

肺岩宁方调控外泌体 miR-328 及 STAT3/c-Fos/NFATc1 通路 抑制肺癌细胞侵袭转移的机制

姬俊青, 张程程, 徐振晔, 王中奇*

(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

[摘要] 目的:探究肺岩宁方对外泌体 miR-328 调节肺癌侵袭转移的分子作用机制。方法:以 95C 和 95D 肺癌低、高转移株和分离的外泌体为模型进行实验。首先,将 95C 和 95D 肺癌低、高转移株的细胞进行体外培养,收集其上清液分离外泌体,分别用透射电子显微镜(TEM)、纳米颗粒跟踪分析(NTA)和蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定外泌体;并进行外泌体细胞摄取实验证实 95C 和 95D 细胞均能摄取肺癌患者血浆中外泌体。应用细胞增殖与活性检测(CCK-8)实验检测肺岩宁方(0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 g·L⁻¹)对 95C 和 95D 细胞增殖的抑制作用,根据结果分组进行后续实验,即空白组和肺岩宁加药组(1、2 g·L⁻¹)3 组;用划痕实验和 Transwell 实验检测肺岩宁方抑制 95C 和 95D 细胞体外迁移、侵袭能力;同时进行 Western blot 观察和检测 Janus 激酶 2(JAK2)、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)、细胞原癌基因 Fos(c-Fos)、活化 T 细胞核因子 1(NFATc1)蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 miR-328 mRNA 表达水平。结果:肺癌血浆外泌体可以增强 95C、95D 的迁移和侵袭能力及 miR-328 的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$);肺岩宁方以剂量依赖性的方式抑制 95C 和 95D 肺癌细胞的增殖能力及侵袭转移能力($P<0.01$),其中对 95C 抑制效果更显著,并通过肺岩宁方下调外泌体 miR-328,抑制 JAK2、STAT3 及下游靶基因 c-Fos、NFATc1 的蛋白表达水平($P<0.01$)。结论:肺岩宁方可能通过下调外泌体 miR-328 表达抑制肺癌细胞转移,且其机制可能与 STAT3/c-Fos/NFATc1 信号通路有关,应进一步研究其机制并用以临床治疗,为肺癌的治疗提供中药治疗思路与治疗方向。

[关键词] 肺岩宁方; 外泌体; miR-328; 肺癌; 侵袭转移

[中图分类号] R256;R285;R562 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)17-0144-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251223

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20250409.1751.003>

[网络出版日期] 2025-04-10 11:12:34



Mechanism of Feiyaning Formula in Suppressing Invasion and Metastasis of Lung Cancer Cells via Modulating Exosomal miR-328 and STAT3/c-Fos/NFATc1 Pathway

JI Junqing, ZHANG Chengcheng, XU Zhenye, WANG Zhongqi*

(Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the molecular mechanism by which Feiyaning formula(FYN) regulated exosomal miR-328 to suppress the invasion and metastasis of lung cancer. **Methods:** *In vitro* models using low-metastatic 95C and high-metastatic 95D lung cancer cell lines, along with isolated exosomes, were established. Initially, 95C and 95D cells were cultured, and exosomes were isolated from their supernatants. The exosomes were identified using transmission electron microscopy (TEM), nanoparticle tracking analysis (NTA), and Western blot. Exosome uptake assays confirmed that both 95C and 95D cells could internalize exosomes derived from lung cancer patients' plasma. Cell counting kit-8 (CCK-8) assays were performed to assess the inhibitory effects of FYN (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 g·L⁻¹) on 95C and 95D cell proliferation. Subsequent experiments

[收稿日期] 2025-02-26

[基金项目] “重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09304001);上海申康医院发展中心市级医院新兴前沿技术联合攻关项目(SHDC12020123);上海市科学技术委员会上海市中医肿瘤临床医学研究中心项目(21MC1930500);上海市卫生健康委卫生健康青年人才项目(2022YQ028)

[第一作者] 姬俊青,在读硕士,从事中医药抗肿瘤侵袭转移研究,E-mail:jjq1347038621@163.com

[通信作者] *王中奇,博士,博士生导师,主任医师,从事中医药抗肿瘤侵袭转移临床与研究工作,E-mail:aledx@sina.com

were divided into three groups of control, low-dose FYN ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), and high-dose FYN ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) groups. Wound-healing and Transwell assays were used to evaluate the inhibitory effects of FYN on the migration and invasion of 95C and 95D cells. Western blot was employed to detect the protein expression levels of Janus kinase 2 (JAK2), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), cellular oncogene Fos (c-Fos), and nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1). The mRNA expression of miR-328 was measured by Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Results:** Lung cancer plasma-derived exosomes (EXO) enhanced the migration, invasion, and miR-328 expression levels in 95C and 95D cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). FYN inhibited the proliferation, invasion, and metastasis of 95C and 95D cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$), with more pronounced effects on 95C cells. Additionally, FYN downregulated exosomal miR-328 expression and suppressed the protein levels of JAK2, STAT3, and its downstream target genes c-Fos and NFATc1 ($P < 0.01$). **Conclusion:** FYN may inhibit lung cancer metastasis by downregulating exosomal miR-328 expression, potentially through the STAT3/c-Fos/NFATc1 signaling pathway. Further studies are warranted to elucidate its detailed mechanisms and facilitate clinical application, providing insights into traditional Chinese medicine-based strategies for lung cancer treatment.

[Keywords] Feiyaning formula; exosome; miR-328; lung cancer; invasion and metastasis

肺癌是全球范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,其侵袭和转移是导致患者预后不良的主要原因。近年来随着外泌体作为细胞间信使载体在肿瘤微环境中调节机制的研究越来越多,他们通过携带并转运功能性蛋白和RNA分子[如微小RNA(miRNA)],对肿瘤的生长、侵袭、转移及免疫等进行调节作用;作为外泌体的重要功能载体miRNA,能够靶向调控相关基因的表达,影响多种细胞信号转导途径,在肿瘤进展中也起到重要作用^[1-4]。既往的研究已发现miR-328可以调控多种恶性肿瘤,但在肺癌中的分子机制尚有待研究^[5]。另外,有报道表明,Janus激酶2/信号转导和转录激活因子3(JAK2/STAT3)信号通路和肺癌的发生发展紧密相关^[6]。STAT3位于细胞原癌基因Fos(c-Fos)的上游,可以通过直接或间接靶向调控c-Fos的表达及功能,从而影响更下游的基因和细胞行为。STAT3的持续激活则增强了下游靶基因c-Fos及活化T细胞核因子1(NFATc1)的表达,增强了肿瘤细胞的侵袭及转移。已证实,STAT3/c-Fos/NFATc1在肺癌的发生发展中具有重要作用,但其与外泌体miRNA的相互作用机制尚未可知^[6]。

肺岩宁方是上海市名中医徐振晔教授融合《黄帝内经》“正气存内,邪不可干”治则、张仲景《伤寒杂病论》“扶正祛邪”思想,自拟的以“益气养阴,解毒散结”为基本治则的抗癌中药复方,近年来已被证明^[7-12]可通过调控多种信号通路(如)抑制肺癌细胞的增殖和转移,但其成分复杂,作用途径广泛,因此其作用机制仍需继续探索。此外,课题组此前已证实外泌体HOTAIR可以通过转化生长因子- β /甲状旁腺激素相关蛋白/核转录因子- κ B受体活化因子配体(TGF- β /PTHrP/RANKL)通路促进肺癌骨转移^[13]。

