

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.09.003

· 基础研究 ·

羧肽酶 A4 促进非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程的机制及其相关意义

全安娜¹, 闫鹏²(1. 中国人民解放军联勤保障部队第 960 医院 放疗科, 山东 济南 250031; 2. 济南市中心医院 肿瘤科, 山东 济南 250013)

[摘要] **目的:** 探究羧肽酶 A4 (CPA4) 促进非小细胞肺癌 (NSCLC) 细胞增殖、迁移、侵袭和 EMT 进程的机制及其临床意义。**方法:** 通过 IHC 和 WB 法检测 2012 年 2 月至 2015 年 12 月济南市中心医院收治的 105 例晚期或转移性 NSCLC 患者的癌组织及其癌旁组织标本, 以及 NSCLC 细胞中 CPA4 的表达; χ^2 检验分析 CPA4 表达与患者临床病理特征之间的关联, Kaplan-Meier 法分析 CPA4 表达与患者 OS 之间的关系。采用细胞转染的方法分别构建稳定过表达和低表达 CPA4 的 H1299 与 A549 NSCLC 细胞, 利用 CCK-8 法、细胞集落形成实验、划痕愈合实验和 Transwell 小室实验检测过表达或敲减 CPA4 后细胞增殖、迁移和侵袭能力的变化。建立裸鼠细胞移植瘤模型和尾静脉-肺转移肿瘤模型, 检测过表达 CPA4 和敲减 CPA4 表达对在裸鼠体内成瘤和转移的影响, 通过 WB 和 IHC 法检测移植瘤组织中上皮间质转化 (EMT) 相关标志物的变化。**结果:** 与癌旁组织和正常肺上皮细胞比较, CPA4 在 NSCLC 组织和细胞中均呈高表达 (均 $P < 0.05$); CPA4 高表达 NSCLC 患者的 OS 显著短于低表达患者 ($P < 0.05$), CPA4 的高表达更多见于分化差、N2~N3 淋巴结受累和 TNM IV 期 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。过表达 CPA4 促进 H1299 细胞而敲减 CPA4 表达则抑制 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭; 过表达 CPA4 促进裸鼠 H1299 细胞移植瘤生长和肺的转移; 过表达 CPA4 促进 H1299 细胞的 EMT 进程相关分子的变化。**结论:** NSCLC 组织和细胞中 CPA4 均呈高表达, 过表达 CPA4 可诱导 EMT 进程促进 NSCLC 细胞的增殖、迁移和侵袭且与肿瘤进展和预后有关, CPA4 是一个预测 NSCLC 复发、预后及可用于靶向治疗的潜在标志物。

[关键词] 非小细胞肺癌; 羧肽酶 A4; 上皮间质转化; 增殖; 侵袭; 迁移; 转移

[中图分类号] R734.2; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2022)09-0797-09

The mechanism and relative significance of carboxypeptidase A4 promoting the proliferation, migration, invasion and EMT of non-small cell lung cancer cells

TONG Anna¹, YAN Peng² (1. Department of Radiotherapy, the 960th Hospital of the PLA Joint Logistics Support Force, Jinan 250031, Shandong, China; 2. Department of Oncology, Jinan Central Hospital, Jinan 250013, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism and clinical significance of carboxypeptidase A4 (CPA4) promoting the proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) progression of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Methods:** IHC and WB were employed to detect the expression of CPA4 in NSCLC tissues and adjacent tissues of 105 patients with advanced or metastatic NSCLC in Jinan Central Hospital from February 2012 to December 2015 and the expression of CPA4 in NSCLC cells. Chi-square test was used to analyze the association between CPA4 expression and the clinicopathological characteristics of the patients. The relationship between CPA4 expression and the overall survival (OS) of the patients was analyzed by Kaplan-Meier method. H1299 and A549 NSCLC cells with stable overexpression and downexpression of CPA4 were constructed by cell transfection. Changes in the cell proliferation, invasion and migration after overexpression and knockdown of CPA4 were detected by CCK-8 assay, cell colony formation assay, scratch healing assay and Transwell assay. Xenograft tumor models and tail vein - lung metastasis tumor models of nude mice were established to detect the role of CPA4 in tumor tumorigenesis and metastasis *in vivo*. Changes in the markers of EMT in the tissues of xenografts were detected by WB and IHC. **Results:** Compared with paracancer tissues and normal lung epithelial cells, CPA4 was highly expressed in cancer tissues and cancer cells (all $P < 0.05$). The OS of NSCLC patients with high CPA4 expression was significantly shorter than that of patients with low CPA4 expression ($P < 0.05$). High expression of CPA4 was more common in poor differentiation, N2-3 lymph node involvement and TNM stage IV ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Overexpression of CPA4

[基金项目] 山东省中医药科学技术研究项目 (No.Q2022004); 山东省医药卫生科技发展计划 (No.202104080454); 济南市中心医院高层次课题培育计划青年项目 (No.202007018)

[作者简介] 全安娜 (1985—), 女, 硕士生, 主治医师, 主要从事恶性肿瘤放射治疗及分子靶向治疗的研究, E-mail: tonganna@126.com

[通信作者] 闫鹏, E-mail: phoenix142@126.com

promoted H1299 cells, while knockdown of CPA4 inhibited the proliferation, migration and invasion of A549 cells. Overexpression of CPA4 promoted the growth of H1299 cell xenograft tumors and lung metastatic tumors in nude mice. Overexpression of CPA4 promoted the changes of EMT process-related molecules in H1299 cells. **Conclusion:** CPA4 is highly expressed in NSCLC tissues and cells. Overexpression of CPA4 can induce EMT, promote the proliferation, migration and invasion of NSCLC cells and is related to tumor progression and prognosis. CPA4 is a potential biomarker for predicting relapse and prognosis of NSCLC and can be used for targeted therapy.

