞 / 巨噬细胞是破骨细胞前体细胞，在巨噬细胞集落刺激因子和 RANKL 等信号分子的作用下，下游 PI3K-Akt、MAPK、NF-κB 等信号通路被激活，促进破骨细胞前体的融合和分化 [29-30]。免疫细胞通过分泌多种细胞因子参与调节骨代谢和破骨细胞功能，如 Th17 细胞分泌白细胞介素 17，促进破骨细胞生成 [31]，调节性 T 细胞分泌的转化生长因子 β 和白细胞介素 10 抑制破骨细胞分化 [32]。PI3K-Akt 通路可以正向调节 Th17 细胞的分化 [33]，Hippo 通路在维持调节性 T 细胞池和功能，以及调节 Th17 细胞的产生中发挥重要作用 [34]。自然杀伤细胞通过产生 RANKL 和巨噬细胞集落刺激因子促进单核细胞向破骨细胞分化，而 PI3K-Akt 通路和 Hippo 通路可以调节自然杀伤细胞的增殖，并维持细胞稳态 [35-37]。B 细胞可以分泌多种细胞因子，包括白细胞介素 1、白细胞介素 6、白细胞介素 7、白细胞介素 10、白细胞介素 35、白细胞介素 37、肿瘤坏死因子 α 和转化生长因子 β 等，在不同的环境中促进或抑制破骨细胞生成 [38-40]，而 PI3K-Akt 通路对 B 细胞的发育和免疫应答至关重要 [41]。因此，多发性骨髓瘤骨病相关外周血外泌体环状 RNA 可能来源于骨髓微环境中的免疫细胞，通过调节 PI3K-Akt 通路和 Hippo 通路参与多发性骨髓瘤骨病的病理进程。

在单细胞水平上分析了多发性骨髓瘤骨髓微环境中单核细胞 / 巨噬细胞与其他细胞类型的交互作用，并探索了其他潜在的信号通路。单核细胞 / 巨噬细胞与骨髓瘤细胞及免疫细胞均有交互作用，主要参与的通路有 MIF 通路。MIF 通过与 CXCR 或 CD74 受体结合发挥其生物学作用，MIF 与 CD74 的结合诱导其磷酸化和 CD44 的募集，导致 ERK1/2 磷酸化和 ERK-MAPK 通路的持续激活。MIF 与 CXCR 结合还可诱导炎症和免疫细胞趋化 [42]。在多发性骨髓瘤骨病中尚未明确 MIF 信



图注：图 A 为单核 / 巨噬细胞作为受体细胞与其他细胞间配体 – 受体对介导的相互作用的气泡图；B 为 MIF 通路与细胞间通讯关系网络图。NK 细胞：自然杀伤细胞。

图 6 | 单核 / 巨噬细胞 (破骨细胞前体细胞) 与各细胞亚群间的细胞互作分析

Figure 6 | Analysis of cellular interaction between monocytes/macrophages (osteoclast precursor cells) and various cell subsets

号通路的作用，但是越来越多的证据表明 MIF 通路参与了各种骨病的发展。靶向 MIF 抑制破骨细胞生成，减轻卵巢切除引起的骨丢失，另外 MIF-CXCR4 轴是诱导破骨细胞前体归巢到外周溶骨性病变的关键途径[43]。因此，单核细胞 / 巨噬细胞与骨髓瘤细胞及免疫细胞间的 MIF 通路配体 – 受体互作可能是多发性骨髓瘤骨病发生的重要因素。

综上所述，该研究首次基于外泌体测序数据和单细胞 RNA 测序数据，初步探索了多发性骨髓瘤骨病相关外周血外泌体环状 RNA 的骨髓微环境来源细胞，并在单细胞层面刻画了破骨细胞前体细胞与骨髓微环境的通讯图谱，MIF 通路可能是多发性骨髓瘤骨病潜在的诊治靶点。在接下来的研究中，将扩大样本量进行验证，并在体内、外实验中进一步明确筛选出的外泌体环状 RNA 的来源细胞及其在多发性骨髓瘤骨病中的作用机制。

作者贡献：于漫亚负责实验实施、论文撰写、实验数据分析处理、指标检测，崔兴负责数据和文章的校对、实验设计。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名 – 非商业性使用 – 相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》；文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重；文章经小同行外审专家双盲审稿，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] MALARD F, NERI P, BAHLIS NJ, et al. Multiple myeloma. Nat Rev Dis Primers. 2024;10(1):45.

[2] MUKKAMALLA SKR, MALIPEDDI D. Myeloma Bone Disease: A Comprehensive Review. Int J Mol Sci. 2021;22(12):6208.

