



# 大肠癌 LoVo 细胞源外泌体通过传递 pEGFR 促进血管生成的研究\*

程雅洁<sup>1,2)</sup> 周雪彤<sup>1)</sup> 王瑞<sup>3)</sup> 方瑾<sup>1)\*\*</sup>

<sup>(1)</sup> 中国医科大学生命科学学院, 医学细胞生物学教育部重点实验室暨卫生部细胞生物学重点实验室, 细胞生物学教研室, 沈阳 110122;

<sup>2)</sup> 青岛大学附属妇女儿童医院病理科, 青岛 266000; <sup>3)</sup> 中国医科大学基础医学院干细胞与再生医学研究室, 沈阳 110122)

**摘要** **目的** 探讨大肠癌 LoVo 细胞来源的外泌体 (LoVo-Exos) 对肿瘤血管生成的影响, 并探讨其促血管生成的可能分子机制。**方法** 超速离心法提取 LoVo-Exos, 共聚焦显微镜观察其内化进入受体 HUVEC 细胞, 体外管状形成实验分析 LoVo-Exos 对血管生成的影响; 采用小鼠体内基质胶塞实验, 分析 LoVo-Exos 对血管生成的影响。为探讨 LoVo-Exos 促血管生成的分子机制, 蛋白质印迹 (Western blot) 分析 LoVo-Exos 携带磷酸化表皮生长因子受体 (phosphorylated epidermal growth factor receptor, pEGFR) 进入受体细胞。Western blot 及酶联免疫吸附分析 (ELISA) 方法分析 EGFR-ERK 通路关键信号蛋白及下游血管生成核心分子表达情况, 并观察敲减 EGFR 及细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulatory protein kinase, ERK) 抑制剂处理对血管生成的影响。**结果** 共聚焦显微镜观察到 LoVo-Exos 内化进入 HUVEC 内皮细胞; 体外血管生成实验显示, LoVo-Exos 能够显著促进 HUVEC 细胞管状结构的形成。小鼠皮下基质胶塞实验显示, LoVo-Exos 能够促进血管样结构的形成。进一步研究发现, LoVo-Exos 递送 pEGFR 到 HUVEC 中, 激活 EGFR-ERK 通路, 促进血管生成。分析 LoVo-Exos 对下游血管生成核心分子表达的影响, 发现 LoVo-Exos 能够促进 HUVEC 细胞白介素-8 (interleukin-8, IL-8) 的分泌, 敲减 EGFR 后 LoVo-Exos 中 pEGFR 水平降低, 其对 IL-8 分泌的促进作用降低, 且该促进作用能够被 MEK1/2 抑制剂 U0126 抑制。**结论** LoVo-Exos 能够在体内外促进血管生成, 其可能机制为 LoVo-Exos 递送 pEGFR 到 HUVEC 中, 通过 EGFR-ERK 途径上调 IL-8 分泌水平, 从而促进 HUVEC 血管生成能力, 为癌症的转移提供新机制。

**关键词** 外泌体, 血管生成, 表皮生长因子受体, 大肠癌

**中图分类号** R737.9

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0279

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240279

大肠癌是常见的消化道恶性肿瘤。近年来, 大肠癌的发病率不断上升, 已成为世界上的第三大恶性肿瘤, 被认为是全球癌症相关死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。血管生成是肿瘤发生、发展以及转移的重要条件。随着分子和细胞生物学的发展, 各种参与肿瘤血管生成的生物分子如生长因子、趋化因子、黏附因子等逐渐被阐明。基于这些分子的靶向治疗研究已推动抗血管生成治疗成为一种有前途的抗肿瘤治疗策略<sup>[2]</sup>。

外泌体是一种由各种细胞分泌的直径 30~150 nm 的小囊泡, 内含 DNA、mRNA、蛋白质、脂类等生物活性物质, 通过传递这些生物活性物质, 可介导细胞间的通讯<sup>[3]</sup>。大量研究表明, 通过释放外泌体, 肿瘤细胞能够促进肿瘤上皮-间充

质转化、血管生成和免疫逃逸等<sup>[4]</sup>。Wang 等<sup>[5]</sup> 研究报告, 胶质瘤细胞来源的外泌体 miR-148a-3p 通过抑制表皮生长因子受体反馈抑制剂 1 (ERBB receptor feedback inhibitor 1, *ERRF1*) 基因的表达激活表皮生长因子受体 (epithelial growth factor receptor, EGFR) /丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 促进胶质瘤肿瘤血管生成。

EGFR 是一种受体酪氨酸激酶, 配体与 EGFR 结合会激活 EGFR 磷酸化从而导致多种途径的信号

\* 国家自然科学基金 (81672920) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 024-31939077, E-mail: jfang@cmu.edu.cn

收稿日期: 2024-06-30, 接受日期: 2025-01-06

转导, 刺激细胞增殖、血管生成、迁移、生存和黏附<sup>[6-8]</sup>。但是磷酸化EGFR (pEGFR) 是否通过外泌体形式促进大肠癌血管生成目前并无报道。

本研究以LoVo-Exos为研究对象, 发现大肠癌细胞LoVo来源的外泌体可将pEGFR递送到受体细胞HUVEC, 通过EGFR-ERK途径上调白介素-8 (IL-8) 分泌水平, 促进肿瘤血管生成。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物和细胞系

BALB/c小鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司)。大肠癌细胞系LoVo细胞由本实验室细胞库冻存; 人脐带血静脉内皮细胞HUVEC购自ScienCell上海斯信生物科技有限公司。

#### 1.1.2 试剂

兔抗CD81单克隆抗体、兔抗EGFR单克隆抗体、兔抗ALIX单克隆抗体、兔抗pEGFR单克隆抗体、小鼠抗CD31单克隆抗体(Abcam, 美国); 小鼠抗CD63单克隆抗体(Invitrogen, 美国); 小鼠抗ERK单克隆抗体、小鼠抗pERK单克隆抗体(CST, 美国); 小鼠抗 $\beta$ -actin单克隆抗体、小鼠抗GAPDH单克隆抗体、山羊抗小鼠IgG/辣根酶标记、山羊抗兔IgG/辣根酶标记(中杉金桥, 中国); 人IL-8免疫检测试剂盒(R&D, 美国; Novus, 美国); siRNA转染试剂盒(广州锐博生物科技有限公司, 中国); 细胞膜红色荧光染料DID (Life Technologies, 美国); 外泌体分泌抑制剂GW4869 (Adooq Bioscience, 美国); MEK1/2抑制剂U0126 (Glpbio, 美国); Matrigel 基质胶(BD, 美国); ECL超敏发光液(Thermo, 美国); S-P超敏试剂盒、DAB显色试剂盒(迈新, 中国); 水溶性伊红染液、苏木素染液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 中国); 标准胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司, 中国); DMEM培养基、RPMI-1640培养基(GIBCO, 美国); 内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM)(ScienCell, 美国); 胰蛋白酶(Sigma, 美国); 抗生素(青霉素、链霉素)(Amresco, 美国); 一次性滤器(Invitrogen公司, 美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 外泌体的提取

