DOI:10.16016/j.2097-0927.202208227

# CPNE3 调控非小细胞肺癌细胞增殖、迁移、侵袭及其相关机制研究

蔡 馨,刘泽毅,黄建安 215006 江苏 苏州,苏州大学附属第一医院呼吸与危重症医学科,苏州大学呼吸疾病研究所

[摘要] **目的** 探讨 CPNE3 对非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)细胞株 A549 增殖、迁移和侵袭能力的影响及其作用机制。**方法** 通过癌症和肿瘤基因图谱(the cancer genome atlas,TCGA)的公共数据分析 CPNE3 在 NSCLC 中的表达及其与患者预后的关系。利用 Western blot 方法检测 CPNE3 在正常支气管上皮细胞株 BEAS-2B 和肺癌细胞株中的表达。在 A549 细胞中转染 CPNE3 的干扰序列,利用 CCK-8、克隆形成、Transwell 实验检测细胞增殖、迁移和侵袭能力,Western blot 法检测下游增殖、转移相关蛋白水平的变化。构建 CPNE3 过表达稳转细胞株,取 10 只雌性 BALB/c nude 小鼠分为对照组和过表达 CPNE3 组($n=5$),构建裸鼠皮下移植瘤模型,观察过表达 CPNE3 对 A549 细胞成瘤能力的影响。**结果** NSCLC 组织中 CPNE3 表达升高($P<0.05$),其高表达与患者的不良预后相关($P<0.01$),CPNE3 在肺癌细胞株中表达升高($P<0.01$),干扰 CPNE3 后细胞的增殖能力、克隆形成能力下降($P<0.001$,$P<0.01$),迁移和侵袭能力下降($P<0.01$,$P<0.01$),并伴随着 p-AKT、p-ERK 和 p-EGFR 蛋白的下调($P<0.001$,$P<0.001$,$P<0.01$)。过表达 CPNE3 在体内促进移植瘤的生长($P<0.001$),并伴随着 p-AKT、p-ERK 和 p-EGFR 蛋白的上调($P<0.05$,$P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 干扰 CPNE3 可以抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,过表达 CPNE3 可以增强 A549 细胞在体内的增殖能力,其作用机制与 EGFR 信号通路及其下游的 AKT/ERK 信号通路相关。

[关键词] CPNE3;增殖;迁移;侵袭;非小细胞肺癌

[中图法分类号] R341; R730.23; R734.2 [文献标志码] A

# Mechanism of CPNE3 regulating proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer cells

CAI Xin, LIU Zeyi, HUANG Jian'an Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Institute of Respiratory Diseases, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu Provmce, 215006, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of CPNE3 on the proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line A549 and its underlying mechanism. **Methods** The expression of CPNE3 in NSCLC and its relationship with prognosis were analyzed based on the data from the cancer genome atlas (TCGA) database. Western blotting was used to detect the expression of CPNE3 in normal bronchial epithelial cell line BEAS-2B and lung cancer cell lines. The si-RNAs of CPNE3 were transfected into A549 cells. The abilities of cell proliferation, migration and invasion were detected by CCK-8 assay, colony formation assay, and Transwell assay, respectively, and the expression levels of downstream proteins related to proliferation and metastasis were detected by Western blotting. After the A549 cells with stable overexpression of CPNE3 were established, the cells with overexpression or not were respectively employed to construct lung carcinoma xenograft model in female BALB/c nude mice ($n=5$ for control and overexpression mice, respectively). Then the tumor growth was observed to determine the effect of CPNE3

[基金项目] 江苏省卫生健康委科研面上项目(H2019030);江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX22_3220)

[通信作者] 黄建安,E-mail:huang_jian_an@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议( )

overexpression on the tumorigenicity of A549 cells. **Results** The expression of CPNE3 was increased in NSCLC tissues ($P<0.05$), and its high expression was correlated with poor prognosis ($P<0.01$). Consistently, the expression of CPNE3 was increased in lung cancer cell lines ($P<0.01$). After the knockdown of CPNE3, the proliferation and colony formation ($P<0.001$, $P<0.01$), and migration and invasion abilities ($P<0.01$, $P<0.01$) were significantly inhibited in A549 cells, accompanied with decreased phosphorylation levels of AKT, ERK, and EGFR ($P<0.001$, $P<0.001$, $P<0.01$). Overexpression of CPNE3 promoted cell proliferation *in vivo* ($P<0.001$), and upregulated phosphorylation of AKT, ERK, and EGFR ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Knocking CPNE3 down can inhibit the proliferation, migration and invasion of A549 cells, while its overexpression can promote the proliferation ability of A549 cells *in vivo*, which may be related to EGFR signaling pathway and downstream AKT/ERK signaling pathway.