[3] YU D, LI Y, WANG M, et al. Exosomes as a new frontier of cancer liquid biopsy. Mol Cancer. 2022;21(1):56.

[4] BERNSTEIN ZS, KIM EB, RAJE N. Bone Disease in Multiple Myeloma: Biologic and Clinical Implications. Cells. 2022;11(15): 2308.

[5] MENU E, VANDERKERKEN K. Exosomes in multiple myeloma: from bench to bedside. Blood. 2022;140(23):2429-2442.

[6] LIU R, ZHONG Y, CHEN R, et al. m6A reader hnRNPA2B1 drives multiple myeloma osteolytic bone disease. Theranostics. 2022; 12(18):7760-7774.

[7] LI B, XU H, HAN H, et al. Exosome-mediated transfer of lncRUNX2-AS1 from multiple myeloma cells to MSCs contributes to osteogenesis. Oncogene. 2018;37(41): 5508-5519.

[8] UNTI MJ, JAFFREY SR. Highly efficient cellular expression of circular mRNA enables prolonged protein expression. Cell Chem Biol. 2024; 31(1):163-176.e5.

[9] ZHANG F, JIANG J, QIAN H, et al. Exosomal circRNA: emerging insights into cancer progression and clinical application potential. J Hematol Oncol. 2023;16(1):67.

[10] ARAN D, LOONEY AP, LIU L, et al. Reference-based analysis of lung single-cell sequencing reveals a transitional profibrotic macrophage. Nat Immunol. 2019;20(2):163-172.

[11] KIKUCHI H, AMOFA E, MCENERY M, et al. Inhibition of PI3K Class IA Kinases Using GDC-0941 Overcomes Cytoprotection of Multiple Myeloma Cells in the Osteoclastic Bone Marrow Microenvironment Enhancing the Efficacy of Current Clinical Therapeutics. Cancers (Basel). 2023;15(2):462.

[12] LI H, ZHANG Y, MOU X, et al. Interference with PLA2G16 promotes cell cycle arrest and apoptosis and inhibits the reprogramming of glucose metabolism in multiple myeloma cells by modulating the Hippo/YAP signaling pathway. Anticancer Drugs. 2024;35(10):902-911.

[13] TSUBAKI M, KATO C, MANNO M, et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) enhances a receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) expression in mouse bone marrow stromal cells and osteoblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways. Mol Cell Biochem. 2007;304(1-2):53-60.

[14] PAN JX, XIONG L, ZHAO K, et al. YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β-catenin signaling. Bone Res. 2018;6:18.

[15] YANG W, HAN W, QIN A, et al. The emerging role of Hippo signaling pathway in regulating osteoclast formation. J Cell Physiol. 2018;233(6): 4606-4617.

[16] MIAOMIAO S, XIAOQIAN W, YUWEI S, et al. Cancer-associated fibroblast-derived exosome microRNA-21 promotes angiogenesis in multiple myeloma. Sci Rep. 2023;13(1):9671.

[17] MIZUHARA K, SHIMURA Y, TSUKAMOTO T, et al. Tumour-derived exosomes promote the induction of monocytic myeloid-derived suppressor cells from peripheral blood mononuclear cells by delivering miR-106a-5p and miR-146a-5p in multiple myeloma. Br J Haematol. 2023;203(3):426-438.

[18] WANG Z, HE J, BACH DH, et al. Induction of m6A methylation in adipocyte exosomal LncRNAs mediates myeloma drug resistance. J Exp Clin Cancer Res. 2022;41(1):4.

[19] YU M, JI L, LI S, et al. Exosomal circ-CACNG2 promotes cardiomyocyte apoptosis in multiple myeloma via modulating miR-197-3p/caspase3 axis. Exp Cell Res. 2022;417(2):113229.

[20] ALIMOHAMMADI M, RAHIMZADEH P, KHORRAMI R, et al. A comprehensive review of the PTEN/PI3K/Akt axis in multiple myeloma: From molecular interactions to potential therapeutic targets. Pathol Res Pract. 2024;260:155401.

[21] HEINEMANN L, MÖLLERS KM, AHMED HMM, et al. Inhibiting PI3K-AKT-mTOR Signaling in Multiple Myeloma-Associated Mesenchymal Stem Cells Impedes the Proliferation of Multiple Myeloma Cells. Front Oncol. 2022;12:874325.