将 $1 \times 10^6$ 个细胞接种于 $10 \text{ cm}^2$ 的培养皿中, 用含10%胎牛血清的培养液培养至汇合度70%, 弃上

清, PBS洗3次, 加入8 ml含10%无外泌体胎牛血清的培养液培养48 h, 收集细胞上清;  $300 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ 离心5 min, 去除细胞及其细胞碎片, 收集上清;  $2\,000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ 离心15 min, 收集上清; 上清经过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤;  $150\,000 \text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ 离心3 h, 弃上清, 根据实验需要用 $100 \mu\text{l}$  PBS重悬外泌体或加入蛋白质裂解液收集外泌体蛋白。

#### 1.2.2 透射电镜负染法检测LoVo-Exos形态

取 $50 \mu\text{l}$ 外泌体悬液, 滴于封口膜上; 将铺有碳膜的铜网浸入外泌体悬液中与样品共孵育15 min; 取出铜网, 用滤纸吸取多余的样品溶液, 适当晾干; 取 $50 \mu\text{l}$ 磷钨酸染液(2%, pH 7.0)滴于封口膜上, 将铜网浸入染液内, 染色30 s; 染色后, 用滤纸吸取多余的染液, 晾干后, 在透射电镜下观察。

#### 1.2.3 纳米颗粒跟踪分析

以去离子水清洗纳米颗粒追踪分析仪的样本池; 用聚苯乙烯微球(110 nm)对仪器进行校准; 用PBS清洗样本池; 用PBS将提取到的外泌体样品稀释10倍, 进样检测, 每个样品至少检测3次。

#### 1.2.4 蛋白质印迹(Western blot)法检测CD81、CD63、ALIX、EGFR、pEGFR、ERK、pERK蛋白表达

外泌体蛋白和细胞蛋白均 $20 \mu\text{g}$ , 经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,  $80 \text{ V}$ 恒压电泳, 待样品进入分离胶后, 升压至 $120 \text{ V}$ ;  $80 \text{ V}$ 恒压, 于 $4^\circ\text{C}$ 湿转120 min; 5%脱脂奶粉-TBS封闭。 $4^\circ\text{C}$ 过夜孵育一抗(CD81、EGFR、ALIX、pEGFR、ERK、pERK稀释浓度为1:1 000, CD63稀释浓度为1:500); 室温孵育二抗2 h(按抗体说明书用封闭液稀释样品, 二抗的稀释浓度为1:5 000), TBST洗涤。化学发光、显影、定影。凝胶图像分析。

#### 1.2.5 共聚焦显微镜观察外泌体内化

超速离心法提取LoVo-Exos, DID标记,  $37^\circ\text{C}$ 孵箱中孵育30 min, 再次经超速离心收集外泌体; 标记后的外泌体和对照组(即单独DID染料经过上述离心操作)加入培养有HUVEC的培养基中, 在 $37^\circ\text{C}$ 培养箱中培养细胞24 h后, 用4%甲醛固定, DAPI(1:1 000稀释)复染细胞核并用荧光显微镜观察。

#### 1.2.6 EGFR敲减实验

siRNA对LoVo细胞EGFR的敲减, EGFR siRNA及NC序列由生工生物工程(上海)有限公

司合成。1×10<sup>5</sup>个LoVo细胞在37℃培养箱中培养12 h至细胞贴壁, PBS洗3次, 加入1 ml无双抗完全培养基继续培养12 h; 稀释siRNA; 制备转染混合液; 将riboFECTTMCP转染复合物加入到无双

抗完全培养基中, 轻轻混匀; 37℃培养箱中培养24 h; Western blot法检测EGFR的表达情况。siRNA序列见表1。

Table 1 Sequences of siRNA

| Gene       | Forward sequences (5'→3') | Reverse sequences (5'→3') |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| NC siRNA   | UUCUCCGAACGUGUCACGUTT     | ACGUGACACGUUCGGAGAATT     |
| EGFR siRNA | GCUAUGAGAUGGAGGAAGAAU     | UCUUCCUCCAUCUCAUAGCUU     |

1.2.7 不同浓度U0126对HUVEC中ERK磷酸化的抑制作用

Western blot检测不同浓度U0126对HUVEC中ERK磷酸化的抑制作用: 将3×10<sup>5</sup>个HUVEC均匀接种于培养皿中, 加入含10%胎牛血清的ECM培养基, 置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中。12 h后, 分别加入0、20、50 μmol/L的U0126, 继续置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱。药物处理12 h后, 收获细胞总蛋白质, 检测不同组别细胞中pERK含量。

1.2.8 LoVo细胞/HUVEC细胞共培养体系中外泌体分泌抑制剂GW4869对HUVEC蛋白表达的影响

将2×10<sup>4</sup>个对数生长期的LoVo细胞接种于Transwell小室上室中, 置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养12 h。去除细胞上清, PBS洗3次。Transwell小室上室中加入10%无外泌体血清的RPMI 1640培养基200 μl, 培养24 h。将1×10<sup>5</sup>个对数生长期的HUVEC细胞接种于下室中, 加入含5%无外泌体胎牛血清的ECM 600 μl。Transwell小室上室中加入10 μmol/L的外泌体分泌抑制剂GW4869, 将Transwell小室移至接种了HUVEC细胞的24孔板上, 置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h。Western blot检测EGFR、pEGFR、ERK、pERK蛋白表达情况。

1.2.9 LoVo-Exos对HUVEC细胞成管能力的影响

实验前一天将Matrigel基质胶铺于24孔板中至凝固; 将对数生长期的LoVo细胞接种于Transwell小室上室中, 置于37℃培养箱中培养12 h, PBS洗3次, 加入10%无外泌体血清的RPMI 1640培养基200 μl, 培养24 h; 将对数生长期的HUVEC细胞接种于下室Matrigel基质胶上, 1%胎牛血清的ECM 600 μl培养, 建立共培养体系。根据实验条件的不同, 在上室中加入10 μmol/L的外泌体分泌抑制剂GW4869, 或在上室中加入EGFR siRNA转染混合液或在接种有HUVEC的下室加入

50 μmol/L U0126。将孔板置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱。共培养6 h后观察并拍照记录结果, 每隔1 h观察一次管状结构形成情况。

为了确定外泌体对HUVEC管状结构生成的影响, 提取LoVo-Exos直接与HUVEC孵育。96孔板每孔滴50 μl Matrigel胶, 37℃温育1 h。将对数生长期的HUVEC细胞接种于Matrigel基质胶上。对照组加入100 μl PBS, LoVo外泌体组加入100 μl (0.3 g/L) LoVo外泌体重悬液。继续在孵箱培养6 h, PBS洗1次, 加入200 μl PBS, 倒置显微镜观察拍照。

1.2.10 小鼠体内基质胶塞血管生成实验

所有动物实验已经过中国医科大学实验动物福利与伦理委员会批准, 伦理审查号: cmu2020048。

外泌体提取: Matrigel基质胶融化; 设置两组实验, 第一组为空白对照组 (500 μl基质胶加入100 μl PBS), 第二组实验组 (500 μl基质胶加入100 μl (0.5 g/L) LoVo-Exos); BALB/c小鼠双后肢皮下注射Matrigel基质胶, 每组3只小鼠, 形成6个基质胶塞; 14 d后对小鼠实施安乐死, 取出基质胶塞, 肉眼观察基质胶塞颜色, HE染色观察血管形态, 免疫组化法检测内皮细胞标志物CD31表达情况。