[**Key words**] CPNE3; proliferation; migration; invasion; lung cancer; non-small cell lung cancer

Supported by the General Project of Scientific Research from Jiangsu Health Commission (H2019030) and the Project of Postgraduate Scientific Research and Practice Innovation Plan of Jiangsu Province (KYCX22_3220). Corresponding author: HUANG Jian'an, E-mail: huang_jian_an@163.com.

肺癌在全世界范围内是导致癌症相关死亡的最主要病因,2020 年全世界约有 180 万人死于肺癌[1]。根据临床组织病理分型,肺癌患者中约 85%被诊断为非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)[2]。近年来,肺癌的诊疗工作获得了长足的进步,靶向治疗和免疫治疗的应用显著提高了晚期 NSCLC 的治疗效果,但 NSCLC 患者总体的生存及预后仍未见明显改善,最新统计数据显示肺癌患者的预计 5 年生存率仅 21%[3-4]。因此,进一步寻找影响 NSCLC 增殖和转移的关键分子并探究其分子机制对于寻找新的药物靶点、提高疗效和改善患者预后都有十分重要的作用。

CPNE3 是钙依赖性的膜结合蛋白家族——Copines 中的一员,在各种组织和器官中普遍表达。结构上,CPNE3 在其 N-端包含两个串联 C2 结构域,作为钙依赖性磷脂结合基序,参与细胞信号传导或膜泡运输;在其 C-端包含的 A 结构域发挥蛋白结合结构域的作用[5]。从作用机制来讲,CPNE3 表现出激酶活性,可以磷酸化 H1 组蛋白和碱性磷脂蛋白,激活下游信号通路,从而发挥生物学功能[6]。CPNE3 在多种癌症中发挥的作用已被证实,但 CPNE3 在 NSCLC 中发挥作用的具体分子机制仍有待进一步研究。因此,本研究旨在通过体外细胞实验和体内动物实验两个方面探索 CPNE3 在 NSCLC 中发挥的作用及其具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

Lipofectamine 2000 转染试剂(Thermo Fisher Scientific 公司);CPNE3 干扰序列(苏州吉玛基因股份有限公司);CCK-8 试剂(碧云天公司);RPMI-1640 培养基(Hy-clone 公司);胎牛血清(Gibco 公司);结晶紫染液(上海生工公司);CPNE3、β-actin 抗体(Proteintech 公司)、p-AKT、AKT、p-ERK、ERK、p-EGFR、EGFR 抗体(CST 公司);山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG(北京康为世纪生物科技有限公司);空白对照和过表达 CPNE3 慢病毒(上海吉凯公司)。

### 1.2 细胞培养

人肺癌细胞株(A549、H1299、H460、H520)和正常支气管上皮细胞株(BEAS-2B)均从上海中国科学院细胞库购买。细胞均在含有 10% FBS 和 1% 双抗(100 U/mL 青-链霉素)的 RPMI-1640 的完全培养基中、37 ℃、5% $CO_2$ 条件下恒温培养。

### 1.3 瞬时转染

将 A549 细胞接种在 6 孔板中,当细胞密度达到 40%~60%时,按照 Lipofectamine 2000 转染试剂说明书进行转染。48~72 h 后,收集细胞用于进一步实验。CPNE3 的干扰序列如下:si-CPNE3-1 siRNA:5′-GGGACUGGUCAUUCAAGAUTT-3′; si-CPNE3-2 siRNA:5′-GCAAUGGAAUCCAAGGCAUTT-3′。

### 1.4 CCK-8 法检测细胞实验

将 A549 细胞以每孔 $3\times10^3$ 个细胞的密度接种在 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,分别在铺板后 24、48、72 h 加入 10 μL CCK-8 试剂,继续放到培养箱中培养 2 h,然后用酶标仪测定细胞在 450、630 nm 的吸光度(OD 值)。

