·论著·

肺癌外泌体 miR-494-3p 靶向 ZEB1 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞 EMT 进程的机制*

侯丽丽[1]　宋秋红[2]　刘硕人[1]　赵睿暄[3]

(1. 中国人民解放军北部战区总医院呼吸与危重症医学科，辽宁 沈阳 110000；2. 沈阳京沈医院呼吸与危重症医学科，辽宁 沈阳 110020；3. 中国人民解放军北部战区总医院呼吸与危重症医学科，辽宁 沈阳 110000)

【摘要】 目的　探讨外周血间充质干细胞(MSCs)来源的外泌体(MSCs-Exos)对非小细胞肺癌(NSCLC)A549 细胞上皮-间质转化(EMT)进程的影响和机制。**方法**　从 NSCLC 患者的外周血中提取 MSCs，分离、纯化，并通过油红 O 染色评估其脂质分化能力。采用超速离心法分离出 MSCs-Exos，并用 TEM 检测其形态。采用 NTA 分析外泌体的大小和分布。Western blot 检测外泌体特征蛋白 CD9、TSG101 和 Calnexin 的表达。此外，采用 RT-qPCR 检测 MSCs-Exos 中 miR-494-3p 的表达水平。培养 NSCLC 细胞 A549，并进行 Transwell 细胞侵袭实验，以评估 MSCs-Exos 对 A549 细胞迁移和侵袭特性的影响；采用 RT-qPCR 定量检测 ZEB1 mRNA 的表达水平。荧光素酶实验检测 miR-494-3p 与 ZEB1 结合情况。免疫细胞荧光染色观察细胞内 E-cadherin 和 Vimentin 表达，Western Blot 检测 ZEB1、E-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 蛋白的表达水平。**结果**　miR-494-3p 表达在 MSCs-Exos 中明显降低。MSCs-Exos 中 miR-494-3p 抑制 A549 细胞增殖、迁移和 EMT 进程。miR-494-3p 可直接靶向 ZEB1。过表达 ZEB1 减弱 miR-494-3p 对 A549 细胞 EMT 进程的抑制作用。**结论**　NSCLC 患者外周血 MSCs-Exos 中 miR-494-3p 通过靶向 ZEB1 抑制 A549 细胞 EMT 进程。

【关键词】 非小细胞肺癌；间充质干细胞；外泌体；miR-494-3p；ZEB1；上皮-间质转化

【中图分类号】 R734.2　**【文献标志码】** A　**DOI**：10.3969/j.issn.1672-3511.2026.01.002

Targeting ZEB1 with the lung cancer exosome miR-494-3p inhibits EMT in non-small cell lung cancer A549 cells

HOU Lili[1], SONG Qiuhong[2], LIU Shuoren[1], ZHAO Ruixuan[3]

(1. *Department of Respiratory and Critical Care Medicine, General Hospital of Northern Theater Command of Chinese People's Liberation Army, Shenyang* 110000, *China*;
2. *Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Shenyang Jingshen Hospital, Shenyang* 110020, *China*;
3. *Department of Respiratory and Critical Care Medicine, General Hospital of Northern Theater Command of Chinese People's Liberation Army, Shenyang* 110000, *China*)

【Abstract】 Objective　MSC-derived exosomes (MSC-Exos) from peripheral blood Mesenchymal stem cells (MSCs) were studied for their influence on epithelial-mesenchymal stem cells (MSCs) from A549 cells with non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods**　Oil red O was used to stain MSCs isolated from peripheral blood of NSCLC patients to determine their lipid differentiation ability. An ultrafast centrifugation method was used to separate MSCs and exosomes, transmission electron microscopy was used to view exosome morphology, and NTA particle size analysis was used to describe their size and distribution. CD9, TSG101, and calnexin were identified in MSC-Exos through Western blot analysis, while miR-494-3p expression was quantified using RT-qPCR. In order to evaluate the influence of MSC-Exos on the migratory and invasive capabilities of NSCLC cells, A549 cells were cultivated and subsequently subjected to a Transwell cell invasion assay. In addition to RT-qPCR analysis of ZEB1 mRNA expression, luciferase assays were performed to determine miR-494-3p binding to ZEB1. Immunofluorescence staining was utilized for the evaluation of E-cadherin and Vim-

基金项目：辽宁省医学科学研究项目(202203184)

引用本文：侯丽丽，宋秋红，刘硕人，等. 肺癌外泌体 miR-494-3p 靶向 ZEB1 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞 EMT 进程的机制[J]. 西部医学，2026，38(1)：6-12，19. DOI：10.3969/j.issn.1672-3511.2026.01.002

entin expression levels, and Western blot analysis was employed to determine the levels of ZEB1, E-cadherin, Vimentin, MMP2, and MMP9. **Results** MiR-494-3p expression in MSCs-Exos was significantly reduced, inhibiting the proliferation, migration, and EMT processes in A549 cells. As miR-494-3p directly targets ZEB1, it was attenuated when ZEB1 was overexpressed in A549 cells, preventing miR-494-3p from inhibiting EMT. **Conclusion** As a result of miR-494-3p expression in peripheral blood MSCs from NSCLC patients, A549 cells were inhibited in their EMT process by targeting ZEB1.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; Mesenchymal stem cells; Exosome; miR-494-3p; Epithelial-mesenchymal transition