HE染色观察血管形态: 取出的基质胶塞, 4%多聚甲醛溶液中固定72 h, 梯度酒精脱水透明, 浸蜡包埋, 切成3 μm的薄片, 贴到载玻片上, 65℃烤片1 h; 切片经脱蜡、水化, 流动水冲洗, 苏木精染色, 流动水冲洗, 伊红染色, 流动水冲洗, 脱水、透明, 中性树胶封片后镜检。

免疫组化检测内皮细胞标志物CD31表达情况: 将石蜡包埋切片脱蜡、水化, PBS洗2次, 5 min/次, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温封闭5 min, 蒸馏水洗3次, 5 min/次, 然后进行抗原修复, PBS洗5 min, BSA室温封闭20 min。滴加CD31抗体 (1:200) 于湿盒内4℃下温育过夜, PBS洗3次, 2 min/次; 滴加



生物素化羊抗鼠二抗, 37°C下 20 min, PBS 洗 3 次, 2 min/次, 滴加 SABC 试剂, 37°C下 20 min, PBS 洗 4 次, 5 min/次, 然后进行 DAB 显色试剂盒显色; 蒸馏水洗 3 次, 5 min/次, 然后使用苏木素复染 2 min、盐酸乙醇分化; 脱水、透明、封片、镜检。

### 1.2.11 ELISA检测LoVo-Exos作用下HUVCE细胞的IL-8分泌水平

LoVo 细胞在 37°C 培养箱中培养 12 h 至细胞贴壁, PBS 洗 3 次; 根据实验需要进行分组, LoVo 细胞组 (单独培养 LoVo 细胞中加入 100  $\mu$ l PBS), HUVCE 细胞组 (单独培养 HUVCE 细胞中加入 100  $\mu$ l PBS), 外泌体组 (在培养的 HUVCE 细胞中加入 100  $\mu$ l (0.5 g/L) LoVo-Exos), siEGFR 外泌体组 (在培养的 HUVCE 细胞中加入 100  $\mu$ l (0.5 g/L) LoVo-siEGFR Exos), MEK1/2 抑制剂组 (在培养基中加入 50  $\mu$ mol/L U0126 进行处理); 24 h 后, 收

集上清, 严格按照 ELISA 试剂盒说明检测 IL-8 表达水平。

### 1.3 统计学分析

各组实验数据以平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 通过 SPSS 13.0 软件两两比较采用 Student's *t* 检验, 统计学意义显著性标准设定为  $P<0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 外泌体的提取及鉴定

对超速离心方法提取到的外泌体采用负染透射电镜技术进行观察, 发现 LoVo-Exos 呈典型的杯状囊泡样, 有明显的膜结构 (图 1a)。纳米颗粒跟踪分析显示, LoVo-Exos 的粒径为 60~150 nm, 峰值为 (109.6 $\pm$ 3.2) nm (图 1b)。Western blot 方法检测外泌体相关蛋白的表达情况, 检测到外泌体标志性蛋白分子 CD81、CD63 及 ALIX (图 1c)。提示我们成功提取到了 LoVo 细胞分泌的外泌体。

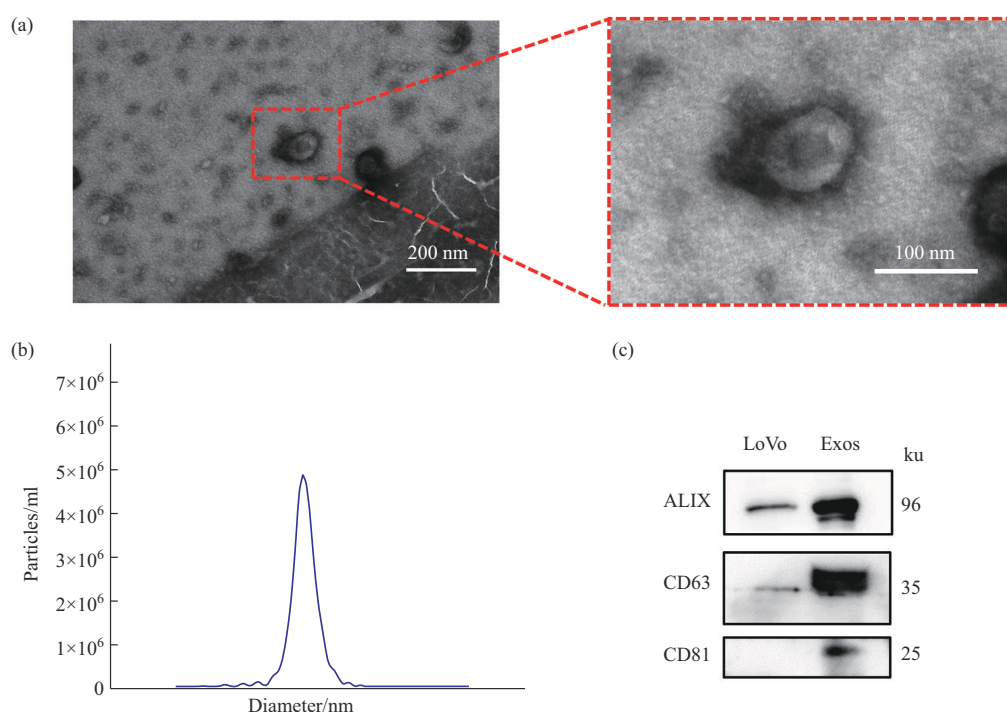


Fig. 1 Characterization of exosomes isolated from LoVo cells

(a) Electron microscopy image of exosomes exacted from LoVo cells (LoVo-Exos). (b) Nanoparticle tracking analysis of the size of LoVo-Exos. (c) Western blot examined the expression of ALIX, CD63 and CD81 in cell lysate of LoVo cell and LoVo-Exos.

### 2.2 LoVo-Exos促进血管生成

共聚焦显微镜的观察结果显示, HUVCE 细胞与 DID 染色的 LoVo-Exos 共孵育 24 h 后, 可见 HUVCE 细胞质中有明显的红色荧光颗粒成分分

布, 而对照组中未见红色荧光, 提示 LoVo-Exos 可以内化的方式进入受体细胞, 并分散于细胞质中 (图 2a)。管状结构形成实验发现, 在 LoVo 细胞与 HUVCE 细胞的共培养体系中, LoVo 细胞显著促进

了HUVEC细胞管的交叉点和节点形成, 加入外泌体分泌抑制剂GW4869后管状结构形成的促进作用降低且差异具有显著性 ( $P<0.01$ ), 单独的外泌体分泌抑制剂GW4869对HUVEC细胞管状结构的生成未见可检测的影响 (图2b~d)。为了进一步验证LoVo-Exos对HUVEC管状结构生成的影响, 提取LoVo-Exos直接与HUVEC细胞孵育, 结果显示LoVo-Exos能够促进HUVEC细胞管的交叉点和节点形成 (图2e~g), 与共培养结果一致, 小鼠体内注入基质胶塞, 肉眼观察可以明显看出加入LoVo-Exos后基质胶塞中形成的血管状结构明显高于PBS组 (图2h), HE染色显示混有LoVo-Exos的基质胶塞中有红细胞填充的微血管存在, CD31免疫组化结果显示, 混有LoVo-Exos基质胶塞中内皮细胞标志物CD31阳性细胞形成的管腔结构显著增多 (图2i), 对CD31免疫组化结果进行平均光密度定量分析, 发现与空白对照PBS组相比, LoVo-Exos的加入显著促进了CD31的表达, 且差异具有显著性 ( $P<0.001$ ) (图2j), 提示LoVo-Exos可促进血管生成。