[Key words] non-small cell lung cancer (NSCLC); carboxypeptidase A4 (CPA4); epithelial-mesenchymal transition (EMT); proliferation; migration; invasion; metastasis

[Chin J Cancer Biother, 2022, 29(9): 797-805. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2022.09.003]

在全球范围内,肺癌是发病率第二,且是病死率第一的恶性肿瘤,2020年有220万新发病例和180万死亡病例^[1]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)占所有肺癌病例的80%~85%^[2],其中大多数发现时已是晚期^[3]。随着靶向治疗和免疫治疗的进展,NSCLC生存期显著延长,但总体预后仍然很差。因此,深入了解NSCLC生物学分子机制,可为改善NSCLC预后及探索新的靶向药物提供理论支持。羧肽酶A4(carboxypeptidase A4, CPA4)是金属羧肽酶家族的成员^[4]。金属羧肽酶是锌依赖性酶,可催化肽和蛋白质底物的C末端裂解,在消化和神经内分泌肽的选择性生物合成中发挥作用^[5-6]。最近,发现CPA4在多种实体瘤组织中呈高表达,包括胰腺癌^[7]、胃癌^[8]、乳腺癌^[9]和食管癌^[10],且可作为潜在的诊断和预后标志物。此外,本研究的前期工作也发现NSCLC消融后的残留肿瘤细胞出现上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),且CPA4呈显著的高表达^[11]。因此,推测CPA4有可能参与NSCLC的EMT进程。本研究旨在观察CPA4在NSCLC恶性进展中的作用,并探索CPA4是否能成为治疗NSCLC的新的潜在靶点。

1 材料与方法

1.1 组织标本与实验动物、细胞及主要试剂

本研究采用2012年2月至2015年12月在济南市中心医院接受治疗的105例局部晚期或转移性NSCLC患者的癌组织及其癌旁组织,从病理科获得石蜡包埋的组织块并切片。济南市中心医院伦理委员会批准了这项研究(批准号:JNCH2021-26),所有患者都签署了知情同意书。

3~4周龄BALB/c裸鼠(雄鼠,18~20 g)20只购自斯贝福生物有限公司(北京),动物合格证号码:[SCXK(京)2019-0010]。

人NSCLC细胞A549、H1299、H1975和PC9,以及正常肺/支气管上皮细胞BEAS-2B均购自中国科学院细胞库(中国上海)。A549和BEAS-2B细胞在含有10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液中培养。

H1299、H1975和PC9细胞在含有10% FBS的RPMI 1640培养液中培养。

FBS、DMEM培养基购自HyClone公司,RPMI 1640培养基购自Gibco公司。TRIzol试剂购自Thermo Fisher Scientific公司、一体式cDNA第一链合成试剂盒、BlazeTaq SYBR Green qPCR MIX 2.0试剂盒均购自GeneCopoeia公司,PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,蛋白酶抑制剂、RIPA裂解缓冲液、BCA试剂盒均购自Thermo Fisher Scientific公司,兔抗E-cadherin、N-cadherin抗体购自CST公司,兔抗vimentin抗体购自Abcam公司,兔抗CPA4抗体购自Genetex公司,鼠抗GAPDH抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔及羊抗鼠IgG均购自亚太恒信生物科技(北京)有限公司,CCK-8溶液购自武汉博士德生物工程有限公司,Transwell小室购自康宁公司,RNA测序由北京博云华康基因科技有限公司操作。

1.2 TCGA(The Cancer Genome Atlas)数据库数据分析

CPA4基因在肺癌中的表达水平通过肿瘤基因图谱TCGA数据库(<http://cancergenome.nih.gov>)进行查询并下载。将从TCGA数据库中获取的胰腺癌相关数据导入R3.6.3软件中,进行NSCLC的生存分析。

1.3 细胞转染及分组

内源性CPA4表达较低的H1299细胞通过慢病毒感染稳定过表达CPA4,其慢病毒载体由吉凯基因(上海)公司协助构建。将人CPA4 DNA序列插入pcDNA3.1⁽⁺⁾载体构建CPA4过表达质粒。质粒转染:H1299细胞以 5×10^5 个/孔密度铺板于6孔板中,当细胞汇合率达到约80%时更换为无双抗无血清培养基饥饿处理2~4 h,转染步骤参照Lipofectamine™ 2000说明书进行。实验分为2组:质粒转染组(H1299-NC,空质粒组)、过表达质粒转染组(H1299-CPA4,过表达组),每组3个重复。转染后培养72 h,显微镜视野下观察荧光并收集细胞和上清液。

使用慢病毒shRNA技术构建稳定低表达CPA4 shRNA或shNCRNA的细胞。使用X-treme GENE

HP Reagents(购自Roche公司)将shCPA4或shNCRNA质粒(购自苏州吉玛基因公司)转染到内源性高表达CAP4的A549细胞中,质粒中核酸序列如下:shNC-CPA4:5'-GGCCGAUGUAUGUACUGAATT-3'; sh-CPA4:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'。

1.4 qPCR法检测CPA4和EMT相关基因的表达

使用TRIzol试剂提取转染后各组细胞中总RNA,电泳验证完整性后,使用一体式cDNA第一链合成试剂盒将RNA逆转录为cDNA,使用BlazeTaq SYBR Green qPCR MIX 2.0试剂盒进行qPCR。qPCR采用两步法,反应条件:95℃ 2 min,95℃ 15 s,60℃ 30 s,共计40个循环。相关引物序列如下:CPA4正向引物为CTGCTGATGTATCCATATGGGT、反向引物为GAATGCAATTTGATGCCGTTG, E-cadherin正向引物为AATGAAGCCCCATCTTTAT、反向引物为GCGTCTTCTCTGTCCATCTC, N-cadherin正向引物为AGGCTTCTGGTGAAATTGCAT、反向引物为GTCCACCTGAAATCTGCTGG, vimentin正向引物为CGTCCACACGCACCTACAG、反向引物为CGTCCACACGCACCTACAG, GAPDH正向引物为GAAGGTGAA GGTCGGAGTC、反向引物为GAAGATGGG TGATGGGATTC。以GAPDH作为内参照基因,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相关基因的相对表达量。

1.5 WB法检测NSCLC细胞、转染后各组细胞和移植瘤组织中CPA4和EMT相关蛋白的表达

使用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液提取NSCLC细胞、各组转染后细胞及移植瘤组织的总蛋白,用BCA试剂盒检测蛋白质浓度。用10%SDS-PAGE分离蛋白质,将蛋白质条带转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、vimentin(1:1 000)、CPA4(1:500)和GAPDH(1:2 000)一抗4℃处理过夜,加入IgG二抗(1:10 000)室温下处理1 h,ECL试剂显影,以GADPH用作内参照,使用ImageJ软件分析蛋白条带的灰度值。