肺癌是全球最普遍的恶性肿瘤，也是癌症患者死亡的主要原因[1]。尽管在治疗方面取得了进展，但仍存在癌症转移和术后复发等因素，阻碍了肺癌管理的临床疗效，导致晚期患者的高病死率。间充质干细胞（Mesenchymal stem cells，MSCs）是一种来源于中胚层的多能干细胞，具有强大的增殖和自我更新能力，并可释放各种细胞外囊泡参与生物过程[2]。已有研究证实 MSCs 来源的外泌体（MSCs-derived exosomes，MSCs-Exos）可通过多种作用机制促进受损肺组织再生[3]。但目前 MSCs-Exos 在非小细胞肺癌（Non-small cell lung cancer，NSCLC）发生发展中的作用机制仍不明确。随着高通量测序技术的发展，越来越多的证据显示微小 RNA（MicroRNA，miRNA）可作为抑癌或者致癌因子参与肺癌的生物学进程的调控[4]。近年来，miR-494-3p 在多个癌种血清外泌体中被报道表达下调，并且 miR-494-3p 的低表达与癌症的增殖、分化以及上皮间质转化（Epithelial-mesenchymol transition，EMT）等过程关系密切[5]，然而其在 NSCLC 中的作用尚不明确。本研究以 NSCLC 患者外周血来源的 MSCs-Exos 和 NSCLC 细胞株 A549 为研究对象，观察 MSCs-Exos 共培养对 A549 细胞 EMT 进程的影响，为后续深入研究 NSCLC 提供参考。

1 资料与方法

1.1 临床标本和细胞株 收集 2021 年 1 月—2024 年 1 月在中国人民解放军北部战区总医院就诊的 NSCLC 患者 100 例纳入观察组，纳入标准：①本院Ⅳ期或Ⅲ期 NSCLC 患者。②年龄在 40～85 岁之间。③原发肺癌。排除标准：①非本院患者。②小细胞肺癌患者（Small cell lung cance，SCLC）。③Ⅰ期和Ⅱ期 NSCLC。④其他原发源的转移性肺癌。同时期收集肺部良性病变患者 100 例纳入对照组。此研究方案通过医院伦理委员会审批（批号：20210105），所有患者均知情同意。NSCLC 细胞株 A549 购于北京博蕾德生物科技有限公司。

1.2 主要仪器和试剂 DMEM/F12 培养基、RPMI-1640 培养基、青-链霉素、胎牛血清、0.25％胰蛋白酶（含 EDTA）购自上海申启生物科技有限公司；miR-494-3p mimic 及其阴性对照（NC mimic）由 GenePharma 公司提供；ZEB1 过表达质粒（OE ZEB1）及其对照（OENC）由 GeneChem 公司合成；Lipofectamine 3000、DAPI、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自福州木辰生物科技有限公司；油红 O 染料购自湖北百奥斯生物科技有限公司；成脂诱导分化培养基试剂盒购自厦门逸漠生物科技有限公司；Matrigel 基质胶购自北京博蕾德生物科技有限公司；TRIzol 购自北京莱博润科生物科技有限公司；miRNeasy mini kit 购自上海力敏实业有限公司；cDNA 合成使用逆转录试剂盒购自北京凡知医学科技有限公司；SYBR Green PCR Master Mix 购自深圳子科生物科技有限公司；双荧光素酶报告基因试剂盒购于广州易锦生物技术有限公司；Transwell 装置（8 μm）、结晶紫购自上海尤惟科生物科技有限公司；ECL 发光试剂盒、磷酸酶抑制剂混合液购自百克赛斯生物科技有限公司。一抗 CD9、TSG101、calnexin、ZEB1、E-cadherin、Vimentin、MMP2、MMP9、β-actin、HRP/Alexa Fluor 标记的相关二抗均购自 Abcam 公司。透射电镜（TEM）购自思耐达精密仪器有限公司；NanoSight NS300 仪器购自皕赫国际贸易有限公司；ABI Prism 7900 系统购自上海高思维医疗科技有限公司；光学显微镜购自基恩士有限公司。

1.3 方法

1.3.1 MSCs 的分离培养及鉴定 收集健康受试者和 NSCLC 患者外周血，血液样本保存在 4 ℃，在采集后 1 h 内转运至实验室。取 PBS：样本（1∶1）稀释的血液，加入 1.053 g/mL 的 Percoll 溶液 20 mL，1 600×g 离心 20 min，连续 2 min，取平均界面的单克隆细胞，加入 1.064 g/mL 的 Percoll 溶液 20 mL，同样用 PBS 稀释，离心 20 min。收集单克隆细胞，用 PBS 洗涤，重悬于 MSCs 培养基中。随后，将细胞在 T25 培养瓶中培养，并在 5％ CO_2 和 38 ℃的湿化空气中孵育。48 h 后更换培养基、丢弃未贴壁的细胞。分离的细胞集落在 MSCs 培养基中继续培养，直到融合率达到 75％。然后用 0.5％胰蛋白酶-EDTA 对细胞进行传代培养。倒置显微镜下观察第 3 代细胞形态。按照成脂诱导

分化培养基试剂盒说明书方法进行成脂诱导，22 天后行油红 O 染色，在倒置显微镜下观察脂滴形成情况。

1.3.2 细胞培养及转染 A549 细胞作为贴壁细胞在含有 10%FBS 和 1%青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基中培养。细胞在 37℃，5% CO_2 下培养，Lipofectamine 3000 试剂转染 A549 细胞。

1.3.3 MSCs-Exos 的分离培养及鉴定 取传代至第 4 代的 MSCs 细胞，加入 5 mL 不含 FBS 的 DMEM 低糖培养基，然后在 37 ℃ 21%（常氧）和 5%（低氧）不同氧浓度的培养箱中处理 24 h。24 h 后取条件培养基，其中含有 MSCs-EXOs。使用总外泌体分离试剂分离外泌体。PBS 重悬收集沉淀，置于－80 ℃保存备用。TEM 观察 MSCs-Exos 形态；Western blot 检测 MSCs-Exos 膜表面标志性蛋白 CD9、TSG101、Calnexin；纳米颗粒示踪分析（NTA）仪检测 MSCs-Exos 粒径分布。