### 2.3 LoVo-Exos 源性 pEGFR 促进 HUVEC 血管生成

EGFR是一种受体酪氨酸激酶, 其磷酸化激活与血管生成有关, 在肿瘤发生发展中起着至关重要的作用<sup>[9]</sup>。为了明确LoVo细胞是否以外泌体的形式作用于HUVEC细胞, 在共培养体系中加入外泌体分泌抑制剂GW4869。Western blot检测显示, LoVo-Exos中能够检测到pEGFR的表达, 且LoVo细胞与HUVEC细胞共培养后, HUVEC细胞可见明显的pEGFR表达, 进一步加入10  $\mu\text{mol/L}$ 的外泌体分泌抑制剂GW4869, HUVEC细胞中pEGFR明显降低, 提示: 转移性大肠癌LoVo细胞产生的pEGFR能够以外泌体的形式进入HUVEC细胞 (图3a)。对LoVo细胞进行EGFR基因敲减, Western blot检测显示, 敲减EGFR的LoVo细胞及LoVo-Exos中的EGFR及pEGFR水平均降低 (图3b); 管状结构形成实验发现, 在LoVo细胞与HUVEC细胞的共培养体系中, 与NC对照组相比, EGFR敲减后的LoVo细胞对HUVEC管状结构形成的促进作用显著降低 ( $P<0.05$ ) (图3c~e), 提示LoVo-Exos通过携带pEGFR促进血管生成。

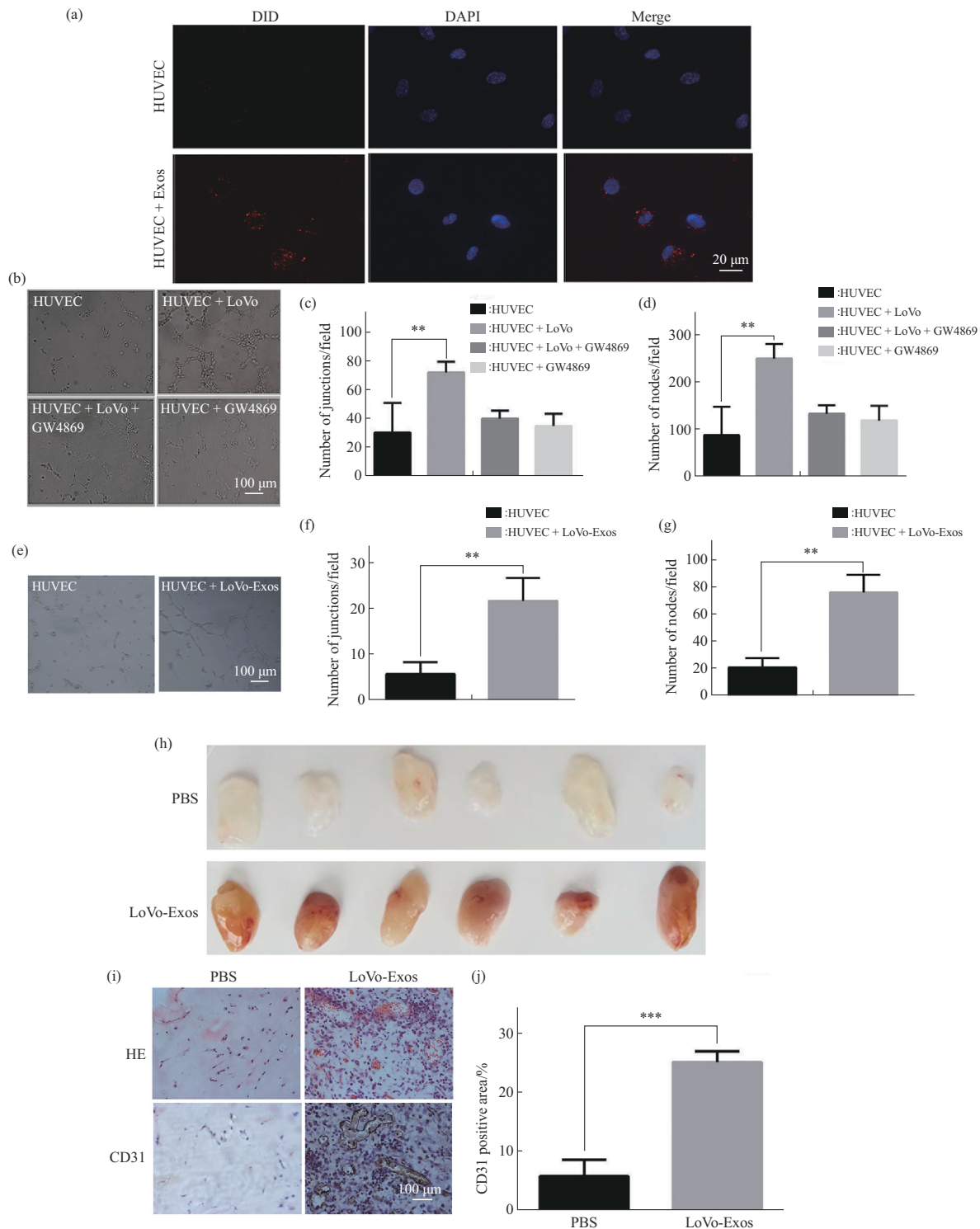
### 2.4 LoVo-Exos 通过递送 pEGFR 激活 EGFR-ERK通路促进血管生成

肿瘤血管网络的延伸需要内皮细胞的增殖和迁

移, 内皮细胞中Raf/MEK/ERK信号通路的激活是其增殖和存活所必需的, 当EGFR被磷酸化激活时, 通过Raf/MEK/ERK通路激活下游信号, 进而调控内皮细胞增殖<sup>[10-11]</sup>。为了检测LoVo-Exos是否通过EGFR-ERK通路调控HUVEC血管生成, 我们检测了HUVEC中EGFR-ERK通路的激活情况, 结果显示, 当HUVEC与LoVo共培养后, 其EGFR、ERK表达水平没有变化, pEGFR、pERK表达量升高, 但是在外泌体分泌抑制剂存在的情况下, HUVEC中pEGFR、pERK表达量的升高被抑制 (图4a), 提示LoVo-Exos中pEGFR激活了HUVEC中EGFR-ERK信号通路。为了进一步验证LoVo-Exos递送pEGFR并诱导HUVEC中EGFR-ERK通路的激活, 我们用LoVo-Exos直接处理HUVEC, 检测HUVEC中pEGFR、pERK表达量, 结果显示, LoVo-Exos处理后, HUVEC中pEGFR、pERK表达量增加 (图4a), 这与共培养处理得到的结果一致, 表明LoVo-Exos递送pEGFR, 激活HUVEC中EGFR-ERK通路。为了进一步确认HUVEC中EGFR-ERK通路的阻断对其管状结构形成能力的影响, 我们首先用不同浓度的ERK1/2抑制剂U0126处理HUVEC, U0126是高效的选择性的MEK/ERK抑制剂, 能与MAPK激酶MEK非竞争性结合, 阻断ERK的活化, 结果显示, 50  $\mu\text{mol/L}$ 的U0126能够显著抑制HUVEC中pERK表达 (图4b)。接下来, 我们检测了在50  $\mu\text{mol/L}$  U0126作用下, LoVo-Exos对HUVEC的管状结构形成能力的影响。结果显示, 在LoVo细胞与HUVEC细胞的共培养体系中, 与未经U0126处理相比, 经过U0126处理的HUVEC管状结构形成能力显著降低 ( $P<0.001$ ) (图4c~e), 提示LoVo-Exos作用下的HUVEC的管状结构形成以EGFR-ERK依赖性途径被调节。