已知长非编码RNA(LncRNA)和miRNA可以相互作用,调控肿瘤的发生发展。故在此基础上,应用miRcode在线网站寻找外泌体HOTAIR的潜在miRNA靶点,预测外泌体HOTAIR可能识别miR-328,并采用荧光素酶报告基因验证了HOTAIR与miR-328的直接关系,为进一步研究外泌体miR-328调控肺癌骨转移新途径提供了一定理论依据^[14]。

基于此,本研究旨在通过建立肺癌低转移株(95C)和高转移株(95D)相关模型,结合细胞生物学实验,初步探讨肺岩宁方通过调控外泌体miR-328及其相关信号通路(如JAK2、STAT3、c-Fos和NFATc1)抑制肺癌侵袭转移的分子机制,为肺癌的中药治疗提供新的理论依据和潜在靶点。这一研究不仅有助于深入理解肺癌侵袭转移的分子机制,也为开发基于外泌体和miRNA的肺癌治疗策略提供了新的思路。

1 材料

1.1 细胞系 人正常肺上皮细胞BEAS-2b(目录号SCSP-5067),购自中国科学院上海细胞库;肺癌低转移细胞株95C、肺癌高转移细胞株95D(目录号YCL-0437、YCL-0456),均购自亿泽丰(上海)生物科技有限公司,传至第8~10代。

1.2 试剂 DMEM培养基、RPMI-1640培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)(上海源培生物科技股份有限公司,批号分别为L110KJ、L210KJ、S310KJ、B320KJ);胎牛血清(美国Biosciences公司,批号C04001-500);标准型基底膜基质胶、Hoechst33342抗体、PKH26(美国MCE公司,批号分别为HY-K6001、HY-15559、HY-D1451);JAK2抗体、STAT3抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体[艾比玛特生物医药(上海)有限公司,批号分别为T55016S、T40104S,

P30002S]; c-Fos 抗体、NFATc1 抗体、Calnexin 抗体、二抗鼠抗、二抗兔抗(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号分别为 66590-1-1g、66963-1-1g、10427-2-AP、SA00001-1、SA00001-2); CD9 抗体、肿瘤易感性基因 101(TSG101) 抗体(美国 DLM 公司, 批号分别为 DL210002、DL210005); 结晶紫染色液、细胞增殖与活性检测(CCK-8) 试剂盒、放射免疫沉淀法(RIPA) (强) 裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)(上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 C0121、C0039、P0013B、ST506-2); 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) 凝胶制备套装、Omni-Easy™ 蛋白定量法(BCA) 蛋白定量试剂盒、Omni-Easy™ 速溶蛋白加载缓冲液、蛋白 Marker、脱脂奶粉、Omni-ECL™ 超敏化学发光检测试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号分别为 PG112、ZJ102、LT101、WJ101L、PS112L、SQ201); 超纯 RNA 提取试剂盒(康为世纪生物科技股份有限公司, 批号 CW0581); 反转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司, 批号 RR036a); SYBRGreen 聚合酶链式反应(PCR) 混合液(武汉赛维尔生物科技股份有限公司, 批号 G3326-15); miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒、miRNA 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 试剂盒(生工生物股份有限公司, 批号分别为 B532453-0020、B532461-0002)。

1.3 仪器 PMX-120 型纳米颗粒跟踪分析仪(德国 Particle Metrix 公司); HT7700 型透射电子显微镜(TEM, 日本 HITACHI 公司); 164-5050 型基础电泳仪、1658001 型小型垂直电泳槽、170-3930 型小型转印槽、CFX96 Touch 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); Centrifuge 5424 R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司); UltraVIEW VoX & IX 81 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Perkin Elmer & Olympus 公司); Tanon 蛋白扫描仪(中国天能电池集团股份有限公司); FORMA 371-150i 型细胞培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 95C、95D 细胞及 BEAS-2b 细胞培养 95C、95D 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗、89% 基础培养基的 RPMI-1640 培养基培养, BEAS-2b 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 双抗、89% 基础培养基的 DMEM 培养基培养, 细胞密度至 90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代(传代比例为 1:5~1:3)。

2.2 药物配制 肺岩宁中药饮片来源于上海中医药大学附属龙华医院中药房, 所用量符合 2020 年版《中华人民共和国药典》, 由黄芪 40 g(批号 91018)、

黄精 30 g(批号 91067)、灵芝 30 g(批号 95065)、山茱萸 15 g(92067)、淫羊藿 15 g(批号 93058)、白术 9 g(91025)、山慈菇 15 g(批号 91127)、石见穿 30 g(批号 93047)、重楼 15 g(91152)、蜂房 9 g(批号 96040)、干蟾皮 9 g(批号 96018) 组成。该组方由上海中医药大学附属龙华医院徐振晔主任医师鉴定, 由龙华医院药剂科监控质量。饮片鉴定后, 将其放于砂锅中以高出药材 3~5 cm 的水量浸泡 30 min, 武火加热煮沸后, 改用文火煎煮 1.5 h, 共煎 2 次, 每次所得药量为 200~300 mL, 用纱布过滤 2 次所得药液, 将滤过的药液继续水煎浓缩至生药含药量 $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 分装于离心管中备用, 使用时用无菌 PBS 稀释成 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液, 再经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后于 -20°C 贮存备用。

2.3 血液样本采集及血浆分离 晚期肺癌患者 8~10 mL 空腹外周静脉血置于乙二胺四乙酸(EDTA) 抗凝采血管内(经上海中医药大学附属龙华医院医学伦理委员会批准, 伦理编号 2022LCSY013), 采血过程中避免溶血。采集血液 1 h 后离心处理 ($3\,000 \times g$, 室温, 10 min), 取上清液于无菌无酶离心管中 $12\,000 \times g$, 4°C , 离心 10 min 后取上层血浆于无菌无酶冻存管中, 标记后 -80°C 冰箱内保存备用。

2.4 外泌体的提取及鉴定

2.4.1 外泌体的提取(超速离心法) 细胞上清外泌体提取: 收集 50 mL 无外泌体血清培养基培养后的细胞上清, $300 \times g$, 4°C 离心 10 min 去死细胞; 上清 $3\,000 \times g$, 4°C 离心 30 min 去细胞碎片; 小心移至新管, $10\,000 \times g$, 4°C 离心 30 min 去杂蛋白; 过滤上清, 收集过滤液; 新管中, $120\,000 \times g$, 4°C 离心 70 min 去上清, 预冷 $1 \times \text{PBS } 200 \mu\text{L}$ 重悬, 得外泌体, -80°C 保存。

血浆外泌体提取: 取 2 mL 肺癌患者血浆, $3\,000 \times g$, 4°C 离心 30 min 去除颗粒物, 移上清至新管, $10\,000 \times g$, 4°C 离心 30 min 去除沉淀, 过滤上清, 收集过滤液, 超高速转子 $120\,000 \times g$, 4°C 离心 70 min, 去上清, 沉淀用 PBS 重悬, 再次 $120\,000 \times g$, 4°C 离心 70 min, 弃上清, 用预冷 $1 \times \text{PBS } 200 \mu\text{L}$ 重悬, 得到外泌体, 保存于 -80°C 。

2.4.2 外泌体的鉴定 纳米颗粒跟踪分析(NTA) 鉴定: 用对照品(100 nm PS beads, 聚苯乙烯微球) 对仪器进行校准, 然后将 2.4.1 项中得到的外泌体稀释一定倍数, 从而通过 NTA 检测外泌体样本的粒径分布和颗粒浓度。