### 1.5 克隆形成实验

将 A549 细胞以 $1\times10^3$/mL 的密度接种于小皿中,摇匀后放入培养箱培养,5~7 d 后显微镜下观察,待每个细胞克隆含有约 10~15 个细胞数时,取出培养皿,PBS 洗涤后甲醇固定 30 min,再用结晶紫染色 2 h,使用相机拍照并计数。

### 1.6 Transwell 实验

将 A549 细胞接种在 6 孔板中,转染 48 h,待细胞密

度达到90%,消化细胞并使用含1% FBS的培养基重悬细胞,进行细胞计数。向基质胶包被的小室上室中加入200 μL含$6\times10^4$细胞的细胞悬液,向无基质胶的小室上室加入200 μL含$3\times10^4$细胞的细胞悬液,下室均加入800 μL完全培养基。培养24 h,取出小室,PBS洗涤后甲醇固定30 min,再用结晶紫染色2 h,用棉棒轻轻擦去上室表面细胞,于显微镜下观察拍照并计数。

### 1.7 Western blot实验

在A549细胞中瞬时转染干扰序列后,使用RIPA法提取细胞总蛋白。以每孔50 μg蛋白样品量加样,用湿转法将蛋白转至NC膜上,4 ℃过夜孵育一抗,次日TBST洗4次,每次5 min,室温孵育二抗2 h,TBST洗4次,每次5 min,显影液孵育数秒后,使用化学发光成像仪检测蛋白表达。

### 1.8 动物模型实验

选用4~6周龄,体质量16~20 g的雌性BALB/c nude小鼠10只(由上海斯莱克实验动物有限公司提供,批号:0051246)。在A549细胞中使用慢病毒侵染细胞构建CPNE3的过表达稳转细胞株。培养对照组和CPNE3过表达细胞株,待细胞处于对数生长期时消化,离心后使用无血清的培养基重悬。计数并调整细胞浓度为$4\times10^6$/50 μL,取等体积的基质胶混合,随后迅速置于冰上备用。在无菌条件下吹打细胞混匀,随后用1 mL胰岛素注射器分别吸取100 μL细胞混悬液接种于裸鼠的两侧肋下,使其成为一皮丘,5~7 d后待皮丘消退,观察小鼠成瘤情况。密切记录成瘤时间,以后每隔2天使用游标卡尺测量肿瘤长径和短径值,按照计算公式:$V(mm^3)=a\times b^2/2$计算体积,其中a为长径,b为短径。同时观察裸鼠体质量及生长状态等。待肿瘤体积达800 $mm^3$时处死裸鼠,取裸鼠皮下瘤体拍照、称重,并研磨组织蛋白,Western blot检测相关蛋白表达水平。

### 1.9 生物信息学分析

从癌症和肿瘤基因图谱(the cancer genome atlas,TCGA)数据库(https://portal.gdc.com)获得NSCLC组织的RNA-seq数据和临床信息,并与配对癌旁组织的RNA-seq数据对比,得到配对差异分析结果,使用Rstudio软件v4.0.3进行统计分析,$P$值<0.05被认为具有统计学意义。Kaplan-Meier生存分析比较上述两组或多组之间的生存差异。对于Kaplan-Meier曲线,$P$值和具有95%$CI$的风险比(hazard ratio,$HR$)通过logrank检验和单变量Cox回归得出。

### 1.10 统计学分析

使用GraphPad 8.0对实验数据进行统计分析,所有的数据均以$\bar{x}\pm s$表示,两两之间比较采用Student's $t$检验,均为两独立样本$t$检验,每组实验均重复3次,$P$<0.05表示差异具有统计学意义。