1.6 IHC法检测移植瘤组织中CPA4和EMT相关蛋白的表达

将移植瘤组织石蜡包埋、切片、脱蜡水化,H₂O₂封闭内源性过氧化物酶,加入E-cadherin、N-cadherin、vimentin(1:200)和CPA4(1:100)抗体4℃下处理过夜。次日,加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗室温处理1 h,DAB显色,复染、脱水、封片,观察拍照。

IHC染色结果由两名主治以上的病理医生判断。阳性细胞百分率评分代表阳性染色肿瘤细胞的评估分数(0分=无;1分<25%;2分=25%~75%;3分>75%),

强度评分代表阳性肿瘤细胞的平均染色强度分数(0=无;1=弱;2=中;3=强),将阳性细胞百分率评分×平均染色强度评分=某病例的IHC评分(immunohistochemical score, IS)。在每例组织染色切片中,随机抽取5个视野,取其平均IS。CPA4表达程度分为高表达(IS>3)或低表达(IS≤3)两种。

1.7 CCK-8法检测过表达或敲减CPA4表达后细胞的增殖能力

将转染后各组细胞以 1×10^3 个细胞/孔接种到96孔板中,分别培养24、48、72、96 h后,每孔加10 μL CCK-8溶液处理4 h,使用微孔板读数器读取在450 nm波长处的光密度(D)值。实验重复3次。

1.8 细胞集落形成实验检测过表达或敲减CPA4表达后细胞的增殖能力

将转染后各组细胞接种到6孔板中(5×10^2 个细胞/孔)培养2周。去除培养液,用甲醇固定后进行结晶紫染色,光镜下拍照并计数细胞集落,细胞数超过50个的集落被视为阳性集落。每组设定3个复孔。

1.9 Transwell实验检测过表达或敲减CPA4表达后各组细胞的迁移和侵袭能力

迁移实验:将转染后各组细胞(5×10^4 个)悬浮于100 μL无血清DMEM或RPMI 1640培养基中,将其加入Transwell上室,将含10% FBS的DMEM或RPMI 1640培养基加入下室,进行细胞迁移实验。进行侵袭实验时,在上室中预铺基质胶,其他操作同迁移实验。然后在37℃、5% CO₂条件下培养24 h(迁移实验)或48 h(侵袭实验)后,用棉签除去上室中残留的细胞,用4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色15 min。然后在每孔随机选择5个区域(×100)进行计数、拍照。每组设立3个复孔。

1.10 划痕愈合实验检测过表达或敲减CPA4表达后各组细胞的迁移能力

将1 mL(1×10^5 个)转染后各组细胞悬液接种在6孔板中,待细胞汇合度达约80%时,使用无菌的200 μL移液器吸头横向划痕,保证每个孔中的划痕基本一致。用无菌PBS溶液重复洗板3次去除脱落的细胞,加入无血清培养基,在37℃、5% CO₂培养箱培养24 h。利用显微镜观察0、24 h时的划痕宽度。划痕愈合率=(1-48 h划痕宽度/0 h划痕宽度)×100%。实验重复3次。

1.11 裸鼠皮下H1299细胞移植瘤模型和尾静脉-肺转移肿瘤模型的建立及观察

裸鼠皮下H1299细胞移植瘤模型建立方法参见课题组以往的研究^[1]。将稳定过表达CPA4的H1299-CPA4细胞及其对照细胞(H1299-NC细胞) 1×10^6 个注射至裸鼠右侧腋部皮下,H1299-CPA4组和H1299-NC组各5只

裸鼠。接种完后每3 d观察记录1次,使用游标卡尺测量记录肿块长径(L)和短径(W),计算出肿瘤体积,绘制肿瘤生长曲线。体积(mm^3)= $(L \times W^2)/2$ 。

尾静脉-肺转移瘤模型:分别将A549-shNC、A549-shCPA4、H1299-NC和H1299-CPA4细胞(各 5×10^6 个细胞)通过小鼠尾静脉注射至裸鼠体内,每组各3只裸鼠。注射后12周,对小鼠实施安乐死,收集肺脏组织,在解剖显微镜下观察转移结节数量。转移性结节用甲醛溶液固定、石蜡包埋、连续切片、H-E染色、显微镜观察拍照。

1.12 RNA测序(RNA-seq)和数据分析

使用RNA Fast2000试剂盒抽提A549-shNC、A549-shCPA4细胞总RNA,在Illumina HiSeq2500测序仪上根据Illumina TruSeq v3协议对DNA文库进行转录组RNA-seq测序。基于GRCH38的ENSEMBL基因注释,使用FeatureCounts软件(版本1.4.6)对基因表达进行量化。使用EdgeR的归一化因子通过M值的修剪平均值(TMM)对RNA-seq数据进行归一化,然后进行分位数归一化,结果以 Log_2 倍数变化($\text{Log}_2 \text{FC}$)表示。使用基于网络的功能分析工具Ingenuity Pathway Analysis(IPA),根据指定条件分析具有显著下调或上调(倍数变化 ≥ 1.5 , $P < 0.001$)的基因,注释它们的生物学功能和途径。使用GSEA软件([//software.broadinstitute.org/](http://software.broadinstitute.org/)

gsea/)进行基因集富集分析。

1.13 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用SPSS23.0统计软件和Prism GraphPad 8.0对实验数据进行分析,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采取 t 检验;CPA4表达与NSCLC临床病理特征之间的关系用 χ^2 检验;使用Kaplan-Meier方法构建生存曲线,并使用对数秩检验进行比较。所有检验均为双尾检验, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 晚期NSCLC组织中CPA4呈高表达且其与晚期患者短OS相关联

IHC染色结果(图1A)显示,与癌旁组织相比,NSCLC组织中CPA4呈显著高表达($P < 0.01$)。Kaplan-Meier生存分析显示,CPA4高表达的晚期NSCLC患者的中位OS为14.0个月,而CPA4低表达的晚期患者的中位OS为20.0个月,CPA4高表达患者的OS明显短于低表达患者($P = 0.036$,图1B、C)。此外,本研究还利用TCGA数据库分析了502例肺腺癌患者的OS,结果(图1D)显示,CPA4高表达的肺腺癌患者OS显著短于低表达患者($P = 0.044$)。