1.3.4 TEM 及 NTA 外泌体应用于涂有支撑膜的铜网格上，滤纸去除多余的液体。3%磷酸钨溶液处理铜栅格 3 min，去除染色溶液，TEM 检查干燥的标本。采用 NanoSight NS300 系统（NanoSight Technology）分析外泌体浓度和大小分布。外泌体经 PBS 重悬后注射到 NanoSight NS300 仪器中，按照说明继续捕获和分析设置，NTA 分析软件（Version 2.3）进行分析。

1.3.5 RT-qPCR 实验 RNA 分离试剂盒提取总 RNA，以确定基因表达水平。使用 cDNA 合成试剂盒将获得的 RNA 合成为 cDNA。对于 RT-qPCR 反应，利用 Rotorgene Q5 plex ＋HRM RT-PCR 进行分析，并通过 Rotor 基因 Q 软件程序获取数据。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法评估基因表达水平的变化。引物序列如下：miR-494-3p，F：5′- AACGAGACGACGACAGAC-3′，R：5′-TGAAACATACACGGGAAACCTC-3′；U6，F：5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′，R：5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′；ZEB1，F：5′-AGGAGGAGATAGAAGCGCAGA-3′，R：5′-GTGCGGACTTGGTACAGGT-3′；GAPDH，F：5′-GGCATCCACGAAACTACATTCAA-3′，R：5′-AGCCAGAGCAGTGATCTCCTTCT-3′。

1.3.6 Transwell 实验 不同处理的 A549 细胞在 6 孔板中生长至 80%～90%时，将不同处理的 A549 细胞加入 Transwell 装置上室。将无血清培养基加入上室，将 10%FBS 加入下室。48 h 孵育后，用棉签精细地去除上表面的细胞，固定下表面的细胞，并用结晶紫染色。用光学显微镜捕获 5 个随机场并进行量化。在侵袭实验中，Matrigel 预涂在 Transwell 腔室的上表面。上室中加入不同处理的 A549 细胞，其余步骤同迁移实验。

1.3.7 双荧光素酶报告基因系统实验 将 ZEB1 mRNA 的野生型（WT）或突变型（MUT）3′-UTR 片段，包括 miR-494-3p 结合位点，插入 pGL3 载体（上海联迈生物工程有限公司），生成 ZEB1-WT 3′-UTR 和 ZEB1-MUT 3′-UTR 荧光素酶质粒。将 A549 细胞以 1×10^4 细胞/mL 的密度接种于 24 孔板中，并培养过夜。用 Lipofectamine 3000 将 ZEB1-WT 3′-UTR 或 ZEB1-MUT 3′-UTR 和 miR-494-3p mimic 或 NC mimic 共转染 A549 细胞。用双荧光素酶报告基因试剂盒检测荧光素酶活性。

1.3.8 免疫细胞荧光染色实验 A549 细胞以 0.5×10^5 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板中。细胞粘附后，用 BA 溶液处理 24 h。甲醇固定细胞，用 PBS 洗涤，在含有 1.5%正常阻断血清的 PBS 中孵育 30 min。随后，将细胞暴露于一抗 E-cadherin 和 Vimentin 中，室温下孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次，每次 2 min，细胞与标记的二抗在室温下孵育 30 min。用含有 DAPI 的封片剂进行样本封片，荧光显微镜观察、捕获图像。

1.3.9 Western blot 实验 取对数生长期的 A549 细胞，以 5×10^5/mL 的密度接种于 6 孔板中 24 h。按照各组处理方式培养后，去除培养基，冷 PBS 洗涤细胞 3 次，并在添加 PMSF 和 RIPA 缓冲液中溶解。将裂解产物在冰上孵育 30 min，在 4 ℃以12 000 rpm 离心 10 min，使用 BCA 试剂盒定量测定整个细胞裂解产物中的蛋白浓度。通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白，并转移到 pvdf 膜上。在室温下用 5% BSA 阻断非特异性结合 1 h。然后将膜与相关一抗在 4 ℃孵育过夜。室温下用二抗稀释物孵育 1 h。使用 ECL 试剂盒检测蛋白表达水平。

1.4 统计学分析 每个实验至少重复 3 次，所有数据以（$\bar{x}\pm s$）表示。采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。两组间差异分析采用 Student's t 检验；多组间差异采用方差分析，Tukey's 进行多重比较。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-494-3p 在 NSCLC 患者外周血 MSCs-Exos 中低表达 倒置相差显微镜下观察第三代 MSCs，油红 O 染色可见红色脂滴形成，见图 1。TEM 和 NTA 分析发现，分离的 MSCs-Exo 大小为 150 nm 左右，见图 2。Western blot 分析显示 CD9 和 TSG101 在细胞膜表面呈阳性表达，而 Calnexin 则呈阴性表达，见图 3。RT-qPCR 结果显示，MSCs-Exos 中的 miR-494-3p 表达明显降低（$P<0.01$），见表 1。

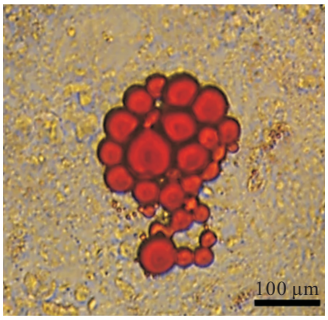

图 1　油红 O 染色鉴定 MSCs 的成脂分化能力

Figure 1　Lipid red O staining to identify the adipogenic differentiation ability of MSCs