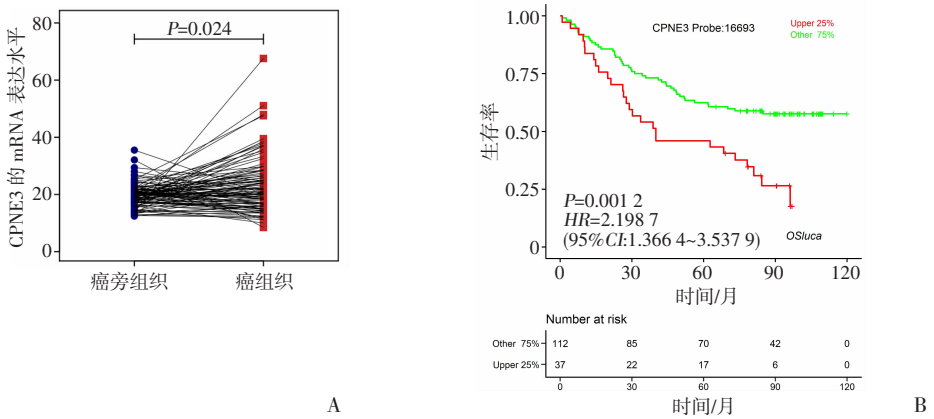
## 2 结果

### 2.1 NSCLC组织中CPNE3高表达并与患者的不良预后相关

基于来自TCGA数据库获得的NSCLC组织的RNA-seq数据和临床信息进行生信分析,结果显示,与配对癌旁组织相比,CPNE3在NSCLC组织中表达水平显著升高($P$=0.024,图1A),且与患者的不良预后相关(HR=2.198 7,$P$=0.001 2,图1B)。

### 2.2 NSCLC细胞株中CPNE3表达升高

通过Western blot检测CPNE3在正常支气管上皮细胞株BEAS-2B和NSCLC细胞株A549、H1299、H460和H520中的表达水平(图2)。与正常支气管上皮细胞相比,CPNE3在NSCLC细胞的表达显著升高。选取表达量中等的A549细胞进行后续实验。



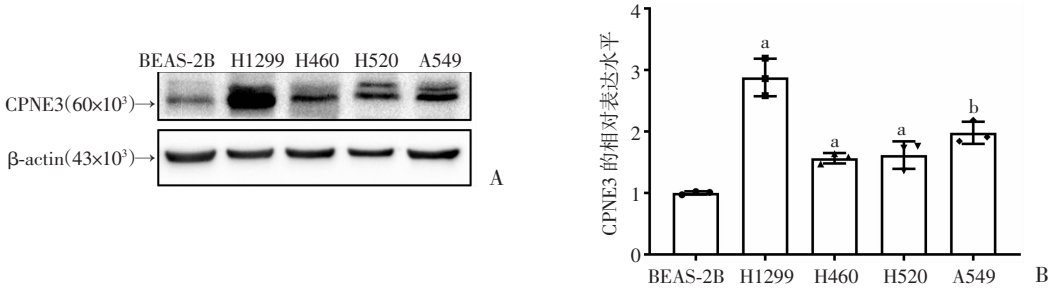

A 时间/月 B

A:TCGA数据库分析配对的106对癌/癌旁组织中CPNE3的mRNA表达情况($n$=106);B:TCGA数据库中CPNE3表达情况与NSCLC患者预后的相关性