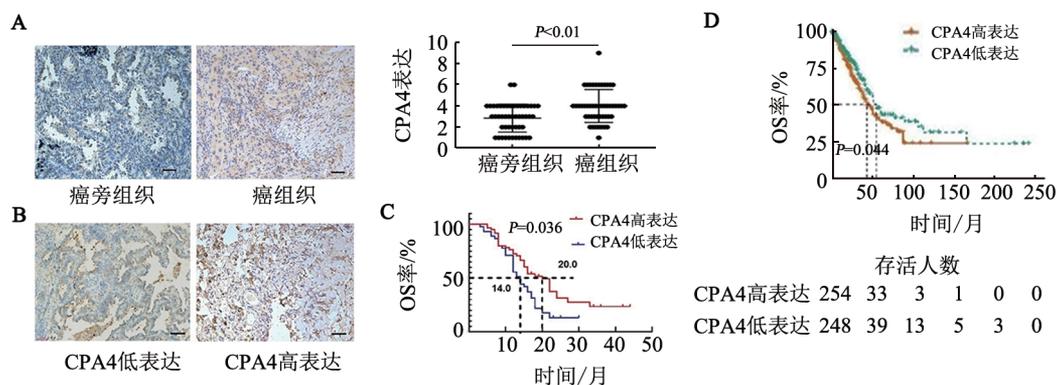


图1 CPA4在晚期NSCLC组织和癌旁组织中的表达及其与患者OS的关系
A: CPA4在晚期NSCLC组织和癌旁组织中的表达(标尺100 μm); B: 晚期NSCLC组织中, CPA4高表达(评分 >3)和低表达(评分 ≤ 3)的代表性图像(标尺100 μm); C: 通过Kaplan-Meier法对CPA4高表达(评分 >3)或低表达(评分 ≤ 3)晚期NSCLC患者的生存分析; D: TCGA数据库中502例I~IV期肺腺癌组织中CPA4表达与患者OS的关系

图1 CPA4在晚期NSCLC组织和癌旁组织中的表达及其与患者OS的关系

本研究进一步分析了CPA4表达与临床病理特征之间的关系。如表1所示,在晚期NSCLC患者中,CPA4的高表达更多见于分化差($P = 0.03$)、N2~N3淋巴结受累($P = 0.01$)和TNM IV期($P = 0.02$)。

2.2 NSCLC细胞中CPA4呈高表达及CPA4在A549、H1299细胞中成功被敲减或过表达

WB法检测结果显示,与正常肺/支气管上皮BEAS-2B细胞比较,CPA4在NSCLC细胞(H1299、A549、H975和PC9细胞)中呈高表达(图2A,均

$P < 0.05$)。qPCR和WB法检测结果显示,与A549-shNC细胞或H1299-NC细胞比较,A549-shCPA4细胞或H1299-CPA4细胞中的CPA4 mRNA及蛋白水平明显降低或升高(图2B、C, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明在A549-shCPA4细胞或H1299-CPA4细胞中成功地敲减或过表达了CPA4。

2.3 过表达/敲减CPA4对H1299和A549细胞增殖能力的影响

CCK-8法和集落形成实验检测结果(图3)显示,

与H1299-NC细胞相比,H1299-CPA4细胞的增殖能力明显增强($P<0.05$ 或 $P<0.0$);与A549-shNC细胞相比,A549-shCPA4细胞的增殖能力明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。这些实验说明,过表达CPA4会促进H1299细胞增殖而敲减CPA4表达则抑制A549细胞增殖。

2.4 过表达CPA4促进H1299细胞迁移和侵袭而敲减CPA4表达则抑制A549细胞迁移和侵袭

划痕愈合和Transwell小室实验检测结果(图4)显示,与A549-shNC细胞相比,A549-shCPA4细胞的迁移和侵袭能力明显下降(均 $P<0.01$);与H1299-NC细胞相比,H1299-CPA4细胞的迁移和侵袭能力明显增强(均 $P<0.01$)。这些实验结果说明,过表达CPA4会促进H1299细胞的迁移和侵袭能力,而敲减CPA4表达则抑制A549细胞的迁移和侵袭能力。

2.5 过表达或敲减CPA4对裸鼠移植瘤和肺转移瘤生长的影响

裸鼠移植瘤和肺转移肿瘤模型检测结果显示,与H1299-NC细胞组比较,H1299-CPA4细胞组的移植瘤体积显著增大(图5A, $P<0.05$),肺转移瘤结节数目明显增加(图B, $P<0.01$);与A549-shNC细胞组比较,A549-shCPA4细胞组,转移瘤结节数目明显减少(图5B, $P<0.01$)。这些实验结果说明,过表达CPA4可促进裸鼠H1299细胞移植瘤生长和肺转移瘤结节数目的增加,敲减CPA4则能减少转移瘤结节数目。

2.6 过表达CPA4促进H1299细胞的EMT进程

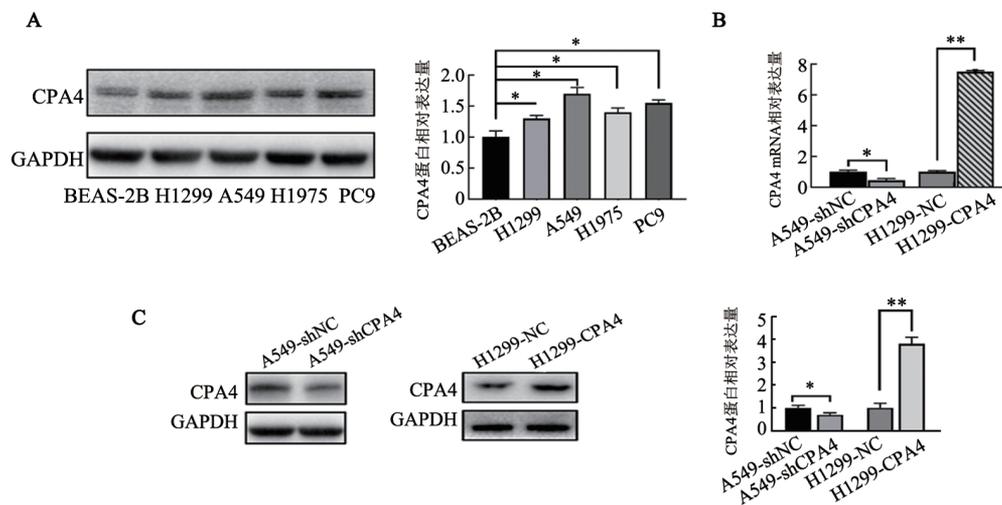
RNA-seq检测结果(图6)显示,与H1299-NC细胞相比,H299-CPA4过表达细胞中58个基因表达上调、41个基因表达下调(图6A、B)。GSEA分析显示,