### 2.5 LoVo-Exos通过EGFR-ERK依赖性途径调节 HUVEC的IL-8分泌

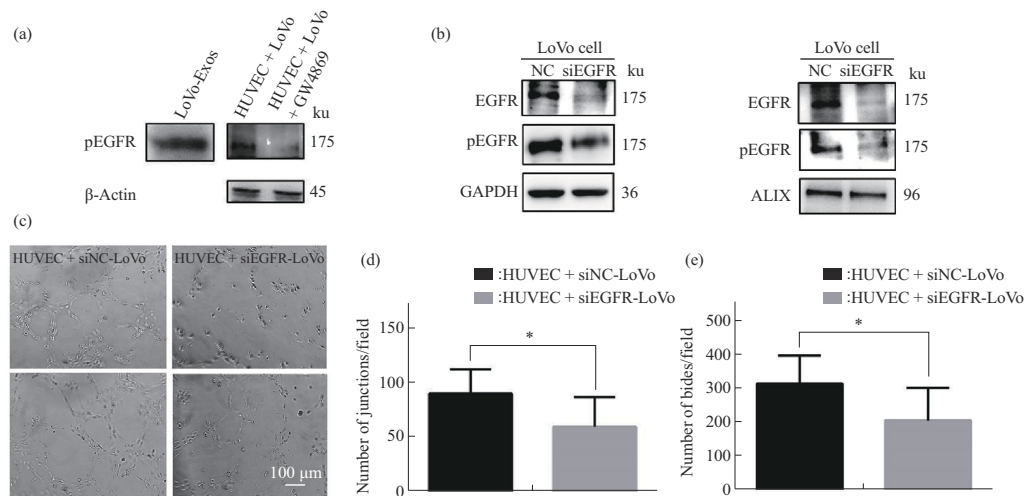
血管生成是由促血管生成因子触发的, 血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 最初被认为是血管通透性因子, 是最有效的血管生成诱导剂之一, 与肿瘤进展、血管密度增加、侵袭、转移和肿瘤复发有关<sup>[12]</sup>。为此, 我们首先检测了在LoVo-Exos作用下HUVEC细胞VEGF分泌水平的变化, 发现LoVo-Exos对HUVEC细胞的VEGF表达及分泌没有明显影响 (结果未列出)。除了VEGF, IL-8也是重要的血管



**Fig. 2** LoVo-Exos promotes angiogenesis *in vitro* and *in vivo*

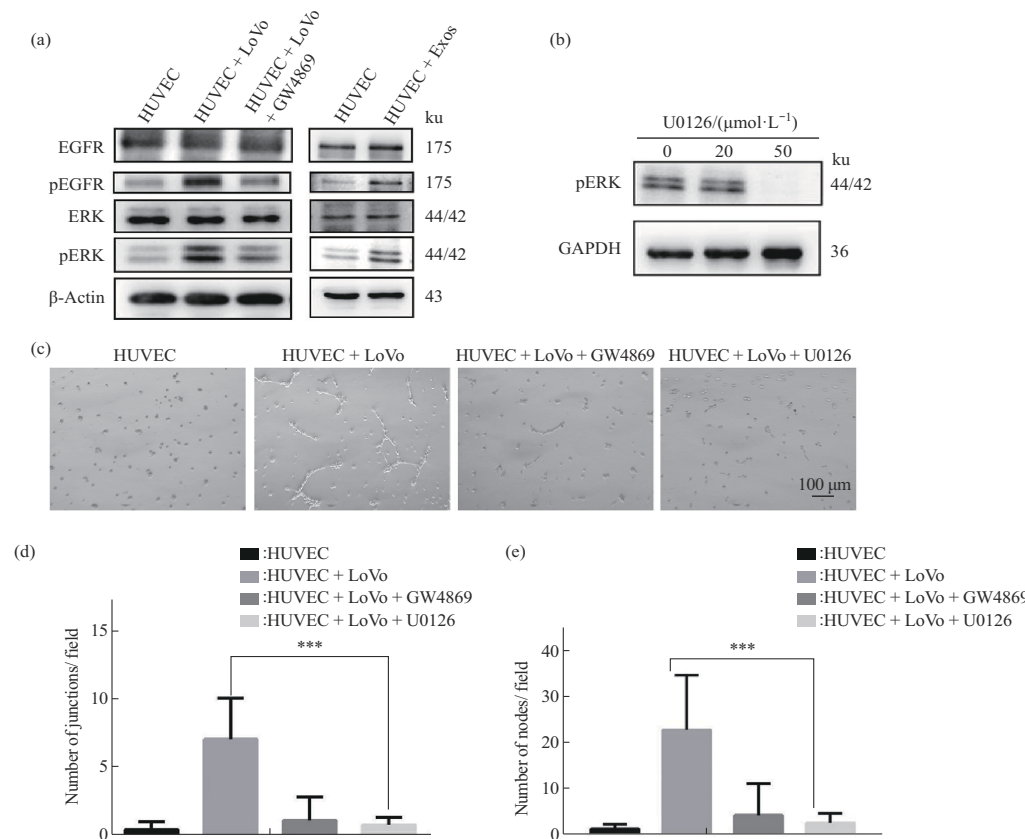
(a) Image of DID-stained exosome from LoVo cells transfer to HUVEC cells. (b–d) The tube formation assay analyzed the angiogenic ability of HUVEC cells co-cultured with LoVo cell pre-treated with or without exosome release inhibitor GW4869 for 6 h. (b) Representative micrographs of tube formation assay. (c) Quantitative analysis of the number of junctions by ImageJ. (d) Quantitative analysis of the number of nodes by ImageJ. (e–g) The tube formation assay analyzed the angiogenic ability of HUVEC cells treated with LoVo-Exos directly. (e) Representative micrographs of tube formation assay. (f) Quantitative analysis of the number of junctions by ImageJ. (g) Quantitative analysis of the number of nodes by ImageJ. (h–j) The matrix plug assay analyzed the angiogenic ability of LoVo-Exos in BALB/c mice. 100  $\mu\text{l}$  (0.5 g/L) LoVo-Exos were mixed with 500  $\mu\text{l}$  Matrigel and injected into the subcutaneous. After 14 d, the Matrigel plugs were removed and histological staining was performed. (h) Representative photographs of harvested matrigel plugs. (i) HE stained the plug section and immunohistochemistry analysis of CD31. (j) Quantitative analysis of CD31+ signals by ImageJ. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .





**Fig. 3 LoVo-Exos transmit pEGFR to HUVEC cells and promotes angiogenesis**

(a) Western blot analyzed the expression of pEGFR in LoVo-Exos or HUVEC co-cultured with LoVo cell pre-treated with or without exosome release inhibitor GW4869. (b) Western blot analyzed the expression of EGFR and pEGFR in LoVo and LoVo-Exos after LoVo cell treated with EGFR siRNA. (c-e) The tube formation assay analyzed the angiogenic ability of HUVEC co-cultured with siEGFR-LoVo. (c) Representative micrographs of tube formation assay. (d) Quantitative analysis of the number of junctions by ImageJ. (e) Quantitative analysis of the number of nodes by ImageJ. \* $P<0.05$ , compared with Ctrl group. NC: siRNA negative control.

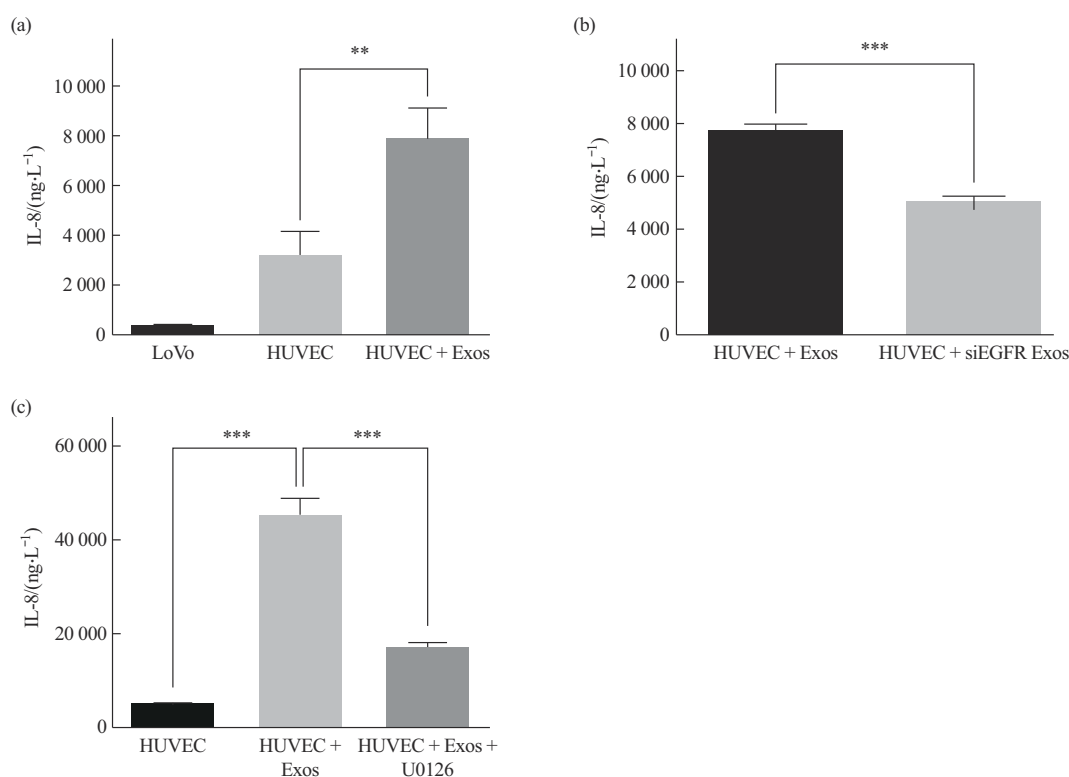


**Fig. 4 LoVo-Exos transmit pEGFR to HUVEC cells and promote angiogenesis by activating the EGFR-ERK pathway**

(a) Western blot analyzed the expression of EGFR, pEGFR, ERK and pERK in HUVEC, HUVEC co-cultured with LoVo cell pre-treated with or without exosome release inhibitor GW4869 or HUVEC co-cultured with LoVo-Exos. (b) Western blot analyzed the expression of pERK in HUVEC with different concentrations of U0126. (c, d) The tube formation assay analyzed the angiogenic ability of HUVEC co-cultured with LoVo cell. LoVo cell pre-treated with exosome release inhibitor GW4869 or LoVo cell pre-treated with ERK1/2 inhibitors U0126. (c) Representative micrographs of tube formation assay. (d) Quantitative analysis of the number of junctions by ImageJ. (e) Quantitative analysis of the number of nodes by ImageJ. \*\*\* $P<0.001$ .

生成因子,通过与细胞表面的受体结合,促进细胞的增殖以及新生血管的形成,从而促进肿瘤的生长和转移<sup>[13]</sup>。为此,我们采用ELISA法检测了LoVo-Exos对HUVEC细胞IL-8分泌的影响,结果(图5a)显示:加入LoVo-Exos后HUVEC细胞IL-8的分泌量显著增强,与单独的HUVEC细胞相比差异有统计学意义( $P<0.01$ )。但LoVo细胞本身IL-8分泌量较低,LoVo-Exos可能不直接传递IL-8进入内皮细胞。为了明确LoVo-Exos是否通过携带pEGFR影响IL-8的分泌,我们检测了LoVo-siEGFR Exos对HUVEC的IL-8分泌水平的影响,

结果(图5b)显示:与加入LoVo-Exos相比加入LoVo-siEGFR Exos后HUVEC的IL-8分泌量显著降低。为了确认EGFR-ERK通路与下游IL-8之间的联系,我们用MEK1/2抑制剂U0126对HUVEC进行预处理,进而检测U0126作用下,LoVo-Exos对HUVEC的IL-8分泌水平的影响。结果显示,LoVo-Exos作用于HUVEC后,与未经U0126处理相比,经过50  $\mu\text{mol/L}$  U0126处理的HUVEC的IL-8分泌水平明显下降( $P<0.001$ )(图5c),提示LoVo-Exos作用下的HUVEC的IL-8分泌以EGFR-ERK依赖性途径被调节。



**Fig. 5 LoVo-Exos regulates IL-8 secretion of HUVEC via an EGFR-ERK-dependent pathway**

(a) ELISA analyzed the secretion of IL-8 in HUVEC pre-treated with or without LoVo-Exos. (b) ELISA analyzed the secretion of IL-8 in HUVEC pre-treated with LoVo-Exos and LoVo-siEGFR Exos. (c) ELISA analyzed the secretion of IL-8 in HUVEC pre-treated with LoVo-Exos and ERK1/2 inhibitors U0126. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

### 3 讨 论

外泌体作为细胞间通讯的载体,能够携带蛋白质、mRNA、非编码RNA和DNA转移到受体细胞,进而改变细胞的微环境。越来越多的证据表明,外泌体在肿瘤的血管生成中发挥了重要的作用<sup>[14-15]</sup>,但是外泌体对血管生成促进作用的详细机制仍不明确。本文以LoVo-Exos为研究对象,探讨

其对血管生成的影响。

EGFR是一种酪氨酸激酶受体,在多种类型的癌症中过度表达。近年来对EGFR与肿瘤的血管生成、侵袭性及转移关系的研究越来越多,很多研究提示了高度相关性的存在<sup>[16]</sup>。Song等<sup>[17]</sup>研究表明,肿瘤细胞来源的外泌体通过膜融合将pEGFR转移到单核细胞,并激活单核细胞下游MAPK(Ras-Raf-MEK-ERK)信号通路,延长单核细胞存