**图1 NSCLC组织中CPNE3高表达并与患者不良预后相关**

2.3　干扰 CPNE3 抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭

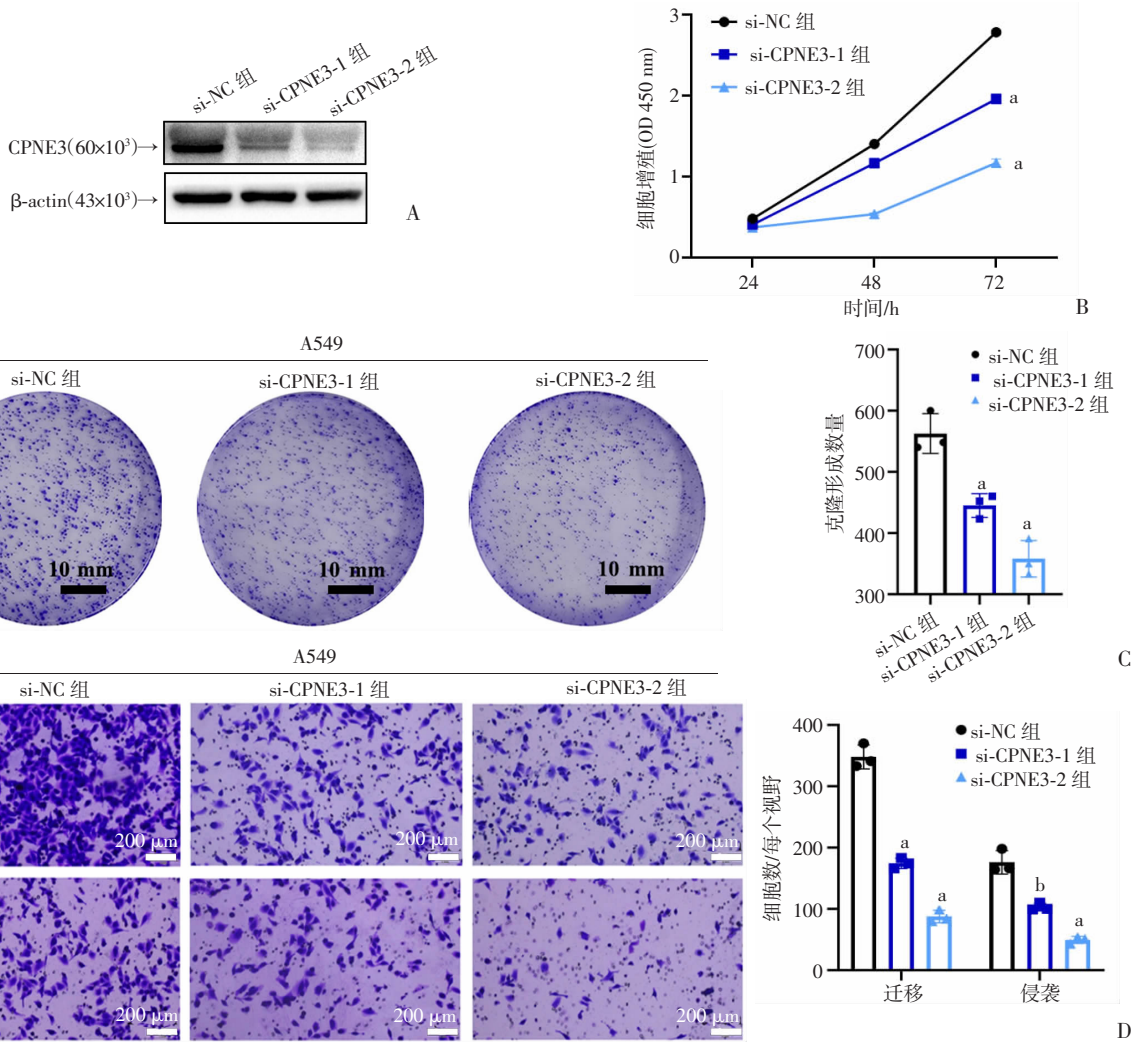
在 A549 细胞株中转染干扰序列,Western blot 检测 CPNE3 蛋白水平显著降低(图 3A),通过 CCK-8 实验和克隆形成检测发现,与 si-NC 组相比,si-CPNE3-1 和 si-CPNE3-2 组 A549 细胞的增殖能力显著降低($P<0.001$, $P<0.001$,图 3B、C)。Transwell 实验表明 si-CPNE3-1 组和 si-CPNE3-2 组的细胞较 si-NC 组相比,迁移和侵袭能力亦显著降低($P<0.001$, $P<0.01$,图 3D)。