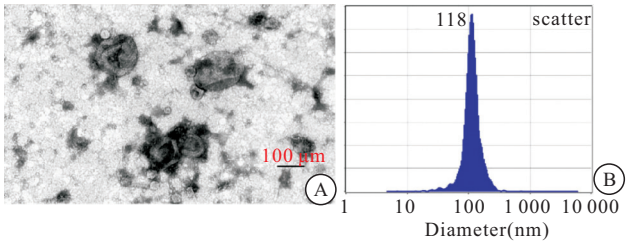

图 2　MSCs-Exos 鉴定

Figure 2　Identification of MSCs-Exos

注：A. TEM；B. NTA 分析。

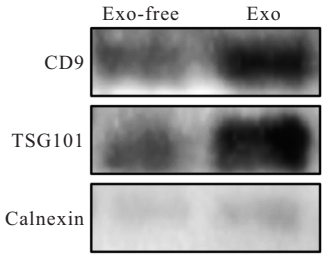

图 3　MSCs-Exos 膜表面标志性蛋白条带

Figure 3　Signature protein band on the surface of MSCs-Exos membrane

表 1　各组 miR-494-3p 表达比较（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 1　Comparison of miR-494-3p expression in each group

组别	miR-494-3p 表达
Exo-free 组	1.00±0.07
Exo 组	0.58±0.15①
t	6.076
P	0.002

注：与 Exo-free 组比较，①$P<0.05$。

2.2　MSCs-Exos 对 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响　与 MSCs-Exos 共培养的 A549 细胞迁移、侵袭能力增强，差异有统计学意义（$P<0.01$），见图 4、表 2。

2.3　MSCs-Exos 对 A549 细胞 EMT 进程的影响　免疫细胞荧光染色结果显示，与 MSCs-Exos 共培养的 A549 细胞内 Vimentin 荧光密度值显著升高，而 E-cadherin 荧光密度值显著降低（$P<0.01$），见图 5、表 3。Western Blot 结果显示，与 MSCs-Exos 共培养的 A549 细胞内 N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9

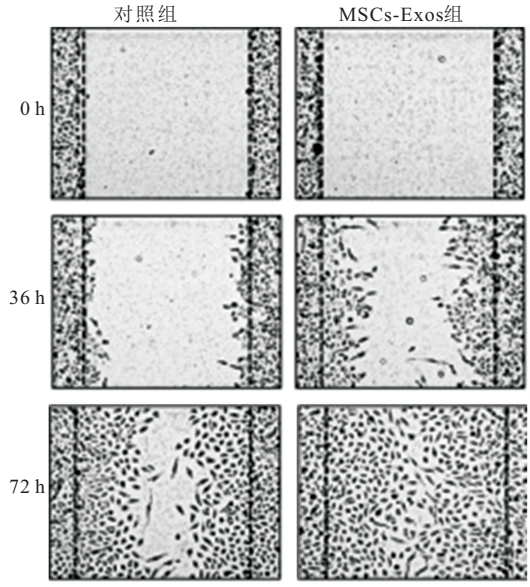

图 4　MSCs-Exos 对 A549 细胞迁移、侵袭能力的影响

Figure 4　Effects of MSCs-Exos on migration and invasion ability of A549 cells

表 2　MSCs-Exos 对 A549 细胞迁移、侵袭能力的影响（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 2　Effects of MSCs-Exos on migration and invasion ability of A549 cells

组别	36 h 划痕迁移率(%)	72 h 划痕迁移率(%)	迁移细胞数目（个）	侵袭细胞数目（个）
对照组	12.59±1.15	23.49±2.36	506.86±23.02	251.53±21.30
MSCs-Exos 组	21.08±3.90①	36.14±5.38①	680.27±115.02①	452.23±128.87①
t	5.116	5.272	3.621	3.764
P	0.002	0.001	0.009	0.008

注：与对照组比较，①$P<0.05$。

蛋白的表达水平升高，同时 E-cadherin 蛋白的表达水平显著下调（$P<0.01$），见图 6、表 4。

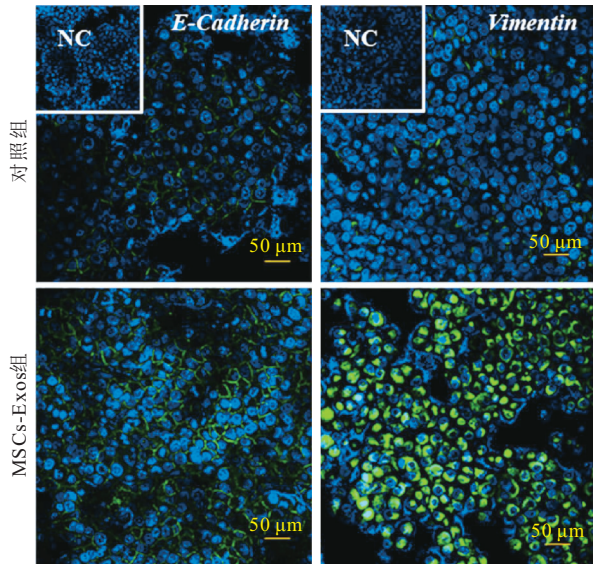

图 5　各组 A549 细胞内 Vimentin 与 E-cadherin 荧光表达比较

Figure 5　Comparison of Vimentin and E-cadherin fluorescence expression in A549 cells of each group

表 3 MSCs-Exos 对 A549 细胞 Vimentin 与 E-cadherin 荧光表达强度的影响（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 3 Effects of MSCs-Exos on the fluorescence expression intensity of Vimentin and E-cadherin in A549 cells

组别	Vimentin 荧光强度	E-cadherin 荧光强度
对照组	0.26±0.02	0.40±0.03
MSCs-Exos 组	1.04±0.35①	0.31±0.03①
t	5.461	4.741
P	0.002	0.003