活期。原始血管网络的延伸需要内皮细胞的增殖和迁移, 激活内皮细胞的Ras-Raf-MEK-ERK信号级联是其增殖和生存的必要条件, 已有研究表明当EGFR被激活时, Ras-Raf-MEK-ERK通路会传输下游信号, 从而调控内皮增殖, 促进血管生成<sup>[18]</sup>。为了检测LoVo-Exos是否通过激活EGFR-ERK通路促进血管生成, 我们对LoVo-Exos处理后的HUVEC中相关蛋白质及血管生成情况进行检测。发现, LoVo-Exos可通过递送pEGFR促进血管生成, 敲减EGFR的LoVo-Exos促进血管生成能力降低, MEK1/2抑制剂阻断了LoVo-Exos对血管生成的促进作用。这表明, LoVo-Exos通过激活HUVEC中EGFR-ERK通路, 促进血管生成。

VEGF是目前所知最有效的、直接作用的血管生成素蛋白, 是主要的促血管生成因子。大量证据表明, EGFR途径的激活能够增加VEGF的产生, 从而促进血管生成<sup>[12]</sup>。但是, 本实验对LoVo-Exos作用下HUVEC细胞VEGF的表达水平进行了检测, 并没有发现LoVo-Exos作用于HUVEC细胞后HUVEC细胞VEGF的分泌水平发生改变。Yang等<sup>[19]</sup>的一项研究发现, 在体内外, 富含epiregulin (EGF家族的一员) 的外泌体增强了涎腺腺样囊性癌和肺血管内皮细胞中VEGF、成纤维细胞生长因子2 (fibro-blast growth factor 2, FGF-2) 和IL-8的表达, 从而促进了血管生成。尽管VEGF在调节生理性血管生成过程中的关键事件方面的独特性和不可或缺性已被证明, 但一些其他的生长因子也能够有效地增强血管生成的活性, 甚至是在血管生成过程中的特定步骤中发挥作用<sup>[20]</sup>。IL-8属于趋化因子超家族中的一个成员, 在炎症反应中起重要作用, 同时它也是促血管生成因子, 与肿瘤血管新生、生长以及肿瘤的侵袭转移有密切关系。因此, 我们检测了促血管生成因子IL-8的表达水平。已有证据表明EGFR-ERK通路的激活可以上调细胞自身IL-8的分泌水平<sup>[21]</sup>。但是, 结直肠癌外泌体携带的EGFR对受体细胞IL-8表达的影响还未见研究。本研究对LoVo-Exos作用下的HUVEC中EGFR-ERK通路蛋白和IL-8分泌水平进行检测, 发现LoVo-Exos激活HUVEC中EGFR-ERK通路并上调IL-8分泌水平, 但是MEK1/2抑制剂阻断了LoVo-Exos对IL-8的上调, 表明LoVo-Exos作用下的HUVEC的IL-8分泌以EGFR-ERK依赖性途径被调节。有报道显示, IL-8可通过与其受体趋化因子受体1 (C-X-C chemokine receptor 1, CXCR1) 或

CXCR2结合激活下游信号通路, IL-8与CXCR1/2结合后, 可激活第一信使磷脂酰肌醇3激酶或磷酸酶C以及第二信使蛋白激酶B、蛋白激酶C等分子, 进而激活下游信号通路, 促进肿瘤的发生、发展。在本研究中IL-8是否通过其受体CXCR1或CXCR2结合激活下游信号通路还有待探讨。本研究发现LoVo-Exos能够上调IL-8分泌促进血管生成。近年来基于免疫检查点抑制剂的免疫疗法在癌症治疗中取得革命性进步, 许多临床研究表明, 对免疫检查点抑制剂治疗敏感的患者血清IL-8水平较基线水平有所降低, 而无反应者IL-8水平增加, 因此IL-8浓度下降可作为判断免疫检查点抑制剂治疗有效的标志<sup>[13]</sup>。随着肿瘤免疫治疗的兴起以及IL-8在肿瘤免疫应答中作用的揭示, IL-8在肿瘤免疫治疗中的作用越来越受到重视, 为癌症包括大肠癌的治疗提供新的选择。

综上所述, 本文通过体内外血管生成实验均证明了LoVo-Exos对血管生成具有促进作用。阐明了一种新的机制, LoVo-Exos可通过传递pEGFR至HUVEC, 并激活EGFR-ERK通路从而促进HUVEC中促血管生成因子IL-8的分泌进而促进血管生成。这种以外泌体形式进行的沟通, 介导了大肠癌细胞和内皮细胞间的通讯, 并为大肠癌的抗血管治疗提供了指导方向。

## 4 结 论

大肠癌LoVo细胞源外泌体能够促进血管生成, 其可能机制为LoVo-Exos递送pEGFR到HUVEC中, 通过EGFR-ERK通路上调IL-8分泌水平, 从而促进HUVEC血管生成能力, 为癌症的转移提供新机制。

## 参 考 文 献

- [1] Baidoun F, Elshiw Y, Elkeriaie Y, *et al.* Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes. *Curr Drug Targets*, 2021, **22**(9): 998-1009
- [2] Liu Z L, Chen H H, Zheng L L, *et al.* Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, **8**(1): 198
- [3] Jo H, Shim K, Jeoung D. Exosomes: diagnostic and therapeutic implications in cancer. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(5): 1465
- [4] Liu Y, Shi K, Chen Y, *et al.* Exosomes and their role in cancer progression. *Front Oncol*, 2021, **11**: 639159
- [5] Wang M, Zhao Y, Yu Z Y, *et al.* Glioma exosomal microRNA-148a-3p promotes tumor angiogenesis through activating the EGFR/MAPK signaling pathway via inhibiting ERRFI1. *Cancer Cell Int*,

- 2020, **20**: 518
- [6] Sabbah D A, Hajjo R, Sweidan K. Review on epidermal growth factor receptor (EGFR) structure, signaling pathways, interactions, and recent updates of EGFR inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 2020, **20**(10): 815-834
- [7] Liang Y, Zhang T, Jing S, *et al.* 20(S)-ginsenoside RG3 inhibits lung cancer cell proliferation by targeting EGFR-mediated RAS/RAF/MEK/ERK pathway. *Am J Chin Med*, 2021, **49**(3): 753-765
- [8] Gekle M, Dubourg V, Schwerdt G, *et al.* The role of EGFR in vascular AT1R signaling: from cellular mechanisms to systemic relevance. *Biochem Pharmacol*, 2023, **217**: 115837
- [9] Rajakumar T, Pugalandhi P. Allyl isothiocyanate inhibits invasion and angiogenesis in breast cancer *via* EGFR-mediated JAK-1/STAT-3 signaling pathway. *Amino Acids*, 2023, **55**(8): 981-992
- [10] Zhu S, Wang H, Zhang Z, *et al.* IGFBP-rP1-silencing promotes hypoxia-induced angiogenic potential of choroidal endothelial cells *via* the RAF/MEK/ERK signaling pathway. *Mol Med Rep*, 2020, **22**(6): 4837-4847
- [11] Lin S, Jiang X, Zhang G, *et al.* The Chinese herbal formula ruyan neixiao cream inhibits angiogenesis of precancerous breast lesions *via* regulation of Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway. *Integr Cancer Ther*, 2022, **21**: 15347354211069397
- [12] Ghalehbandi S, Yuzugulen J, Pranjol M Z I, *et al.* The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. *Eur J Pharmacol*, 2023, **949**: 175586
- [13] Fousek K, Horn L A, Palena C. Interleukin-8: a chemokine at the intersection of cancer plasticity, angiogenesis, and immune suppression. *Pharmacol Ther*, 2021, **219**(3): 107692
- [14] Duan S L, Fu W J, Jiang Y K, *et al.* Emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in tumor-associated angiogenesis of tumor microenvironment. *Front Mol Biosci*, 2023, **10**: 1220193
- [15] 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
- [16] Frawley T, Piskareva O. Extracellular vesicle dissemination of epidermal growth factor receptor and ligands and its role in cancer progression. *Cancers (Basel)*, 2020, **12**(11): 3200
- [17] Song X, Ding Y, Liu G, *et al.* Cancer cell-derived exosomes induce mitogen-activated protein kinase-dependent monocyte survival by transport of functional receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 2016, **291**(16): 8453-8464
- [18] Bhattacharya D, Chaudhuri S, Singh M K, *et al.* T11TS inhibits Angiopoietin-1/Tie-2 signaling, EGFR activation and Raf/MEK/ERK pathway in brain endothelial cells restraining angiogenesis in glioma model. *Exp Mol Pathol*, 2015, **98**(3): 455-466
- [19] Yang W W, Yang L Q, Zhao F, *et al.* Epiregulin promotes lungmetastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. *Theranostics*, 2017, **7**(15): 3700-3714
- [20] Delle Monache S, Cortellini A, Parisi A, *et al.* Expression of pro-angiogenic factors as potential biomarkers in experimental models of colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2020, **146**(6): 1427-1440
- [21] Zhang Y, Wang L, Zhang M, *et al.* Potential mechanism of interleukin-8 production from lung cancer cells: an involvement of EGF-EGFR-PI3K-Akt-Erk pathway. *J Cell Physiol*, 2012, **227**(1): 35-43