a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 BEAS-2B 比较

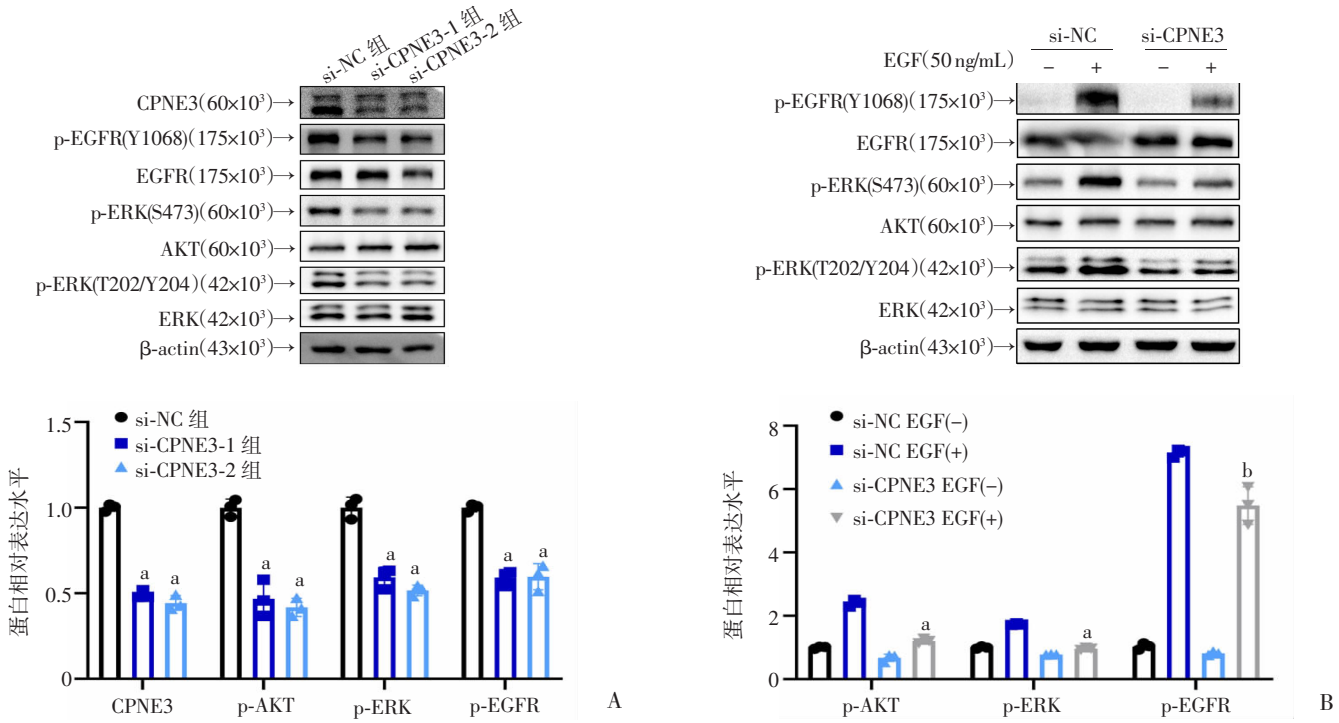
A:Western blot 检测 CPNE3 蛋白在正常支气管上皮 BEAS-2B 和 NSCLC 细胞株中的蛋白表达情况;B:蛋白半定量分析

**图 2　NSCLC 细胞株中 CPNE3 表达升高**　($n=3, \bar{x}\pm s$)




A:Western blot 检测 CPNE3 干扰后蛋白水平;B:CCK-8 法检测干扰 CPNE3 后细胞的增殖能力 a:$P<0.001$,与 si-NC 组比较;C:克隆形成实验检测干扰 CPNE3 后细胞的增殖能力　a:$P<0.01$,与 si-NC 组比较;D:Transwell 实验检测干扰 CPNE3 后细胞的迁移和侵袭能力　a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 si-NC 组比较

**图 3　干扰 CPNE3 抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭**　($n=3, \bar{x}\pm s$)




A:Western blot 检测 A549 细胞干扰 CPNE3 后各组之间 CPNE3 和下游蛋白的表达和定量结果 a:$P<0.001$,与 si-NC 组比较;B:Western blot 检测 EGFR 磷酸化水平及其下游相关信号通路蛋白的表达和定量结果 a:$P<0.001$,与 si-NC EGF(+)组比较;b:$P<0.01$,与 si-NC EGF(+)组比较

**图 4 CPNE3 对 AKT/ERK 和 EGFR 信号通路的影响** ($n=3,\bar{x}\pm s$)

### 2.4 CPNE3 对 AKT/ERK 和 EGFR 信号通路的影响

在 A549 细胞中干扰 CPNE3 后,通过 Western blot 检测增殖和转移相关蛋白标志物的表达水平变化。结果显示,与 si-NC 组相比,si-CPNE3 组 AKT、ERK 和 EGFR 的磷酸化水平显著下降,而总 AKT、ERK 和 EGFR 的表达并没有显著变化(图 4A)。为了进一步验证 CPNE3 和 EGFR 信号通路的关系,在 CPNE3 干扰组加入外源性 EGF(50 ng/mL)刺激,30 min 后提取总蛋白。Western blot 结果显示,与 si-NC EGF(+)组相比,干扰 CPNE3 后,外源加入 EGF 所诱导的 EGFR 磷酸化及其下游相关信号通路的激活被抑制(图 4B)。证明干扰 CPNE3 后可以通过 EGFR 信号通路抑制 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭。