注：与对照组比较，①$P<0.05$。

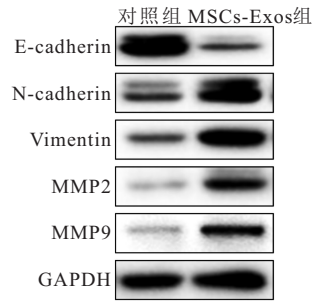

图 6 各组 A549 细胞内 EMT 进程相关指标蛋白表达条带

Figure 6 Expression bands of protein related to EMT process in A549 cells of each group

表 4 MSCs-Exos 对 A549 细胞 EMT 进程相关指标蛋白水平的影响（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 4 Effects of MSCs-Exos on protein levels related to EMT process of A549 cells

组别	E-cadherin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH	MMP2/GAPDH	MMP9/GAPDH
对照组	1.00±0.08	1.00±0.10	1.00±0.12	1.00±0.11	1.01±0.08
MSCs-Exos 组	0.64±0.14①	1.50±0.21①	1.55±0.21①	1.51±0.31	1.37±0.20①
t	5.302	5.145	5.617	3.717	4.168
P	0.001	0.001	0.003	0.010	0.002

注：与对照组比较，①$P<0.05$。

2.4 miR-494-3P 对 ZEB1 的靶向调控作用 与阴性对照 mimic 组相比，过表达 miR-494-3p 导致 ZEB1-WT 报告基因荧光素酶活性显著降低（$P<0.01$）；相反，miR-494-3p 过表达对 ZEB1-MUT 报告基因荧光素酶活性没有显著影响（$P>0.05$）。见表 5。转染 miR-494-3p mimic 的 A549 细胞中，ZEB1 的 mRNA 和蛋白水平均显著下降（$P<0.01$），见图 7、表 6。

表 5 各组荧光素酶活性比较（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 5 Comparison of luciferase activity in each group

组别	荧光素酶相对活性
NC mimic+ZEB1-WT 组	1.00±0.07
miR-494-3p mimic+ZEB1-WT 组	0.65±0.13①
NC mimic+ZEB1-MUT 组	1.01±0.04
miR-494-3p mimic+ZEB1-MUT 组	0.98±0.06
F	12.660
P	<0.001

注：与 NC mimic+ZEB1-WT 组比较，①$P<0.05$。

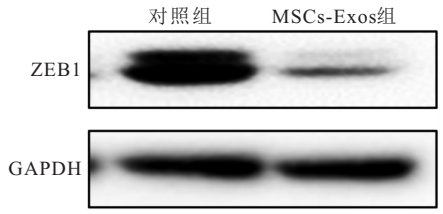

图 7 ZEB1 蛋白表达条带

Figure 7 Expression band of ZEB1 protein

2.5 过表达 ZEB1 取消 miR-494-3p 对 A549 细胞 EMT 进程的抑制作用 OEZEB1 转染显著增加 A549 细胞中 ZEB1 蛋白和 mRNA 表达水平（$P<0.01$）；而 miR-494-3p mimic 处理则减少 ZEB1 表达

表 6 各组 ZEB1 mRNA 和蛋白比较（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 6 Comparison of ZEB1 mRNA and protein in each group

组别	ZEB1 mRNA	ZEB1/GAPDH
NC mimic 组	1.00±0.07	1.00±0.09
miR-494-3p mimic 组	0.56±0.16①	0.60±0.16①
t	5.866	5.379
P	0.002	0.002

注：与 NC mimic 组比较，①$P<0.05$。

（$P<0.05$），见图 8、表 7。ZEB1 过表达促进 A549 细胞迁移和侵袭（$P<0.01$）；miR-494-3p mimic 处理可减弱 ZEB1 过表达对 CAL27 细胞迁移和侵袭的诱导作用（$P<0.05$）。见图 9、表 8。ZEB1 过表达可诱导 Vimentin 荧光密度值升高，E-cadherin 荧光密度值降低（$P<0.01$）；而 miR-494-3p mimic 则取消 OEZEB1 对上述指标荧光表达强度的影响作用（$P<0.05$）。见图 10、表 9。与 OENC 组相比，OEZEB1 组 N-cadherin、Vimentin、MMP2 和 MMP9 蛋白的表达水平显著增加（$P<0.01$）；相反地，E-cadherin 蛋白表达显著降低（$P<0.01$）；与 OEZEB1 组相比，OEZEB1 和 miR-494-3p mimic 共处理则取消上述指标变化趋势（$P<0.05$）。见图 11、表 10。

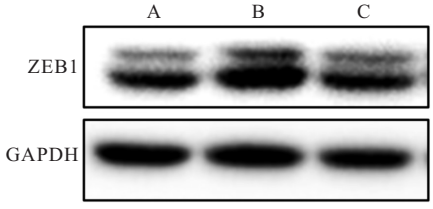

图 8 ZEB1 蛋白表达条带

Figure 8 Expression band of ZEB1 protein

注：A：OENC 组；B：OEZEB1 组；C：OEZEB1+miR-494-3p mimic 组。

表 7 各组 ZEB1 mRNA 和蛋白比较（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 7 Comparison of ZEB1 mRNA and protein in each group

组别	ZEB1 mRNA	ZEB1/GAPDH
OENC 组	1.00±0.10	1.00±0.09
OEZEB1 组	1.65±0.19①	1.54±0.32①
OEZEB1+miR-494-3p mimic 组	1.08±0.39②	1.05±0.35②
F	11.211	7.021
P	0.001	0.007

注：与 OENC 组比较，①$P<0.05$；与 OEZEB1 组比较，②$P<0.05$。

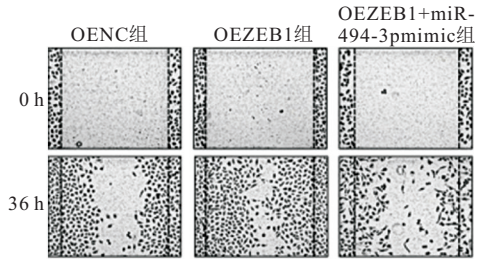

图 9 Transwell 实验评估细胞迁移和侵袭能力

Figure 9 Transwell experimental evaluation of cell migration and invasion ability