## Promotion of Angiogenesis by Colorectal Cancer Cell LoVo Derived-exosomes Through Transferring pEGFR\*

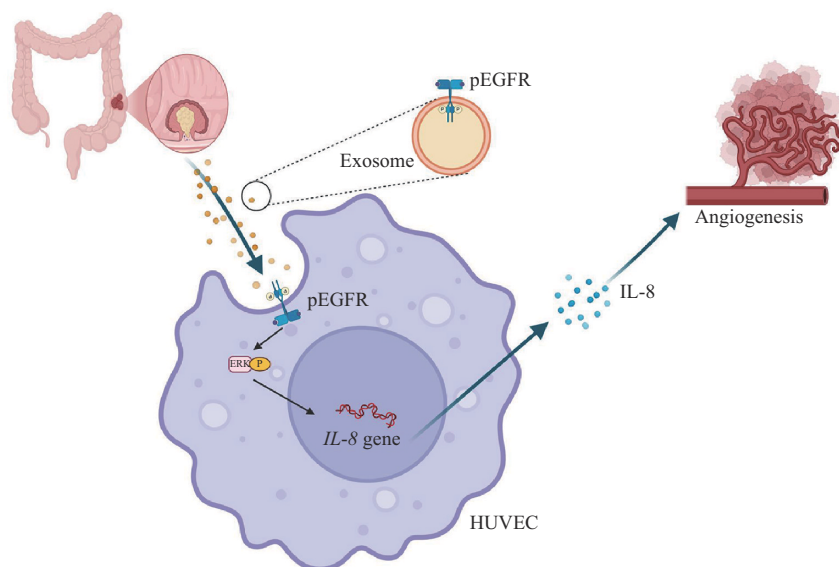
CHENG Ya-Jie<sup>1,2)</sup>, ZHOU Xue-Tong<sup>1)</sup>, WANG Rui<sup>3)</sup>, FANG Jin<sup>1)\*\*</sup>

<sup>(1)</sup>Department of Molecular Cell Biology, Key Laboratory of Medical Cell Biology, Ministry of Education, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, School of Life Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China;

<sup>2)</sup>Department of Pathology, Women and Children's Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266000, China;

<sup>3)</sup>Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, School of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110122, China)

### Graphical abstract



**Abstract Objective** This study sought to investigate the impact of exosomes derived from LoVo cells (LoVo-Exos) in colorectal cancer (CRC) on tumor angiogenesis, as well as to elucidate the potential molecular mechanisms underlying their pro-angiogenic effects. **Methods** LoVo-Exos were isolated *via* ultracentrifugation, and their internalization into recipient human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was visualized using confocal microscopy. The influence of LoVo-Exos on angiogenesis was assessed through an *in vitro* tube formation assay. Additionally, the pro-angiogenic effects of LoVo-Exos were evaluated *in vivo* using a matrix gluing assay in mice. To investigate the molecular mechanisms through which LoVo-Exos facilitate angiogenesis, Western blot analysis was employed to examine the transfer of pEGFR by LoVo-Exos into recipient cells. Both Western blot and ELISA were utilized to assess the expression levels of key signaling proteins within the EGFR-ERK pathway, as well as the expression of downstream angiogenic core molecules. Furthermore, the impact of

\* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81672920).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-24-31939077, E-mail: jfang@cmu.edu.cn

Received: June 30, 2024 Accepted: January 6, 2025



EGFR knockdown and ERK inhibitor treatment on angiogenesis was evaluated, with subsequent analysis of the expression of downstream angiogenic core molecules following these interventions. **Results** Confocal microscopy demonstrated the internalization of LoVo-Exos into HUVECs. *In vitro* angiogenesis assays further indicated that LoVo-Exos significantly enhanced the formation of tubular structures in HUVECs. Additionally, macroscopic examination of subcutaneous matrix plug formation in mice revealed a substantial increase in vascular-like structures within the matrix plugs following the administration of LoVo-Exos, compared to the PBS control group. Hematoxylin and eosin (HE) staining revealed the presence of erythrocyte-filled microvessels within the matrix plugs combined with LoVo-Exos. Furthermore, immunohistochemical analysis demonstrated the expression of the endothelial cell marker CD31 in these matrix plugs. The presence of CD31-positive cells in the LoVo-Exos-treated matrix plugs was associated with a significant enhancement in the formation of luminal structures. These findings suggest that LoVo-Exos facilitate the *in vivo* development of vascular-like structures. Subsequent investigations demonstrated that LoVo-Exos facilitated the delivery of pEGFR to HUVEC, thereby enhancing angiogenesis. Conversely, LoVo-Exos with EGFR knockdown exhibited a diminished capacity to promote angiogenesis, an effect that was further attenuated by the ERK phosphorylation inhibitor U0126. Western blot analysis assessing the activation of the EGFR-ERK signaling pathway in HUVEC indicated that LoVo-Exos augmented angiogenesis through the activation of this pathway. Furthermore, analysis of the impact of LoVo-Exos on the expression of downstream angiogenic core molecules revealed an increase in interleukin-8 (IL-8) secretion in HUVEC. The enhancement observed was diminished in LoVo-Exos following EGFR knockdown, and this reduction was counteracted by the ERK phosphorylation inhibitor U0126. **Conclusion** The underlying mechanism may involve the delivery of pEGFR in LoVo-Exos to HUVECs, leading to increased IL-8 secretion *via* the EGFR-ERK signaling pathway, thereby enhancing the angiogenic potential of HUVECs. This finding may offer new insights into the mechanisms underlying cancer metastasis.

**Key words** exosome, angiogenesis, EGFR, colorectal cancer

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0279

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240279