与EMT相关的基因显著富集(图6C、D)。此外,TGF- β 信号通路相关基因也显著富集(图6E、F)。

表1 CPA4的表达与NSCLC患者临床病理特征之间的关系(n)

临床病理特征	高表达 ($N=65$)	低表达 ($N=40$)	χ^2	P 值
性别				
男性	45	22	2.17	0.14
女性	20	18		
年龄/岁				
<70	44	20	3.26	0.07
≥ 70	21	20		
是否吸烟				
吸烟	51	30	0.17	0.68
不吸烟	14	10		
组织学				
鳞状细胞癌	22	17	0.79	0.37
非鳞状细胞癌	43	23		
分化程度				
中高分化	19	20	4.58	0.03*
低分化	46	20		
肿瘤直径/cm				
≤ 5.0	33	24	0.85	0.36
> 5.0	32	16		
区域淋巴结受累				
N0-1	20	22	6.01	0.01*
N2-3	45	18		
TNM分期				
III	25	25	5.74	0.02*
IV	40	15		

与低表达患者组比较,* $P<0.05$



* $P<0.05$,** $P<0.01$

A:WB法检测CPA4在不同NSCLC细胞和正常肺/支气管上皮BEAS-2B细胞中的表达;
B,C: qPCR法和WB法分别检测在转染后A549细胞和H1299细胞中敲减和过表达CPA4的效果