[22] KYRIAZOGLOU A, NTANASIS-STATHOPOULOS I, TERPOS E, et al. Emerging Insights Into the Role of the Hippo Pathway in Multiple Myeloma and Associated Bone Disease. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2020;20(2):57-62.
[23] YANG J, ZHANG X, WANG J, et al. Anti beta2-microglobulin monoclonal antibodies induce apoptosis in myeloma cells by recruiting MHC class I to and excluding growth and survival cytokine receptors from lipid rafts. Blood. 2007;110(8):3028-3035.
[24] MENG B, WU D, CHENG Y, et al. Interleukin-20 differentially regulates bone mesenchymal stem cell activities in RANKL-induced osteoclastogenesis through the OPG/RANKL/RANK axis and the NF-κB, MAPK and AKT signalling pathways. Scand J Immunol. 2020;91(5): e12874.
[25] ZHANG Z, ZHANG X, ZHAO D, et al. TGF-β1 promotes the osteoinduction of human osteoblasts via the PI3K/AKT/mTOR/S6K1 signalling pathway. Mol Med Rep. 2019;19(5):3505-3518.
[26] MARTIN SK, GAN ZY, FITTER S, et al. The effect of the PI3K inhibitor BKM120 on tumour growth and osteolytic bone disease in multiple myeloma. Leuk Res. 2015;39(3):380-387.
[27] SEO E, BASU-ROY U, GUNARATNE PH, et al. SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. Cell Rep. 2013;3(6):2075-2087.
[28] MATSUMOTO Y, LA ROSE J, KENT OA, et al. Reciprocal stabilization of ABL and TAZ regulates osteoblastogenesis through transcription factor RUNX2. J Clin Invest. 2016;126(12):4482-4496.
[29] PARK H, NOH AL, KANG JH, et al. Peroxiredoxin II negatively regulates lipopolysaccharide-induced osteoclast formation and bone loss via JNK and STAT3. Antioxid Redox Signal. 2015;22(1):63-77.
[30] LU J, YE C, HUANG Y, et al. Corilagin suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and inhibits oestrogen deficiency-induced bone loss via the NF-κB and PI3K/AKT signalling pathways. J Cell Mol Med. 2020;24(18):10444-10457.
[31] HUANG F, WONG P, LI J, et al. Osteoimmunology: The correlation between osteoclasts and the Th17/Treg balance in osteoporosis. J Cell Mol Med. 2022;26(13):3591-3597.
[32] WU LZ, DUAN DM, LIU YF, et al. Nicotine favors osteoclastogenesis in human periodontal ligament cells co-cultured with CD4(+) T cells by upregulating IL-1β. Int J Mol Med. 2013;31(4):938-942.
[33] NAGAI S, KUREBAYASHI Y, KOYASU S. Role of PI3K/Akt and mTOR complexes in Th17 cell differentiation. Ann N Y Acad Sci. 2013;1280: 30-34.
[34] FU M, HU Y, LAN T, et al. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):376.
[35] SÖDERSTRÖM K, STEIN E, COLMENERO P, et al. Natural killer cells trigger osteoclastogenesis and bone destruction in arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(29):13028-13033.
[36] FENG P, LUO L, YANG Q, et al. Hippo kinases Mst1 and Mst2 maintain NK cell homeostasis by orchestrating metabolic state and transcriptional activity. Cell Death Dis. 2024;15(6):430.
[37] ALI AK, NANDAGOPAL N, LEE SH. IL-15-PI3K-AKT-mTOR: A Critical Pathway in the Life Journey of Natural Killer Cells. Front Immunol. 2015;6:355.
[38] CHEN Y, WANG H, NI Q, et al. B-Cell-Derived TGF-β1 Inhibits Osteogenesis and Contributes to Bone Loss in Periodontitis. J Dent Res. 2023;102(7):767-776.
[39] FISCHER V, HAFFNER-LUNTZER M. Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis. Semin Cell Dev Biol. 2022;123:14-21.
[40] GRČEVIĆ D, SANJAY A, LORENZO J. Interactions of B-lymphocytes and bone cells in health and disease. Bone. 2023;168:116296.
[41] HODSON DJ, TURNER M. The role of PI3K signalling in the B cell response to antigen. Adv Exp Med Biol. 2009;633:43-53.
[42] ZHENG L, GAO J, JIN K, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitor 4-IPP suppresses osteoclast formation and promotes osteoblast differentiation through the inhibition of the NF-κB signaling pathway. FASEB J. 2019;33(6):7667-7683.
[43] HE J, ZHENG L, LI X, et al. Obacunone targets macrophage migration inhibitory factor (MIF) to impede osteoclastogenesis and alleviate ovariectomy-induced bone loss. J Adv Res. 2023;53:235-248.

(责任编辑：MZH，ZN，QY，ZM)