表 8 各组细胞迁移和侵袭能力比较（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 8 Comparison of cell migration and invasion ability of each group

组别	迁移细胞数	侵袭细胞数
OENC 组	507.92±17.63	249.51±25.21
OEZEB1 组	730.47±140.38①	505.74±90.82①
OEZEB1+miR-494-3p mimic 组	534.65±143.90②	366.25±115.63②
F	6.526	13.311
P	0.009	<0.001

注：与 OENC 组比较，①$P<0.05$；与 OEZEB1 组比较，②$P<0.05$。

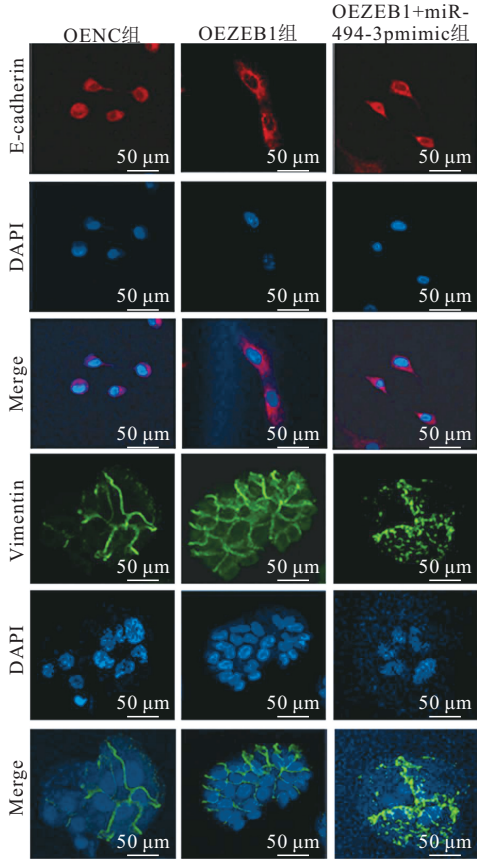

图 10 各组 A549 细胞内 Vimentin 与 E-cadherin 荧光表达比较

Figure 10 Comparison of Vimentin and E-cadherin fluorescence expression in A549 cells of eachgroup

表 9 MSCs-Exos 对 A549 细胞 Vimentin 与 E-cadherin 荧光表达强度的影响（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 9 Effects of MSCs-Exos on the fluorescence expression intensity of Vimentin and E-cadherin in A549 cells

组别	Vimentin 荧光强度	E-cadherin 荧光强度
OENC 组	0.30±0.02	0.40±0.09
OEZEB1 组	0.44±0.08①	0.22±0.05①
OEZEB1+miR-494-3p mimic 组	0.35±0.12②	0.33±0.07②
F	4.200	8.797
P	0.036	0.003

注：①与 OENC 组比较，$P<0.05$；②与 OEZEB1 组比较，$P<0.05$。

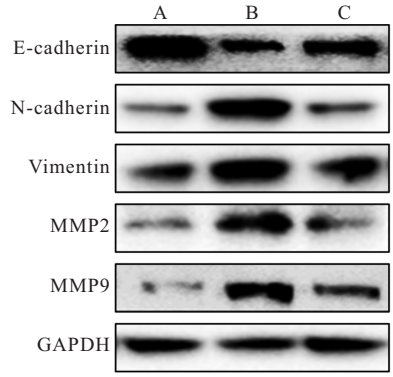

图 11 各组 A549 细胞内 EMT 进程相关指标蛋白表达条带

Figure 11 Expression bands of protein related to EMT process in A549 cells of each group

注：A. OENC 组；B. OEZEB1 组；C. OEZEB1+miR-494-3p mimic 组

3 讨论

2020 年 WHO 公布的全球癌症统计分析数据显示，肺癌以 11.4%的确诊率位列新发癌症的第二位，以 18%的死亡率成为癌症患者最主要死因[6]。肺癌根据组织病理学可分为 NSCLC 和 SCLC，其中 NSCLC 的患者占比高达 85%[7]。MSCs 来源于中胚层，存在于各种组织中，包括脂肪组织、骨髓、脐带血和胎盘组织[8]，具有自我复制能力和多向分化潜能。本研究从 NSCLC 患者外周血中分离出 MSCs，并成功提取其来源的外泌体（MSCs-Exos）[9]，MSCs-Exos 具有低免疫原性、强增殖能力和可作为载体等优点而被应用于各种良恶性疾病中，包括创面愈合[10-11]等。本研究结果证实其在 NSCLC 细胞 A549 中可调控 EMT 进程，并进一步揭示了 miR-494-3p 通过靶向 ZEB1 调控 NSCLC 细胞迁移与侵袭的机制。

miRNAs 是一种短链、非编码的 RNA 分子，参与细胞增殖、分化和凋亡[12]。首先，本研究证实了 MSCs-Exos 中 miR-494-3p 的表达明显下调。近年来，miR-494-3p 在结直肠癌、甲状腺癌、膀胱癌、乳腺癌等多个癌种中被报道表达下调[13-16]，并且 miR-494-3p的低表达与癌症的增殖、分化以及EMT等过程关系密切。例如，miR-494-3p在胃肠道间质瘤中通过抑

表 10 MSCs-Exos 对 A549 细胞 EMT 进程相关指标蛋白水平的影响（$n=6, \bar{x}\pm s$）

Table 10 Effects of MSCs-Exos on the levels of protein related to EMT process in A549 cells