图2 CPA4在NSCLC细胞中的表达及对NSCLC细胞转染效果的鉴定

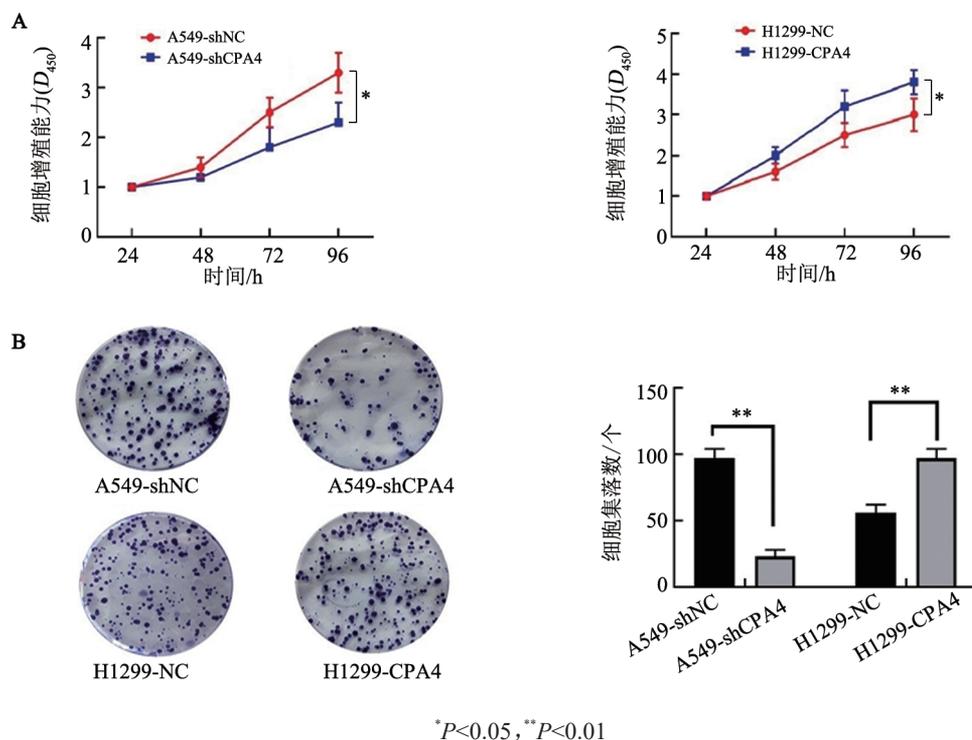


图3 CCK-8法(A)和细胞集落形成实验(B, ×10)分别检测过表达或敲减 CPA4 对 H1299 或 A549 细胞增殖能力的影响

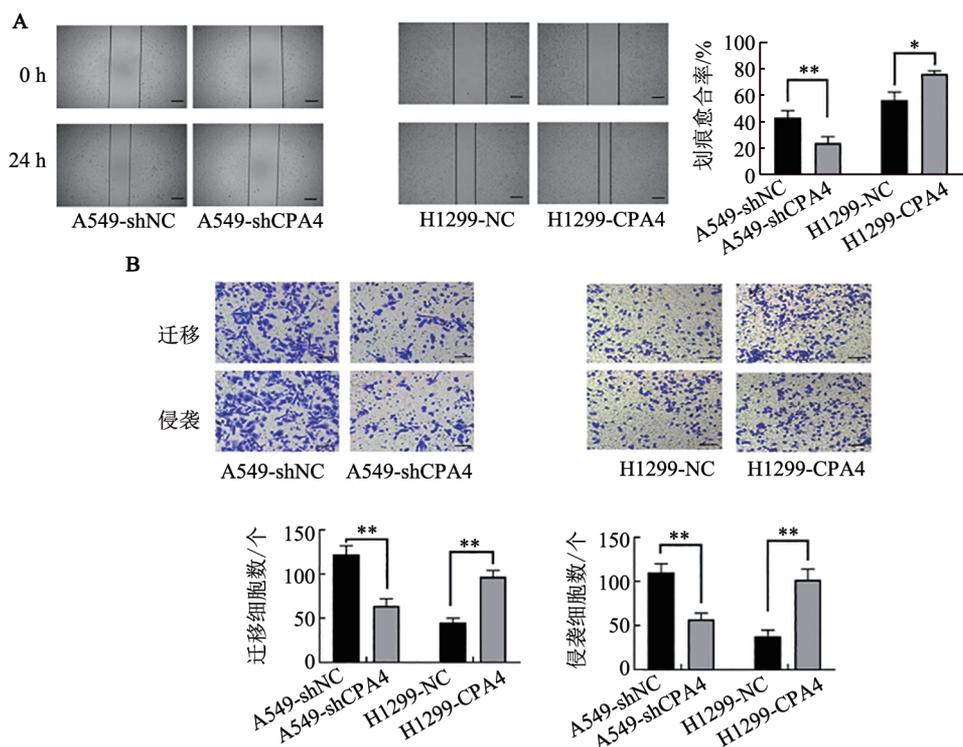


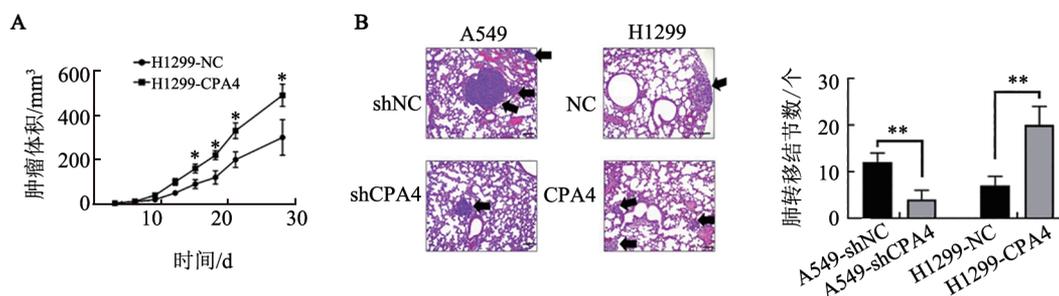
图4 划痕愈合实验(A)和Transwell实验(B)分别检测过表达或敲减 CPA4 对 H1299 与 A549 细胞迁移和侵袭能力的影响

为了验证 RNA-seq 结果中过表达 CPA4 促进 EMT 进程, 本实验使用 qPCR 和 WB 法检测了 N-cadherin、E-cadherin 和 vimentin 的表达, 检测结果(图 7A-C)显示, 与 H1299-NC 细胞比较, H1299-CPA4 细胞中 E-cadherin 表达明显下调(均 $P<0.05$,

而 N-cadherin、vimentin 的表达明显上调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。另外, 还检测了敲减 CPA4 的 A549 细胞中与 EMT 相关分子的表达。检测结果(图 7B、C)显示, 与 A549-NC 细胞比较, A549-shCPA4 细胞中 E-cadherin 表达上调(均 $P<0.05$), 而

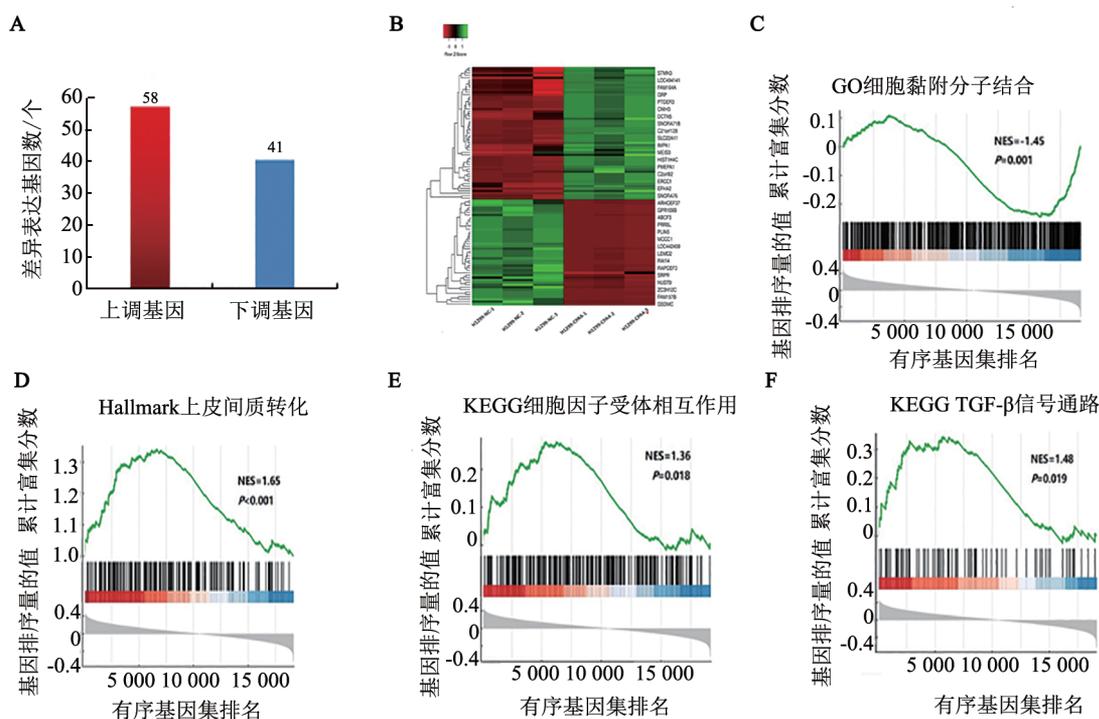
N-cadherin、vimentin的表达下调($P<0.05$)。此外,用IHC检测了CPA4过表达移植瘤中与EMT相关分子的表达,检测结果(图7D)显示,移植瘤组织中E-cadherin表达明显下调($P<0.01$),N-cadherin、

vimentin的表达明显上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。这些结果证实了RNA-seq结果:过表达CPA4促进H1299细胞的EMT进程。



与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;图B标尺为50 μm ,箭头指示肺转移瘤

图5 过表达或敲减CPA4表达对裸鼠H1299细胞和A549细胞移植瘤(A)和肺转移瘤(B)生长的影响



A:RNA测序显示的上调和下调基因的数量(倍数变化 ≥ 1.5 和 $P<0.001$),红色柱代表上调基因、蓝色柱代表下调基因;

B:用热图显示差异表达基因,红色表示上调而绿色表示下调;C~D:GSEA显示与EMT相关基因富集;

E~F:GSEA显示与TGF- β 信号通路相关基因的富集

图6 RNA-seq检测过表达CPA4的H1299细胞中差异表达基因及其功能变化

3 讨论

虽然近些年来对NSCLC治疗的研究进展突飞猛进,但晚期NSCLC患者的预后仍然很差,局部晚期NSCLC患者的5年OS仅为15%~20%^[13]。转移性NSCLC患者的预后更差,5年OS仅为4%^[14]。