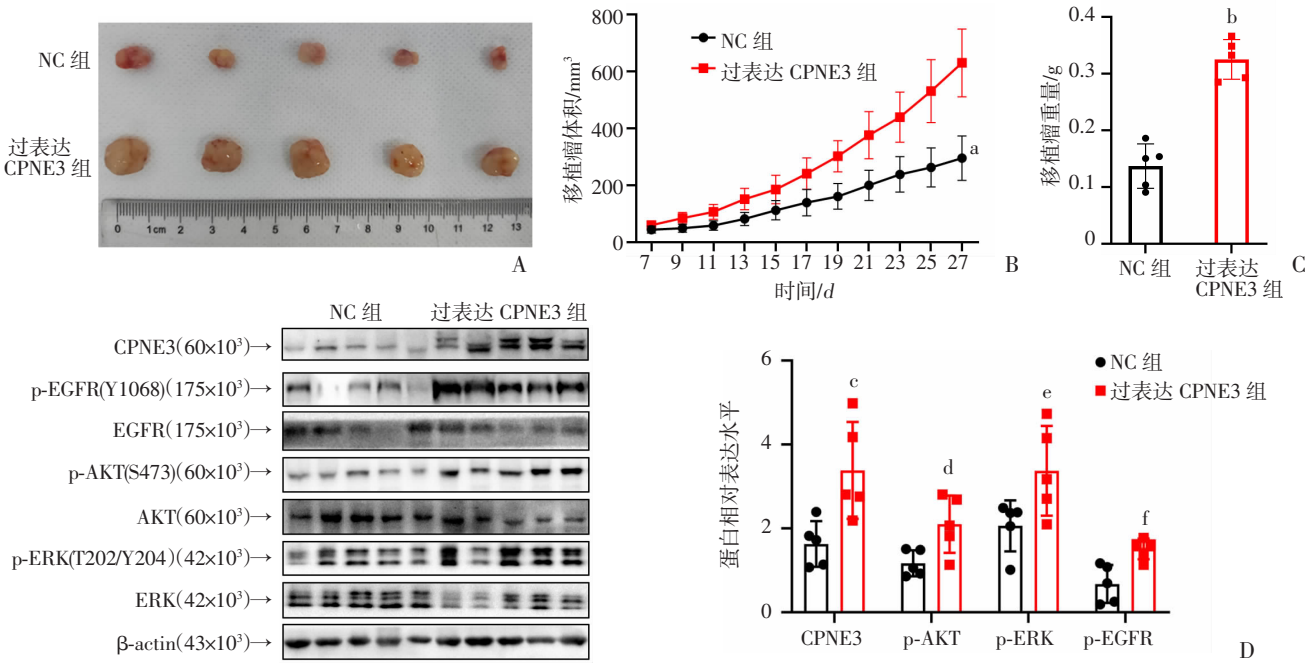
### 2.5 过表达 CPNE3 在体内增强 A549 细胞的增殖能力

通过构建裸鼠皮下移植瘤模型,观察皮下移植瘤生长速度、肿瘤重量,发现与 NC 组相比,过表达 CPNE3 组的瘤体生长速度明显更快,瘤体重量也高于 NC 组(图 5A~C)。通过 Western blot 检测瘤体组织的蛋白表达情况,发现过表达 CPNE3 组 AKT、ERK 和 EGFR 的磷酸化水平显著上升(图 5D)。证明过表达 CPNE3 可以增强 A549 细胞在体内的增殖能力,这与 EGFR 信号通路的激活相关。

## 3 讨论

本研究首先通过 TCGA 数据库生信分析发现:CPNE3 在 NSCLC 组织中表达明显升高,并且其高表达与 NSCLC 患者的不良预后显著相关,提示 CPNE3 可能作为癌基因在 NSCLC 中发挥促癌作用,并可能对患者的预后有一定指导意义。随后通过一系列体外表型实验和体内动物实验进行研究探索,发现干扰 CPNE3 可以抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,伴随着 AKT/ERK、EGFR 的磷酸化水平的下降;提示 CPNE3 通过影响 EGFR 及其下游信号通路发挥作用。体内动物实验进一步证实了过表达 CPNE3 可以在裸鼠体内促进移植瘤的生长。以上结果证实了 CPNE3 这一膜结合蛋白家族成员,在肿瘤的发生发展中发挥重要作用,有潜力成为全新的治疗靶点或者评估患者预后的分子标志物。

Copines 是一个钙依赖性的膜结合蛋白家族,在真核生物中普遍存在,具有高度保守、可溶性的特点。目前已确定该家族中有九个成员,越来越多的证据表明,Copines 家族成员参与了多种癌症的发生和进展[7]。




a:$P<0.001$,与 NC 组比较;b:$P<0.001$,与 NC 组比较;c:$P<0.05$,与 NC 组比较;d:$P<0.05$,与 NC 组比较;e:$P<0.05$,与 NC 组比较;f:$P<0.01$,与 NC 组比较