组别	E-cadherin/GAPDH	N-cadherin/GAPDH	Vimentin/GAPDH	MMP2/GAPDH	MMP9/GAPDH
OENC 组	1.00±0.13	1.01±0.09	1.00±0.11	1.00±0.12	1.00±0.11
OEZEB1 组	0.59±0.17①	1.92±0.41①	1.74±0.29①	1.87±0.39①	1.84±0.39①
OEZEB1+miR-494-3p mimic 组	0.95±0.27②	1.10±0.29②	1.18±0.31②	1.24±0.27②	1.14±0.31②
F	7.747	17.250	14.211	15.130	13.990
P	0.005	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与 OENC 组比较，①$P<0.05$；与 OEZEB1 组比较，②$P<0.05$。

制细胞增殖和诱导细胞凋亡发挥抑瘤作用[17]。本研究进一步补充了其在 NSCLC 中的作用，提示其具有跨癌种的广谱抗肿瘤潜力[18]。通过 Transwell 实验，本研究观察到 MSCs-Exos 可增强 A549 细胞的迁移与侵袭能力，提示其在 NSCLC EMT 进程中具有促进作用。进一步通过过表达和荧光素酶实验，研究明确了 miR-494-3p 与 ZEB1 存在直接靶向关系。ZEB1 作为 EMT 过程中的关键转录因子，其上调会抑制 E-cadherin 表达、增强 Vimentin 表达，促进肿瘤细胞失去极性、获得侵袭性表型。本研究的免疫荧光与 Western blot 结果也证实，miR-494-3p 可通过抑制 ZEB1 而下调 Vimentin、MMP2、MMP9 等促进迁移的分子表达，恢复 E-cadherin 的表达，从而抑制 EMT 进程。

对比以往报道，本研究结果与 miR-494-3p 在其他肿瘤中的功能基本一致[19]，进一步验证了其在 NSCLC 中的生物学效应，并揭示 ZEB1 作为其关键调控靶点的机制[20-25]，也为 NSCLC 的分子治疗提供了理论依据。值得注意的是，已有研究指出 ZEB1 可被 DNA 甲基化抑制剂 5-Aza 抑制，而本研究揭示的 miR-494-3p 亦可负向调控 ZEB1，提示未来可考虑联合应用 5-Aza 与 miR-494-3p 模拟物作为治疗策略，增强疗效并减少耐药。

本研究还存在以下局限：①研究主要基于体外 A549 细胞模型，尚缺乏动物模型中对 miR-494-3p/ZEB1 信号轴功能的系统验证。未来需进一步建立异种移植瘤模型或自发性肺癌模型，验证其在 NSCLC 进展中的体内作用。②外泌体中 miR-494-3p 表达水平低的原因尚不明确，推测可能与 NSCLC 相关微环境下 MSCs 表型变化或外泌体分选机制相关，亦值得深入探讨。③MSCs-Exos 中除 miR-494-3p 外，可能还存在多种调控迁移与侵袭的因子，后续应结合转录组及蛋白质组学进一步筛查其他关键调控成分。

4 结论

本研究发现 MSCs 来源的外泌体可通过携带低表达的 miR-494-3p 上调 ZEB1 的表达，进而抑制 NSCLC 细胞 A549 的 EMT 进程、迁移及侵袭，揭示了 MSCs-Exos 在肺癌微环境调控中的潜在风险。该研究为未来基于 miRNA 的 NSCLC 个体化干预策略提供了理论依据，并提示 miR-494-3p 可能成为新的诊疗标志物和治疗靶点。

【参考文献】

[1] CHAITANYA THANDRA K, BARSOUK A, SAGINALA K, *et al*. Epidemiology of lung cancer[J]. Wo, 2021, 25(1): 45-52.

[2] RODRÍGUEZ-FUENTES D E, FERNÁNDEZ-GARZA L E, SAMIA-MEZA J A, *et al*. Mesenchymal stem cells current clinical applications: a systematic review[J]. Arch Med Res, 2021, 52(1): 93-101.

[3] ZARGAR M J, KAVIANI S, VASEI M, *et al*. Therapeutic role of mesenchymal stem cell-derived exosomes in respiratory disease[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 194.

[4] ZHU X P, KUDO M, HUANG X J, *et al*. Frontiers of microRNA signature in non-small cell lung cancer[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 643942.

[5] HUA J H, WANG X L, MA L Y, *et al*. CircVAPA promotes small cell lung cancer progression by modulating the miR-377-3p and miR-494-3p/IGF1R/AKT axis[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 123.

[6] TRAVIS W D. Lung cancer pathology: current concepts[J]. Clin Chest Med, 2020, 41(1): 67-85.

[7] GIACCONE G, HE Y F. Current knowledge of small cell lung cancer transformation from non-small cell lung cancer[J]. Semin Cancer Biol, 2023, 94: 1-10.

[8] 梅小利，杜伟，吴思澜，等. 人脐带间充质干细胞连续静脉注射对大鼠的安全性及肝脏的影响[J]. 西部医学，2023，35(7)：959-963.

[9] ASGARPOUR K, SHOJAEI Z, AMIRI F, *et al*. Exosomal microRNAs derived from mesenchymal stem cells: cell-to-cell messages[J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 149.

[10] BIAN D H, WU Y, SONG G D, *et al*. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review[J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 24.

[11] GAO F, ZUO B J, WANG Y P, *et al*. Protective function of exosomes from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in acute kidney injury through SIRT1 pathway[J]. Life Sci, 2020, 255: 117719.