TEM 鉴定: 将步骤 2.4.1 项得到的外泌体按比

例稀释后,用移液器吸取悬液 10 μL 滴在固定在桌面的 Parafilm 封口膜上,放置带孔载膜铜网正面朝下,使其自然吸附悬液滴 10~15 min。然后用滤纸吸去多余液体稍微晾干,吸取 2% 磷钨酸染色液 10 μL 滴于封口膜上,载膜铜网正面朝向染液染色 5~10 min,再用滤纸吸去多余液体,在白炽灯下发白后,用 TEM 观察并拍摄外泌体样品的形态和结构。

蛋白免疫印迹法(Western blot)鉴定:取适量外泌体样本加入外泌体裂解液裂解后,加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液于 100 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴上放置 10 min 变性,制备凝胶,上样后进行电泳,转膜[蛋白转印至经甲醇活化的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上],室温 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 相应一抗(1:10 000)孵育过夜,室温相应二抗(1:10 000)孵育 1 h,显影曝光,Image J 灰度值分析条带吸光度 A 。

2.5 血浆外泌体与 95C、95D 细胞共孵育(外泌体摄取实验) 向制备好的血浆外泌体中加入 PKH26 染色工作液,充分混匀后静置孵育 10 min,常温避光操作;120 000 $\times g$ 离心 90 min 除去游离的工作液;将标记好的外泌体与 95C、95D 细胞共孵育 12 h;染色固定好后使用激光共聚焦显微镜拍照观察标记的外泌体是否被摄取,以供后续实验参考外泌体共培养浓度及密度。

2.6 CCK-8 实验检测 95C、95D 细胞增殖能力 将对数生长期 95C 和 95D 细胞按 3×10^3 个/孔密度接种于 96 孔细胞培养板中(100 μL /孔),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养过夜后让细胞贴壁,空白组添加 RPMI1640 培养基 100 μL ,肺岩宁方组分培养孔分别加入肺岩宁方的稀释液,使最终浓度为 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,各组均做 4 个复孔;分别在培养 24、48、72 h 后换入含 10% CCK-8 的工作液后放回培养箱再培养 2 h,酶标仪在 450 nm 波长下测定各个孔的 A ,计算半数抑制浓度(IC_{50})。

2.7 划痕实验检测 95C、95D 细胞迁移能力 在 6 孔板背面绘制平行线,接种约 2×10^5 个细胞,待融合后用移液器刮擦形成划痕,洗涤 3 次以去除脱落细胞。空白组加无血清培养基,肺岩宁组加 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 肺岩宁培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育。0、12、24 h 后观察划痕宽度,计算细胞迁移率(%)。

2.8 Transwell 检测肺癌细胞迁移、侵袭能力 Transwell 迁移实验:95C 和 95D 对数生长期细胞分别制作 5×10^5 个细胞/mL 浓度的无血清细胞悬液,各加入 Transwell 上室,分为:空白组,肺岩宁方组

(1.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)。Transwell 下室各加入含 10% 胎牛血清培养基 500 μL ,细胞悬液(或添加肺岩宁)200 μL 。培养 24 h 后,4% 多聚甲醛固定 10~15 min,用结晶紫染色 10 min,显微镜观察记录穿膜的细胞数。

Transwell 侵袭实验:首先,将 Transwell 小室底部的膜在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用 Matrigel 基质胶进行预冷包被,待基质胶凝固后,其余实验步骤与细胞迁移实验保持一致。

2.9 Western blot 检测 JAK2、STAT3、c-Fos、NFATC1 蛋白表达 继续 2.7 的实验分组。PBS 洗 3 次,加入 RIPA 细胞裂解液冰上裂解 30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min(离心半径 12 cm),收集上清作为提取的蛋白,BCA 法测量其浓度测定上样量。5 $\times$ Loading Buffer 配平后,100 $^{\circ}\text{C}$ 煮 15~20 min。准备凝胶上样,10~20 μg 样品十二烷基硫酸钠(SDS)-PAGE 蛋白电泳。蛋白转印至经甲醇活化的 PVDF 膜上,室温 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 相应一抗(1:10 000)孵育过夜,室温相应二抗(1:10 000)孵育 1 h,显影曝光,Image J 灰度值分析条带灰度值。

2.10 Real-time PCR 检测细胞及外泌体中 miR-328 mRNA 表达情况 实验分组同 2.7 项,收集各组细胞样本,PBS 清洗 3 次,按照试剂盒说明书提取 RNA,根据逆转录试剂盒按照 20 μL 体系置于 PCR 管,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 无限循环制成 cDNA,随后按照 10 μL 体系制成 PCR 反应液,混匀后预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,1 个循环;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,变性-退火-延伸 40 个循环,检测其 miR-328 基因表达水平[引物由生工生物(上海)股份有限公司合成,引物列表见表 1],采用 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 法处理实验数据。收集各组外泌体样本,其余步骤同前,检测外泌体中 miR-328 基因表达水平。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

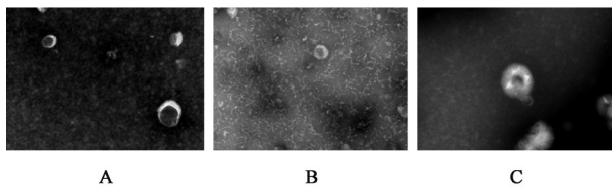
引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 CATGTACGTTGCTATCCAGGC	21
	下游 CTCCTTAATGTCACGCACGAT	
miR-328-3p	上游 CAACTATCTGGCCCTCTCTGCC	65
	下游 ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG	

2.11 统计学处理 实验数据用 SPSS 26.0、GraphPad Prism 9.0、Image J 等软件统计分析和绘图,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对成对比较,且数据符合正态分布

及方差齐性的条件下选用 *t* 检验, 否则选用非参数检验; 对于多组之间的多重比较, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。显著性水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

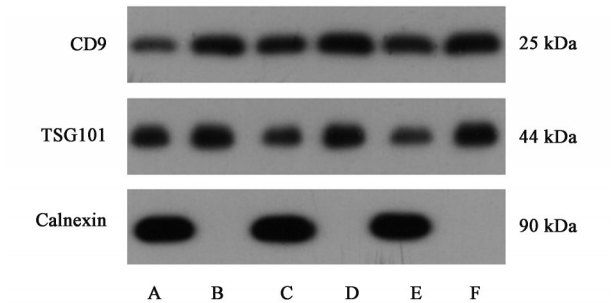
3.1 外泌体的提取及鉴定 根据文献[15]准备好使用无外泌体血清培养后的细胞上清(95C、95D)及肺癌骨转移患者血浆后, 使用超速离心法分离外泌体并进行鉴定。TEM 观察外泌体形态, 见图 1, 镜下可见外泌体外观呈圆形或椭圆形的双层膜性囊泡样结构, 如典型杯托样结构。通过 NTA 进行定量分析, NTA 观察外泌体粒径分布及浓度见增强出版附加材料, 得出外泌体的浓度及粒径大小, 见表 2。Western blot 结果显示外泌体表面特异性物质 CD9、TSG101 在 3 种外泌体样本中呈阳性表达, 以及外泌体阴性蛋白 Calnexin 呈阴性表达, 见图 2。以上结果均符合外泌体蛋白特征。