A:裸鼠皮下移植瘤大体观察结果;B:裸鼠皮下移植瘤生长曲线;C:两组移植瘤质量对比;D:Western blot 检测 NC 组和过表达组瘤体组织 CPNE3 和相关信号通路蛋白表达情况和定量结果

**图 5 CPNE3 在体内对 A549 细胞增殖能力的影响** ($n=5, \bar{x}\pm s$)

在本文中重点研究的 CPNE3 是该家族中的一员,其在肿瘤发生发展中的作用得到越来越多的关注。已有文献报道,在乳腺癌中,CPNE3 可以通过激活 ErbB2 蛋白诱导上皮-间充质转化(epithelial mesenchymal transition, EMT),继而促进乳腺癌细胞侵袭和迁移[8]。在结直肠癌中,相关研究发现外泌体中 CPNE3 水平较低的结直肠癌患者的无病生存期和总生存期明显更好,提示 CPNE3 可能作为诊断和评估结直肠癌患者预后的生物标志物[9]。在肝细胞癌中,有研究证实敲低 CPNE3 的表达会增强肝细胞癌细胞对分子靶向药物索拉非尼的敏感性[10]。在胶质母细胞瘤中,研究表明 CPNE3 可以通过激活 PI3K/AKT 通路促进肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭[11]。在 NSCLC 中,CPNE3 可以与 RACK1 相互作用并激活黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)信号通路,促进 NSCLC 的增殖和转移[12]。

CPNE3 在多种癌症中发挥的促癌作用提示其可能与重要肿瘤相关信号通路存在潜在联系,其机制亟需进一步探索,为肿瘤靶向治疗的临床实践提供新的线索。

## 参考文献:

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al*. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin. 2021, 71(3): 209-249. DOI: 10.3322/caac.21660.

[2] erratum: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates ofincidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(4): 313. DOI: 10.3322/caac.21609.

[3] HERBST R S, MORGENSZTERN D, BOSHOFF C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. Nature, 2018, 553(7689): 446-454. DOI: 10.1038/nature25183.

[4] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, *et al*. Cancer Statistic[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21654.

[5] TOMSIG J L, SNYDER S L, CREUTZ C E. Identification of targets for calcium signaling through the copine family of proteins: characterization of a coiled-coil copine-binding motif [J]. J Biol Chem, 2003, 278(12): 10048-10054. DOI:

10.1074/jbc.M212632200.

[6] CAUDELL E G, CAUDELL J J, TANG C H, *et al*. Characterization of human copine III as a phosphoprotein with associated kinase activity[J]. Biochemistry, 2000, 39(42): 13034-13043. DOI: 10.1021/bi001250v.

[7] TANG H C, PANG P, QIN Z, *et al*. The CPNE family and their role in cancers[J]. Front Genet, 2021, 12: 689097. DOI: 10.3389/fgene.2021.689097.

[8] HEINRICH C, KELLER C, BOULAY A, *et al*. Copine-III interacts with ErbB2 and promotes tumor cell migration[J]. Oncogene, 2010, 29(11): 1598-1610. DOI: 10.1038/onc.2009.456.

[9] SUN B, LI Y M, ZHOU Y M, *et al*. Circulating exosomal CPNE3 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(2): 1416-1425. DOI: 10.1002/jcp.26936.

[10] CHEN Z, JIANG Z K, ZHANG W Z, *et al*. Silencing the expression of copine-III enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to the molecular targeted agent sorafenib[J]. Cancer Manag Res, 2018, 10: 3057-3067. DOI: 10.2147/CMAR.S167781.

[11] ZHANG D N, WANG X Y, WANG X, *et al*. CPNE3 regulates the cell proliferation and apoptosis in human Glioblastoma via the activation of PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cancer, 2021, 12(24): 7277-7286. DOI: 10.7150/jca.60049.

[12] LIN H C, ZHANG X, LIAO L, *et al*. CPNE3 promotes migration and invasion in non-small cell lung cancer by interacting with RACK1 via FAK signaling activation[J]. J Cancer, 2018, 9(22): 4215-4222. DOI: 10.7150/jca.25872.

(**收稿**:2022-08-31;**修回**:2022-10-07)

(编辑 栾 嘉)