（下转第 19 页）

vironment of lung adenocarcinoma featured with ground-glass nodules[J]. Thorac Cancer, 2024, 15(19): 1459-1470.
[11] SHIRAISHI Y, KISHIMOTO J, SUGAWARA S, *et al*. Atezolizumab and platinum plus pemetrexed with or without bevacizumab for metastatic nonsquamous non-small cell lung cancer: a phase 3 randomized clinical trial[J]. JAMA Oncol, 2024, 10(3): 315-324.
[12] PARK S, KIM T M, HAN J Y, *et al*. Phase III, randomized study of atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in patients with EGFR- or ALK-mutated non-small-cell lung cancer (ATTLAS, KCSG-LU19-04)[J]. J Clin Oncol, 2024, 42(11): 1241-1251.
[13] CHEN C, WANG Z H, DING Y, *et al*. Tumor microenvironment-mediated immune evasion in hepatocellular carcinoma[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1133308.
[14] LEI T Y, XU T W, ZHANG N, *et al*. Anlotinib combined with osimertinib reverses acquired osimertinib resistance in NSCLC by targeting the c-MET/MYC/AXL axis[J]. Pharmacol Res, 2023, 188: 106668.
[15] HAN B H, LI K, ZHAO Y Z, *et al*. Anlotinib as a third-line therapy in patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised phase II trial (ALTER0302)[J]. Br J Cancer, 2018, 118(5): 654-661.
[16] LIU Z J, QIN T T, YUAN X H, *et al*. Anlotinib downregulates RGC32 which provoked by bevacizumab[J]. Front Oncol, 2022, 12: 875888.
[17] CHENG S J, WAN X Y, YANG L P, *et al*. RGCC-mediated PLK1 activity drives breast cancer lung metastasis by phosphorylating AMPKα2 to activate oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 342.
[18] XU R, SHANG C, ZHAO J G, *et al*. Knockdown of response gene to complement 32 (RGC32) induces apoptosis and inhibits cell growth, migration, and invasion in human lung cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 394(1-2): 109-118.
[19] LUO Y, YU T, ZHANG Q W, *et al*. Upregulated N-cadherin expression is associated with poor prognosis in epithelial-derived solid tumours: a meta-analysis[J]. Eur J Clin Invest, 2018, 48(4): e12903.
[20] WANG Q, CHEN M Y, TANG X F. Luteolin inhibits lung cancer cell migration by negatively regulating TWIST1 and MMP2 through upregulation of miR-106a-5p[J]. Integr Cancer Ther, 2024, 23: 15347354241247223.
[21] MUSTACCHI G, SORMANI M P, BRUZZI P, *et al*. Identification and validation of a new set of five genes for prediction of risk in early breast cancer[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(5): 9686-9702.

(收稿日期:2025-04-10; 修回日期:2025-10-20; 编辑:张翰林)

(上接第 12 页)

[12] SADAKIERSKA-CHUDY A. microRNAs: diverse mechanisms of action and their potential applications as cancer epi-therapeutics[J]. Biomolecules, 2020, 10(9): 1285.
[13] GAO Y, YIN Z, QI Y L, *et al*. Golgi phosphoprotein 3 promotes angiogenesis and sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma via upregulating exosomal miR-494-3p[J]. Cancer Cell Int, 2022, 22(1): 35.
[14] ZHAO J H, ZENG H, GUO C, *et al*. Cadmium exposure induces apoptosis and necrosis of thyroid cells via the regulation of miR-494-3p/PTEN axis[J]. Biol Trace Elem Res, 2024, 202(11): 5061-5070.
[15] XU X H, SUN J M, CHEN X F, *et al*. microRNA-494-3p facilitates the progression of bladder cancer by mediating the KLF9/RGS2 axis[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2022, 38(11): 1070-1079.
[16] 朱坤. miR-494-3p/G6PC 信号轴通过介导自噬调控乳腺癌恶性进展的机制研究[D]. 延吉: 延边大学, 2022.
[17] ZOU F W, TANG Y F, LI X J, *et al*. circ_SMA4 promotes gastrointestinal stromal tumors malignant progression by sponging miR-494-3p/KIT axis and activating JAK/STAT pathway[J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 22004.
[18] TIAN Y M, XU L, LI X, *et al*. SMARCA4: current status and future perspectives in non-small-cell lung cancer[J]. Cancer Lett, 2023, 554: 216022.
[19] QIU G T, TONG W J, JIANG C H, *et al*. Long noncoding RNA WT1-AS inhibit cell malignancy *via* miR-494-3p in glioma[J]. Technol Cancer Res Treat, 2020, 19: 1533033820919759.
[20] LINDNER P, PAUL S, ECKSTEIN M, *et al*. EMT transcription factor ZEB1 alters the epigenetic landscape of colorectal cancer cells[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 147.
[21] WANG Q, LING S Y, LV J, *et al*. Circ-ZEB1 enhances NSCLC metastasis and proliferation by modulating the miR-491-5p/EIF5A axis[J]. Anal Cell Pathol, 2025, 2025: 5595692.
[22] PEREZ-OQUENDO M, MANSHOURI R, TIAN Y H, *et al*. ZEB1 is regulated by K811 acetylation to promote stability, NuRD complex interactions, EMT, and NSCLC metastasis[J]. Mol Cancer Res, 2023, 21(8): 779-794.
[23] SHANG R X, CHEN J K, GAO Y, *et al*. TRIM58 interacts with ZEB1 to suppress NSCLC tumor malignancy by promoting ZEB1 protein degradation *via* UPP[J]. Dis Markers, 2023, 2023: 5899662.
[24] NA T Y, SCHECTERSON L, MENDONSA A M, *et al*. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(11): 5931-5937.
[25] USMAN S, WASEEM N H, NGUYEN T K N, *et al*. Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (EMT) mediated metastasis[J]. Cancers, 2021, 13(19): 4985.

(收稿日期:2024-12-14; 修回日期:2025-11-11; 编辑:张翰林)