注: A.95C-外泌体组; B.95D-外泌体组; C.Plasma-外泌体组
图1 TEM 观察外泌体形态 (TEM, ×50 000)
Fig. 1 TEM analysis of exosome morphology (TEM, ×50 000)

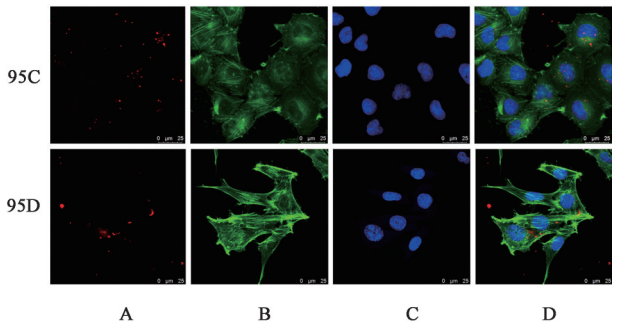
表2 NTA 检测外泌体粒径与浓度分析

样品	众数粒径/nm	浓度/Particles·mL ⁻¹
95C	113	4.70×10 ¹⁰
95D	118	6.16×10 ¹⁰
Plasma	136	7.25×10 ¹¹



注: A.95C 组; B.95C-外泌体组; C.95D 组; D.95D-外泌体组; E.Plasma 组; F.Plasma-外泌体组
图2 Western blot 鉴定外泌体电泳
Fig. 2 Western blot analysis of exosome-specific markers

3.2 95C、95D 细胞对肺癌患者血浆外泌体的摄入情况 荧光显微镜结果显示, 95C 和 95D 细胞均能有效地摄取标记的血浆外泌体, 荧光信号主要集中在细胞质区域, 见图 3, 这表明肺癌血浆外泌体可以通过内吞作用进入 95C、95D 细胞。

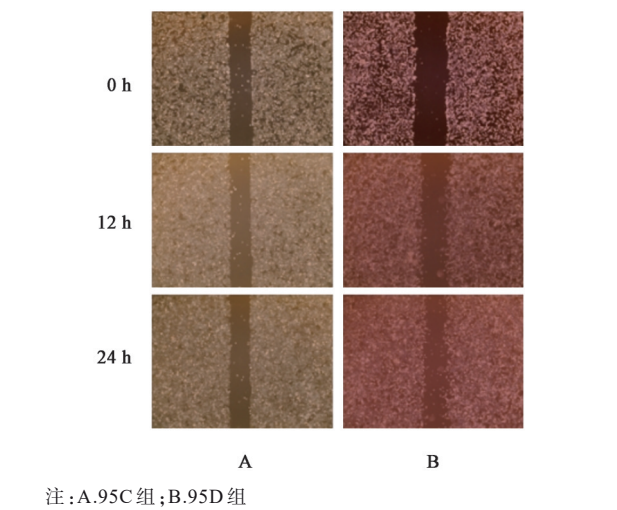


注: A.PKH26 标记的外泌体; B.488-phalloidin 标记的细胞骨架; C.Hoechst 33342 标记的细胞核; D.Merge 图
图3 95C、95D 细胞对肺癌患者血浆外泌体的摄入情况 (×400)
Fig. 3 Uptake of plasma exosomes by 95C and 95D cells in lung cancer patients (×400)

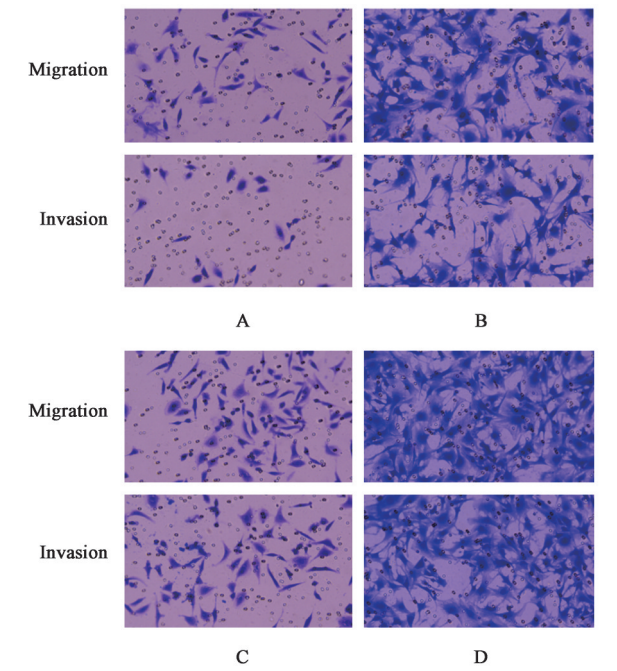
3.3 外泌体对 95C、95D 细胞迁移和侵袭能力的影响 为观察外泌体对 95C、95D 细胞的迁移和侵袭作用的影响, 通过划痕实验、Transwell 实验分别比较 95C、95D 细胞的迁移和侵袭情况, 见图 4、图 5、表 3、表 4。结果显示 24 h 较 12 h 时 95C、95D 细胞迁移和侵袭能力均有明显增强 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且 95D 较 95C 细胞迁移和侵袭能力显著升高 ($P<0.01$); 95C、95D 细胞摄取血浆外泌体后, Transwell 实验显示 95C、95D 细胞迁移和侵袭能力均有增高 ($P<0.01$), 且 95D 细胞迁移和侵袭能力均高于 95C 细胞 ($P<0.01$), 这与上述相符, 表明肺癌血浆外泌体可以增强 95C、95D 细胞的迁移和侵袭能力。

3.4 外泌体对 95C、95D 细胞 miR-328 表达的影响 为明确外泌体对 95C、95D 细胞 miR-328 表达的影响, 首先对 BEAS-2b、95C、95D 细胞中 miR-328 的表达情况进行了比较, 结果显示, 与正常肺上皮细胞 BEAS-2b 组比较, 95C、95D 组细胞中 miR-328 表达显著升高 ($P<0.01$), 且 95D 组细胞中 miR-328 表达水平约为 95C 组的 2 倍。95C、95D 细胞分别摄取外泌体后, 95D 细胞中 miR-328 表达明显升高 ($P<0.05$), 且 95D 细胞中 miR-328 表达水平约为 95C 的 3 倍。综上所述, 肺癌血浆外泌体可以增加 95C、95D 细胞中 miR-328 的表达。见表 5。

3.5 肺岩宁方对 95C、95D 细胞增殖的影响 为筛选肺岩宁方对 95C、95D 细胞的安全剂量浓度, 检测了不同浓度不同时间对其细胞活力的影响, 见表 6,



注:A.95C组;B.95D组
图4 外泌体对95C、95D细胞12、24 h迁移能力的影响(划痕实验,×4)
Fig. 4 Effect of exosomes in migration ability of 95C and 95D cells at 12 h and 24 h (Wound healing assay, ×4)



注:A.95C组;B.95D组;C.95C+外泌体组;D.95D+外泌体组
图5 外泌体对95C、95D细胞迁移和侵袭能力的影响(Transwell,×200)
Fig. 5 Effect of exosomes on migration and invasion capabilities of 95C and 95D cells (Transwell, ×200)