CPA4是一种新发现的致癌基因,在实体瘤中普遍存在^[7-9, 11, 15-19]。本研究发现CPA4在NSCLC组织和肺癌细胞中呈高表达,其表达水平与NSCLC患者

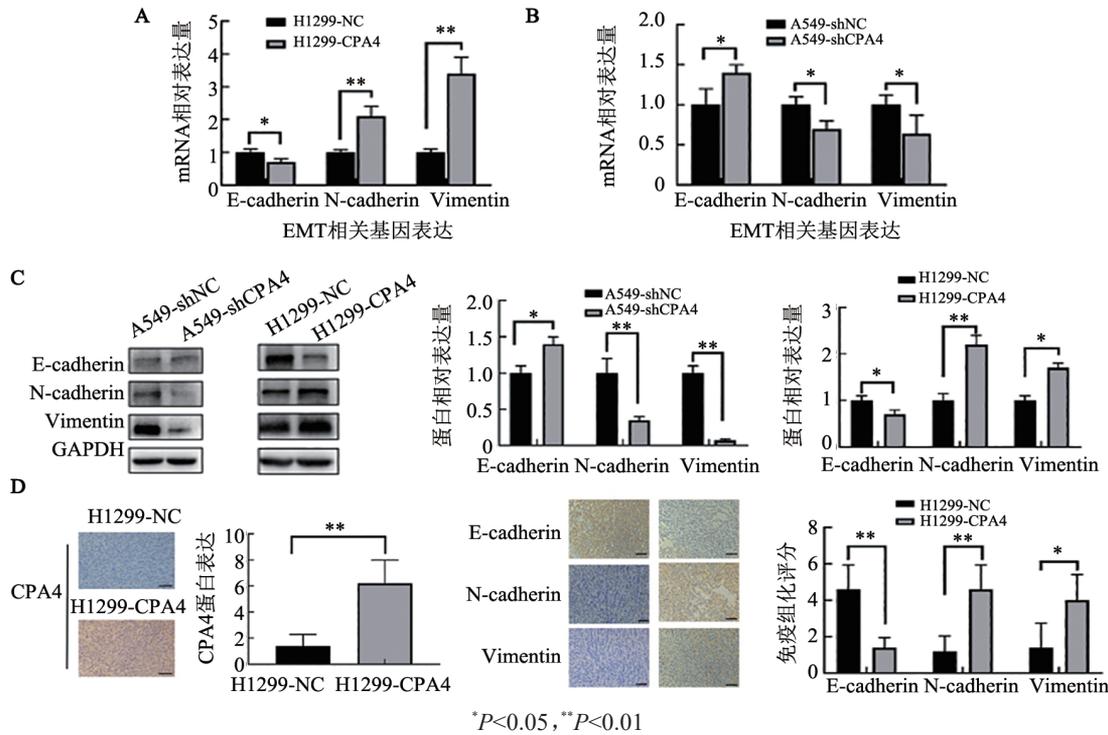
的分化、TNM分期、淋巴结受累和OS相关联。然后以体内、外实验验证过表达CPA4促进了肺癌细胞的生长、侵袭和转移;通过临床标本收集和基础实验证实了CPA4在NSCLC发生发展中起到重要作用。

最近一些研究也报道了CPA4促癌作用的机制。ZHANG等^[18]和HANDA等^[19]发现,高表达CPA4的肝细胞癌和三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)的肿瘤细胞具有干细胞特征。PAN等^[17]发现,过表达CPA4促进肿瘤细胞生长的分子机制可能

是由于STAT3和ERK信号通路的激活。

SUN等^[13]发现,除癌细胞本身外,在肿瘤基质中也观察到CPA4呈阳性染色,特别是在肺癌组织的微

血管区域周围,认为CPA4的过表达与高水平的存活蛋白(survivin)或血管内皮生长因子显著相关。



A~C: qPCR检测在过表达(A)和敲低(B)CPA4后H1299或A549细胞中EMT相关基因的mRNA和蛋白(C)表达;

D: 裸鼠模型中H1299-NC和H1299-CPA4组移植瘤组织中CPA4和EMT相关蛋白的表达(标尺=100 μm)

图7 过表达或敲减CPA4促进或抑制H1299细胞或A549细胞的EMT进程

以往的研究结果表明,CPA4可能是胰腺癌^[7]和TNBC^[19]发生EMT的调节因子。本研究发现,过表达CPA4可促进NSCLC细胞的EMT进程。另外还通过RNA-seq发现,EMT相关基因在CPA4高表达的NSCLC细胞中显著富集,在过表达CPA4肺癌细胞和其移植瘤组织中也确实观察到EMT相关分子的相应变化。EMT是上皮细胞经过表型转化成为间质细胞的过程^[20-21]。经历EMT的细胞失去其细胞-细胞连接和上皮细胞极性,随后经历细胞骨架重组和间质基因程序的激活。EMT对许多发育、生理和病理过程至关重要,包括器官发育、伤口愈合、组织纤维化和癌症转移。EMT的关键特征是上皮黏附分子标志物(E-cadherin和β-catenin)的减少和间质标志物(如N-cadherin和vimentin)的增加^[22]。TANCO等^[4]和YE等^[23]认为CPA4介导的EMT可能通过CPA4激活神经降压素来诱导。本研究在RNA-seq中发现TGF-β信号通路基因的富集,因此推测在NSCLC细胞中,CPA4可能通过TGF-β信号通路诱导EMT进程,但这一推测还有待进一步研究。

本研究发现,CPA4在NSCLC组织和相应细胞中呈明显高表达,且其为NSCLC患者预后差的一个潜

在预测指标,过表达CPA4可通过诱导EMT进程促进肿瘤生长与转移。CPA4是一种分泌蛋白,可以在患者的外周血中检测到。因此,CPA4可作为血清肿瘤标志物监测NSCLC复发和转移。此外,羧肽酶抑制剂(sabellastarte magnifica, SmCI)通过与CPA4结合形成复合物,可抑制CPA4的金属羧肽酶活性^[24-25]。因此,预测将来可以使用SmCI靶向CPA4来治疗过表达CPA4的NSCLC。