结果显示,95C、95D细胞活力随着肺岩宁方剂量浓度的升高而逐渐降低($P<0.01$),且95C细胞系在24、48、72 h的 IC_{50} 分别是0.927、0.538、0.435 $g\cdot L^{-1}$;95D细胞系在24、48、72 h的 IC_{50} 分别是1.868、1.375、1.196 $g\cdot L^{-1}$ 。考虑实验时间统一性(与上述实验保持一致),因此肺岩宁方后续作用时间选择24 h,实验安全浓度选择0、1、2 $g\cdot L^{-1}$ 。

表3 外泌体对95C、95D迁移能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 3 Effect of exosomes in migration capability between 95C and 95D ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	时间/h	细胞迁移率/%
95C组	0~12	7.34±2.08
	0~24	13.44±3.99 ¹⁾
95D组	0~12	21.22±3.36 ³⁾
	0~24	40.84±2.47 ^{2,3)}

注:与12 h的95C组细胞比较¹⁾ $P<0.05$;与12 h的95D组细胞比较²⁾ $P<0.01$;与同时时间的95C组比较³⁾ $P<0.01$

表4 外泌体对95C、95D迁移、侵袭能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of exosomes on migration and invasion capabilities of 95C and 95D cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个
95C组	56.67±5.91	41.67±6.24
95D组	95.33±7.85 ¹⁾	87.67±3.68 ¹⁾
95C+外泌体组	89.00±2.94 ³⁾	70.00±4.55 ³⁾
95D+外泌体组	145.33±6.34 ^{2,3)}	136.00±5.35 ^{2,3)}

注:与95C组比较¹⁾ $P<0.01$;与95C+外泌体组比较²⁾ $P<0.01$;外泌体干预前后同组比较³⁾ $P<0.01$

表5 外泌体对95C、95D细胞miR-328表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of exosomes on miR-328 expression in 95C and 95D cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	miR-328相对表达量
BEAS-2b组	1.02±0.19
95C组	3.09±0.15 ¹⁾
95D组	5.84±0.13 ¹⁾
95C-外泌体组	1.00±0.02
95D-外泌体组	2.11±0.29 ²⁾
95C+外泌体组	1.07±0.40
95D+外泌体组	3.38±0.77 ³⁾

注:与BEAS-2b组比较¹⁾ $P<0.01$;与95C-外泌体组比较²⁾ $P<0.01$;与95C组比较³⁾ $P<0.05$

3.6 肺岩宁方对95C、95D迁移侵袭能力的影响

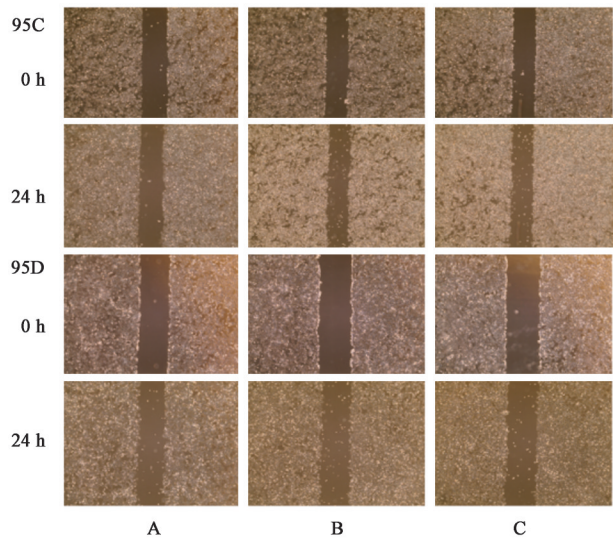
划痕实验及Transwell实验结果显示,与空白组比较,在肺岩宁方(1、2 $g\cdot L^{-1}$)干预24 h后95C、95D细胞的划痕长度显著缩短($P<0.01$),模型组在2 $g\cdot L^{-1}$ 的干预下抑制作用尤为明显,见图6、表7。与空白组比较,95C、95D细胞在肺岩宁方(1、2 $g\cdot L^{-1}$)干预24 h后穿膜细胞显著减少($P<0.01$),见图7、表8。95C、95D细胞分别摄取血浆外泌体后,Transwell实验的结果显示,与空白组比较,在肺岩宁方(1、2 $g\cdot L^{-1}$)干预24 h后95C、95D细胞的穿膜细胞显著

表6 肺岩宁方对95C、95D细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 6 Effect of Feiyanning formula(FYN) on proliferation of 95C and 95D cells ($\bar{x}\pm s, n=4$)			%		
细胞系	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞 24 h 存活率	细胞 48 h 存活率	细胞 72 h 存活率
95C	空白组		100.00±3.54	100.00±0.79	100.00±1.95
	肺岩宁方组	0.1	95.00±0.58 ¹⁾	94.78±1.03 ¹⁾	92.59±2.05 ¹⁾
		0.2	80.04±5.84 ¹⁾	78.29±1.99 ¹⁾	77.16±0.90 ¹⁾
		0.4	65.72±1.53 ¹⁾	54.69±2.48 ¹⁾	49.90±0.39 ¹⁾
		0.8	56.34±0.92 ¹⁾	39.34±2.38 ¹⁾	29.10±0.76 ¹⁾
		1.6	39.46±0.43 ¹⁾	21.47±0.88 ¹⁾	12.63±0.51 ¹⁾
		3.2	24.35±0.52 ¹⁾	7.11±0.05 ¹⁾	4.51±0.06 ¹⁾
		6.4	14.67±0.19 ¹⁾	6.84±0.05 ¹⁾	4.42±0.06 ¹⁾
95D	空白组		100.00±1.84	100.00±1.52	100.00±1.04
	肺岩宁方组	0.1	95.67±0.76 ¹⁾	94.43±1.86 ¹⁾	92.19±0.94 ¹⁾
		0.2	91.06±3.48 ¹⁾	90.91±0.3 ¹⁾	89.54±0.75 ¹⁾
		0.4	88.16±0.44 ¹⁾	79.37±3.83 ¹⁾	71.3±3.95 ¹⁾
		0.8	70.00±5.50 ¹⁾	68.6±3.56 ¹⁾	64.82±4.37 ¹⁾
		1.6	63.30±0.50 ¹⁾	44.01±4.23 ¹⁾	34.49±1.04 ¹⁾
		3.2	37.62±1.13 ¹⁾	24.82±1.03 ¹⁾	21.39±1.22 ¹⁾
		6.4	20.39±0.23 ¹⁾	9.77±0.04 ¹⁾	6.11±0.07 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$

减少($P<0.01$),但减少的程度较未添加外泌体的有所下降。上述结果显示,肺岩宁方可以显著抑制95C、95D细胞株的迁移侵袭能力($P<0.01$),外泌体的摄取会对其抑制能力有一定影响。



注:A.空白组;B.肺岩宁方(1 g·L⁻¹)组;C.肺岩宁方(2 g·L⁻¹)组(图7和图8同)

图6 肺岩宁方对95C、95D迁移能力的影响(划痕实验,×4)

Fig. 6 Effect of FYN on 95C and 95D migratory capacity (Wound healing assay, ×4)

3.7 肺岩宁方对95C、95D中转移相关通路中蛋白(JAK2、STAT3、c-Fos及NFATc1)表达的影响 为确

表7 肺岩宁方对95C、95D迁移能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect on 95C and 95D cell migration capabilities using wound healing assay ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞迁移率/%
95C	空白组		22.44±1.16
	肺岩宁方组	1	5.67±0.29 ¹⁾
		2	2.00±0.21 ¹⁾
95D	空白组		37.18±1.55
	肺岩宁方组	1	15.67±0.29 ¹⁾
		2	5.34±0.33 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表8-表10同)

认肺岩宁方对95C、95D中转移相关通路中蛋白(JAK2、STAT3、c-Fos及NFATc1)表达的影响,进行了Western blot实验,见图8、表9,结果显示,与空白组比较,95C、95D细胞在肺岩宁方(1、2 g·L⁻¹)干预24 h后,JAK2、STAT3蛋白表达水平显著下降($P<0.01$),其下游的基因c-Fos及NFATc1蛋白表达显著下降($P<0.01$),且质量浓度2 g·L⁻¹时下降更明显。以上结果表明肺岩宁方可能通过下调转移相关通路中的蛋白(JAK2、STAT3、c-Fos及NFATc1)表达从而抑制95C、95D细胞的侵袭转移能力。

3.8 肺岩宁方对95C、95D细胞中miR-328表达的影响 为明确肺岩宁方对95C、95D细胞中miR-328表达的影响,分别检测了肺岩宁方单独干预95C、

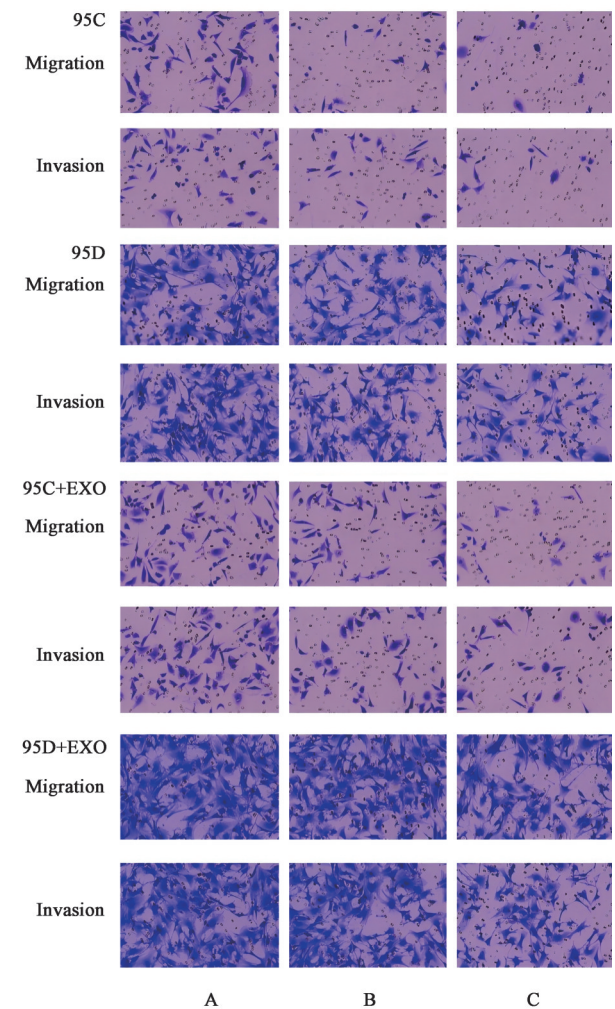


图7 肺岩宁方对95C、95D迁移和侵袭能力的影响 (Transwell, ×200)

Fig. 7 Effect of FYN on migration and invasion capabilities of 95C and 95D cells (Transwell, ×200)

表8 肺岩宁方对95C、95D迁移、侵袭能力的影响 (x̄±s, n=3)
Table 8 Effect of FYN on migration and invasion ability of 95C and 95D (x̄±s, n=3)

细胞系	组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	迁移细胞数	侵袭细胞数
95C	空白组		59.33±2.87	56.67±2.62
	肺岩宁方组	1	39.00±5.72 ⁽¹⁾	36.00±4.08 ⁽¹⁾
		2	17.67±0.47 ⁽¹⁾	15.67±2.36 ⁽¹⁾
95D	空白组		103.33±8.34	91.33±6.13
	肺岩宁方组	1	80.33±4.11 ⁽¹⁾	69.33±3.86 ⁽¹⁾
		2	56.33±2.05 ⁽¹⁾	48.33±2.05 ⁽¹⁾
95C+外泌体	空白组		91.67±6.13	85.33±2.05
	肺岩宁方组	1	54.67±2.36 ⁽¹⁾	44.33±6.34 ⁽¹⁾
		2	36.67±0.47 ⁽¹⁾	25.67±4.03 ⁽¹⁾
95D+外泌体	空白组		143.33±4.11	139.67±2.49
	肺岩宁方组	1	120.67±5.44 ⁽¹⁾	118.00±4.55 ⁽¹⁾
		2	74.00±3.74 ⁽¹⁾	69.33±1.25 ⁽¹⁾

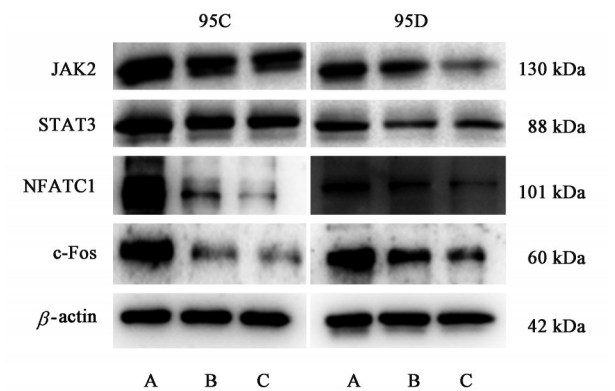


图8 95C、95D细胞JAK2、STAT3、c-Fos及NFATC1蛋白表达电泳
Fig. 8 Electrophoresis of JAK2, STAT3, c-Fos and NFATC1 proteins expression in 95C and 95D cells

95D细胞和95C、95D细胞分别摄取血浆外泌体后的miR-328表达水平,见表10,结果显示,与空白组比较,95C、95D细胞在肺岩宁方(1、2 g·L⁻¹)干预24 h后,95C、95D细胞中miR-328表达显著下降($P<0.01$),且95C细胞中miR-328表达水平下降更明显。95C、95D细胞分别摄取血浆外泌体后,与上述结果一致($P<0.01$),但其抑制效果有所减弱。综上所述,肺岩宁方可以抑制95C、95D细胞中miR-328表达水平,而肺癌患者血浆外泌体干预可以减弱其能力。

4 讨论

肺癌转移是患者预后不良的核心因素,涉及肿瘤微环境重塑、上皮-间质转化(EMT)和免疫逃逸等复杂机制。研究表明,外泌体miRNA在肺癌转移中起双重调控作用:肿瘤源性外泌体miRNA(如miR-210、miR-21)促进EMT和血管生成,加速转移前生态位形成;其动态表达谱可作为肺癌恶性进展的生物标志物,帮助区分良恶性肺结节^[2-4]。中医药在肺癌治疗中强调“扶正祛邪”,其多靶点特性与肿瘤转移的多机制调控相契合。然而,中医药如何通过调控外泌体miRNA网络抑制肺癌转移,仍是中西医结合研究的前沿领域,仍需深入解析中药复方对外泌体miRNA表达谱的影响及其与转移关键通路的交互作用,为开发基于“中药-外泌体”协同调控的抗转移策略提供理论依据。

徐振晔教授认为肺癌基本病机是精气两亏,痰毒瘀结。正虚为本,痰毒瘀为标。病位在肺,涉及脾肾^[16]。肺岩宁方是徐教授根据传统中药复方自拟的经验方,有“益气养精,清热解毒,化痰散结”的功效,主要用于治疗肺癌,已被龙华医院做成院内制剂应用至今,对于改善患者生活质量及提高患者生存期有着良好的作用。本处方以扶正祛邪为立