总之,CPA4在NSCLC组织和相应细胞中呈明显高表达,CPA4高表达是NSCLC患者的多用途标志物,过表达CPA4促进NSCLC细胞的恶性生物学行为,这可能与CPA4诱导EMT进程密切相关。因此,CPA4可作为一个评估NSCLC复发、预后及靶向治疗的潜在分子。

[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] D'ADDARIO G, FRÜH M, RECK M, *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis,

- treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2010, 21 (Suppl 5): v116-v119. DOI:10.1093/annonc/mdq189.
- [3] YE L Y, DOU Y, SUI Z X, *et al.* Upregulated miRNA-182-5p expression in tumor tissue and peripheral blood samples from patients with non-small cell lung cancer is associated with downregulated caspase 2 expression[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(1): 603-610. DOI:10.3892/etm.2019.8074.
- [4] TANCO S, ZHANG X, MORANO C, *et al.* Characterization of the substrate specificity of human carboxypeptidase A4 and implications for a role in extracellular peptide processing[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (24): 18385-18396. DOI:10.1074/jbc.M109.060350.
- [5] PALLARÈS I, BONET R, GARCÍA-CASTELLANOS R, *et al.* Structure of human carboxypeptidase A4 with its endogenous protein inhibitor, latexin[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (11): 3978-3983. DOI:10.1073/pnas.0500678102.
- [6] REZNIK S E, FRICKER L D. Carboxypeptidases from A to z: implications in embryonic development and Wnt binding[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58(12/13): 1790-1804. DOI: 10.1007/PL00000819.
- [7] SHAO Q L, ZHANG Z Q, CAO R X, *et al.* CPA4 promotes EMT in pancreatic cancer *via* stimulating PI3K-AKT-mTOR signaling[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 8567-8580. DOI: 10.2147/OTT.S257057.
- [8] SUN L C, GUO C G, YUAN H B, *et al.* Overexpression of carboxypeptidase A4 (CPA4) is associated with poor prognosis in patients with gastric cancer[J/OL]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(11): 5071-5075. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27904708/>. PMID: 27904708.
- [9] BADEMLER S, UCUNCU M Z, TILGEN VATANSEVER C, *et al.* Diagnostic and prognostic significance of carboxypeptidase A4 (CPA4) in breast cancer[J/OL]. *Biomolecules*, 2019, 9(3): 103 [2022-03-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30875843/>. DOI: 10.3390/biom9030103.
- [10] SUN L, CAO J, GUO C, *et al.* Associations of carboxypeptidase 4 with ALDH1A1 expression and their prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Dis Esophagus*, 2017, 30 (6): 1-5. DOI:10.1093/dote/dox011.
- [11] YAN P, LYU X L, WANG S N, *et al.* Insufficient ablation promotes the metastasis of residual non-small cell lung cancer (NSCLC) cells *via* upregulating carboxypeptidase A4[J]. *Int J Hyperthermia*, 2021, 38(1): 1037-1051. DOI:10.1080/02656736.2021.1947530.
- [12] GONG R M, LIN W L, GAO A Q, *et al.* Forkhead box C1 promotes metastasis and invasion of non-small cell lung cancer by binding directly to the lysyl oxidase promoter[J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(12): 3663-3676. DOI:10.1111/cas.14213.
- [13] MULHERKAR R, GREWAL A S, BERMAN A T. Emerging role of immunotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer [J/OL]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2020, 18(4): 212-217. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32628649/>. PMID: 32628649.
- [14] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA A Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30. DOI:10.3322/caac.21387.
- [15] SUN L C, WANG Y P, YUAN H B, *et al.* CPA4 is a novel diagnostic and prognostic marker for human non-small-cell lung cancer[J]. *J Cancer*, 2016, 7(10): 1197-1204. DOI:10.7150/jca.15209.
- [16] SUN L C, BURNETT J, GUO C G, *et al.* CPA4 is a promising diagnostic serum biomarker for pancreatic cancer[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2015, 6(1): 91-96. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27073726/>. PMID: 27073726.
- [17] PAN H D, PAN J X, JI L, *et al.* Carboxypeptidase A4 promotes cell growth *via* activating STAT3 and ERK signaling pathways and predicts a poor prognosis in colorectal cancer[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 138: 125-134. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.028.
- [18] ZHANG H T, HAO C F, WANG H B, *et al.* Carboxypeptidase A4 promotes proliferation and stem cell characteristics of hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Exp Pathol*, 2019, 100(2): 133-138. DOI:10.1111/iep.12315.
- [19] HANDA T, KATAYAMA A, YOKOBORI T, *et al.* Carboxypeptidase A4 accumulation is associated with an aggressive phenotype and poor prognosis in triple-negative breast cancer[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(3): 833-844. DOI:10.3892/ijo.2019.4675.
- [20] BLOM J N, FENG Q P. Cardiac repair by epicardial EMT: current targets and a potential role for the primary *Cilium*[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 114-129. DOI:10.1016/j.pharmthera.2018.01.002.
- [21] ZHANG Y, WEINBERG R A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities[J]. *Front Med*, 2018, 12(4): 361-373. DOI:10.1007/s11684-018-0656-6.
- [22] KARNEVI E, ROSENDAHL A H, HILMERSSON K S, *et al.* Impact by pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition and pancreatic cancer cell invasion: adding a third dimension *in vitro*[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 346(2): 206-215. DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.07.017.
- [23] YE Y N, LIU P P, WANG Y, *et al.* Neurotensin, a novel messenger to cross-link inflammation and tumor invasion *via* epithelial-mesenchymal transition pathway[J]. *Int Rev Immunol*, 2016, 35(4): 340-350. DOI:10.3109/08830185.2014.952412.
- [24] ALONSO DEL RIVERO M, REYTOR M L, TREJO S A, *et al.* A noncanonical mechanism of carboxypeptidase inhibition revealed by the crystal structure of the Tri-Kunitz SmCI in complex with human CPA4[J]. *Structure*, 2013, 21(7): 1118-1126. DOI:10.1016/j.str.2013.04.021.
- [25] ALONSO-DEL-RIVERO M, TREJO S A, REYTOR M L, *et al.* Tri-domain bifunctional inhibitor of metallo-carboxypeptidases A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica*[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(19): 15427-15438. DOI: 10.1074/jbc.M111.337261.

[收稿日期] 2022-05-20

[修回日期] 2022-06-15

[本文编辑] 向正华,沈志超