表 9 肺岩宁方对 95C、95D 细胞 JAK2、STAT3、c-Fos 及 NFATC1 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of FYN on expression of JAK2, STAT3, c-Fos and NFATC1 proteins in 95C and 95D cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	JAK2/ β -actin	STAT3/ β -actin	NFATC1/ β -actin	c-Fos/ β -actin
95C	空白组		1.01±0.01	1.05±0.03	1.08±0.01	1.06±0.01
	肺岩宁方组	1	0.74±0.04 ¹⁾	0.81±0.01 ¹⁾	0.50±0.05 ¹⁾	0.51±0.04 ¹⁾
		2	0.64±0.01 ¹⁾	0.76±0.04 ¹⁾	0.22±0.02 ¹⁾	0.23±0.01 ¹⁾
95D	空白组		1.03±0.02	1.04±0.01	1.04±0.01	1.03±0.02
	肺岩宁方组	1	0.78±0.07 ¹⁾	0.72±0.03 ¹⁾	0.72±0.03 ¹⁾	0.79±0.03 ¹⁾
		2	0.38±0.06 ¹⁾	0.64±0.02 ¹⁾	0.46±0.01 ¹⁾	0.44±0.01 ¹⁾

表 10 肺岩宁方干预对 miR-328 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 10 Effect of FYN intervention on miR-328 expression ($\bar{x}\pm s, n=3$)

细胞系	组别	质量浓度/g·L ⁻¹	miR-328 相对表达量
95C	空白组		1.00±0.09
	肺岩宁方组	1	0.37±0.02 ¹⁾
		2	0.13±0.01 ¹⁾
95D	空白组		1.01±0.13
	肺岩宁方组	1	0.42±0.04 ¹⁾
		2	0.32±0.05 ¹⁾
95C+外泌体	空白组		1.01±0.12
	肺岩宁方组	1	0.42±0.02 ¹⁾
		2	0.15±0.01 ¹⁾
95D+外泌体	空白组		1.00±0.05
	肺岩宁方组	1	0.46±0.05 ¹⁾
		2	0.24±0.01 ¹⁾

方要旨,党参、白术、茯苓配伍生黄芪共奏健脾益气、补肺固表之效;灵芝配伍黄精、淫羊藿形成滋补肾精组合;石见穿、石上柏协同蛇六谷、干蟾皮发挥清热解毒、化痰散结之功;佐以桃仁活血化瘀以畅气机^[16]。全方通过益气养精培补正气,配合解毒散结攻逐邪毒,体现攻补兼施的治疗思想。临床应用时遵循辨证施治原则灵活化裁。此外,已有实验研究表明肺岩宁方具有多靶点抗肿瘤生长转移的作用,对细胞周期及代谢相关基因、细胞信号转导分子、转录调控因子等均有一定的调控作用^[7-12,17-22],但其在影响外泌体 miRNA 方面的机制仍有待探索。

研究表明外泌体在肺癌侵袭转移过程中具有关键调控作用^[23]。其作用机制可能与外泌体介导的 miRNA、蛋白质等生物活性分子递送有关,这些分子通过重塑肿瘤细胞生物学特性进而影响肿瘤进展^[24]。本研究中,通过划痕实验、Transwell 实验证实 95D 肺癌细胞系的迁移和侵袭能力明显强于 95C 细胞系。采用超速离心法分别从 95C、95D 肺癌

细胞系及肺癌患者血浆样本中分离外泌体,并进行了外泌体鉴定,验证了外泌体的成功提取。通过荧光标记示踪实验证实,95C 和 95D 肺癌细胞能够有效内化源自肺癌患者血浆的外泌体,功能学实验(划痕、Transwell 实验)显示,血浆外泌体摄取可显著增强肺癌细胞的迁移和侵袭能力,证实了既往研究属实。

值得注意的是,miR-328 作为肿瘤相关 miRNA,在多种恶性肿瘤中具有重要调控功能^[5]。本研究发现,与正常肺上皮细胞 BEAS-2b 比较,95C 和 95D 肺癌细胞中 miR-328 表达显著上调,且高转移性 95D 细胞的 miR-328 表达水平约为低转移性 95C 细胞的 2 倍。进一步检测发现,外泌体中 miR-328 的表达与其一致,提示该 miRNA 可能通过外泌体介导的细胞间通信机制参与调控肺癌转移表型。机制研究(共培养)结果表明,外源性给予肺癌患者血浆来源的外泌体可显著提高受体细胞 miR-328 表达水平,其中高转移 95D 细胞的 miR-328 的增加尤为显著,基本达到低转移性 95C 细胞的 3 倍。这进一步证实了,外泌体 miR-328 在肺癌侵袭转移过程中具有重要生物学功能,而其作用机制仍有待探讨。

基于上述发现以及肺岩宁既往研究,本研究系统评估了肺岩宁方对肺癌细胞(95C、95D)的干预效应。通过 CCK-8 实验检测显示,肺岩宁方可浓度梯度依赖性地抑制 95C 和 95D 细胞的增殖能力,其中对低转移株 95C 的 IC₅₀ 显著低于高转移株 95D,该趋势与课题组前期药效学研究数据相印证,进一步验证了该方剂的抗肿瘤特性。接着通过划痕实验和 Transwell 实验进行了功能验证,结果表明,不同浓度肺岩宁方处理组细胞的迁移和侵袭能力均呈剂量依赖性下降,提示该复方可抑制肺癌细胞 95C、95D 的迁移侵袭能力。值得注意的是,在肺癌患者血浆外泌体共培养体系中,肺岩宁方对肺癌细胞迁

移侵袭的抑制效应有所下降。这一现象揭示外泌体可能通过传递促转移信号分子拮抗药物效应,从机制层面证实外泌体介导的细胞间通讯在肺岩宁方抑制肿瘤转移过程中具有重要调控作用。

基于 JAK2/STAT3 与 c-Fos/NFATc1 信号通路在肿瘤恶性进展中的核心调控作用^[25-29],本研究通过 Western blot 实验系统评估肺岩宁方对上述通路关键基因的干预效应。结果显示,肺岩宁方处理可剂量依赖性地降低 JAK2、STAT3 及其下游分子 c-Fos、NFATc1 的蛋白表达水平,提示该复方可能通过抑制 JAK2/STAT3 与 c-Fos/NFATc1 信号轴发挥抗转移作用。此外,肺岩宁方可显著下调 95C 及 95D 细胞内 miR-328 的表达水平,而外泌体共培养可部分逆转该复方对 miR-328 的下调效应。结合前期实验结果,证实外泌体 miR-328 可能通过激活 JAK2/STAT3/c-Fos/NFATc1 信号级联反应,进而削弱肺岩宁方的治疗效果。

综上,本研究首次揭示肺岩宁方可能通过双重调控机制抑制肺癌转移:一方面通过直接抑制 JAK2/STAT3/c-Fos/NFATc1 信号通路传导,另一方面通过阻断外泌体 miR-328 介导的促转移信号传递,从而实现对肺癌侵袭转移的多靶点干预,为肺癌的中药治疗提供新的理论依据及靶点,值得进一步研究其作用机制及相关临床应用。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] SIEGEL L R, KRATZER B T, GIAQUINTO N A, et al. Cancer statistics, 2025[J]. CA Cancer J Clin, 2025, 75(1): 10-45.
- [2] ARYA S B, COLLIE S P, PARENT C A. The ins-and-outs of exosome biogenesis, secretion, and internalization[J]. Trends Cell Biol, 2024, 34(2): 90-108.
- [3] LI B, CAO Y, SUN M, FENG H. Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy[J]. FASEB J, 2021, 35(10): e21916.
- [4] SUN Z, SHI K, YANG S, et al. Effect of exosomal miRNA on cancer biology and clinical applications[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 147.
- [5] WANG Z, XIE W, GUAN H. The diagnostic, prognostic role and molecular mechanism of miR-328 in human cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 157: 114031.
- [6] SONOKI H, TANIMAE A, ENDO S, et al. Kaempferol and luteolin decrease Claudin-2 expression mediated by inhibition of STAT3 in lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Nutrients, 2017, 9(6): 597.
- [7] 马玥,徐振晔,王立芳,等. 肺岩宁方介导 Atg5 对肺癌 A549

细胞自噬调控抗肺癌侵袭转移的实验研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(4): 1230-1238.

MA Y, XU Z Y, WANG L F, et al. Experimental study of Feiyanning decoction mediating autophagy regulation by Atg5 on lung cancer A549 cells against lung cancer invasion and metastasis[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol, 2023, 25(4): 1230-1238.

- [8] 夏尽力,蔡玥娇,吴新鸿,等. 肺岩宁方调控 EMT 逆转非小细胞肺癌顺铂耐药[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 43-51.

XIA J L, CAI Y J, WU X H, et al. Chinese herbal medicine Feiyanning prescription regulates EMT to reverse cisplatin resistance in non-small cell lung cancer[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(4): 43-51.

- [9] 张亚辉,蔡玥娇,邓海滨,等. 肺岩宁下调转录因子 Snail 表达抑制人肺腺癌 A549 细胞 EMT 发生及侵袭转移[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(4): 1239-1249.

ZHANG Y H, CAI Y J, DENG H B, et al. Feiyanning formula down-regulated the expression of transcription factor Snail and inhibited EMT occurrence, invasion and metastasis of human lung adenocarcinoma A549 cells[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol, 2023, 25(4): 1239-1249.

- [10] 王薇,徐振晔,邓海滨,等. 缺氧条件下肺岩宁方抑制 TC2N 的表达对肺癌细胞培养基诱导的 HUVEC 细胞增殖、迁移侵袭和管腔形成的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(4): 1250-1258.

WANG W, XU Z Y, DENG H B, et al. Influences of Feiyanning formula inhibiting the expression of TC2N on the proliferation, migration, invasion and lumen formation of HUVEC cells induced by lung cancer cell culture medium under hypoxia[J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol, 2023, 25(4): 1250-1258.

- [11] 张程程,季青,杨越,等. 肺岩宁方通过 RANK-RANKL 途径调节肺癌骨转移中破骨细胞活化机制的研究[J]. 陕西中医, 2018, 39(4): 411-414, 418.

ZHANG C C, JI Q, YANG Y, et al. The study of Feiyanning decoction on osteoclast activation mechanism in bone metastasis of lung cancer through RANK-RANKL pathway[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2018, 39(4): 411-414, 418.

- [12] 张程程,季青,杨越,等. 肺岩宁方调控 TGF- β 介导的骨转移相关 PTHrP/RANKL 信号通路抗肺癌侵袭转移[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 132-136.

ZHANG C C, JI Q, YANG Y, et al. Effect of Feiyanning formula on Invasion and metastasis of lung cancer via inhibiting TGF- β mediated bone metastasis related PTHrP/RANKL signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2018, 24(3): 132-136.

- [13] ZHANG C, YANG J, ZHU Z, et al. Exosomal lncRNA HOTAIR promotes osteoclast differentiation by targeting TGF- β /PTHrP/RANKL pathway[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2023, 132(3): 242-252.

- [14] ZHANG C, QIN J, YANG L, et al. Exosomal miR-328

- originated from pulmonary adenocarcinoma cells enhances osteoclastogenesis via downregulating Nrp-2 expression [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):405.
- [15] LAI J J, CHAU Z L, CHEN S Y, et al. Exosome processing and characterization approaches for research and technology development[J]. *Adv Sci (Weinh)*. 2022, 9(15):e2103222.
- [16] 刘新军,尹君,徐振晔. 徐振晔教授治疗肺癌经验方——肺岩宁方发微[J]. *中医临床研究*, 2015, 7(14):47-48.
- LIU X J, YING J, XU Z Y. The experience of Pro. XU Zhenhua for treating lung cancer with the Feiyanning decoction[J]. *Clin J Chin Med*, 2015, 7(14):47-48.
- [17] ZHENG Z, MA Y, WANG L, et al. Chinese herbal medicine Feiyanning cooperates with cisplatin to enhance cytotoxicity to non-small-cell lung cancer by inhibiting protective autophagy[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276:114196.
- [18] ZHANG K, PENG Y, WANG Q, et al. Crosstalk between lung cancer cells and macrophages contributes to traditional Chinese medicine Feiyanning-induced anti-tumor activities by suppressing M2 macrophage polarization [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2023, 55(10):1681-1684.
- [19] WANG J Y, GUO J, DONG C S, et al. Effects of Feiyanning decoction, a compound traditional Chinese medicine, on iNOS and COX-2 expressions induced by tumor necrosis factor- α in lung adenocarcinoma cell line [J]. *J Chin Integr Med*, 2012, 10(6):695-700.
- [20] WU X, XIA J, WANG Z, et al. Feiyanning downregulating CXCLs/CXCR2 axis to suppress TANs infiltration in the prevention of lung cancer metastasis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 295:115277.
- [21] ZHU L M, SHI H X, SUGIMOTO M, et al. Feiyanning formula induces apoptosis of lung adenocarcinoma cells by activating the mitochondrial pathway [J]. *Front Oncol*, 2021, 11:690878.
- [22] SANG S, SUN C, DING R, et al. Feiyanning formula modulates the molecular mechanism of osimertinib resistance in lung cancer by regulating the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:1019451.
- [23] MASHOURI L, YOUSEFI H, AREF A R, et al. Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18(1):75.
- [24] MAO X, XU J, WANG W, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: New findings and future perspectives [J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):131.
- [25] HU Z, SUI Q, JIN X, et al. IL6-STAT3-C/EBP β -IL6 positive feedback loop in tumor-associated macrophages promotes the EMT and metastasis of lung adenocarcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1):63.
- [26] YING L, YAO Y, LV H, et al. IL-17A contributes to skeletal muscle atrophy in lung cancer-induced cachexia via JAK2/STAT3 pathway [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 322(5):C814-C824.
- [27] JIAO H, JIANG W, WANG H, et al. Soft coral-derived Aspernolide a suppressed non-small cell lung cancer induced osteolytic bone invasion via the c-Fos/NFATC1 signaling pathway [J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(10):5996-6011.
- [28] SONG X, CHENG X, JIN X, et al. EGFL6 promotes bone metastasis of lung adenocarcinoma by increasing cancer cell malignancy and bone resorption [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2023, 40(4):357-371.
- [29] ZHANG L, LIU M, LIU J, et al. 27-Hydroxycholesterol enhanced osteoclastogenesis in lung adenocarcinoma microenvironment [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(8):12692-12700.
- [责任编辑 张丰丰]