

皮层蛋白受磷酸化调控机制的荧光共振能量转移分析

朱建伟^{1,2*} 陆毅祥² 马利林¹ 黄宝玉¹ 刘培根¹ 詹熙²

(南通大学附属医院,¹普外科,²临床医学研究中心,南通 226001)

摘要 皮层蛋白(cortactin)是一种癌基因蛋白,是酪氨酸磷酸化激酶 Src 的作用底物,到目前为止,皮层蛋白受磷酸化调控的机制还不清楚。本研究用荧光共振能量转移(FRET)分析皮层蛋白受磷酸化调控后的蛋白质结构变化,推测皮层蛋白受磷酸化调控的可能机制。采用蓝绿色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP)作为配对,设计和构建基于皮层蛋白羧基端 SH3 功能的蛋白质传感器,转染 NIH/3T3 细胞,将细胞以过钒酸盐(PV)和 PP2 处理,人为诱导或抑制细胞蛋白磷酸化,比较皮层蛋白的磷酸化和非磷酸化状态 FRET 的不同;进一步观察皮层蛋白磷酸化位点突变后 FRET 的变化,以此判断皮层蛋白的磷酸化作用后结构的变化。所设计的生物传感器供体和受体工作良好。FRET 分析显示,在 PP2 处理后,FRET 能量变化明显较对照组增高,但用 PV 处理后,FRET 下降。皮层蛋白的磷酸化位点突变后,产生的 FRET 明显较野生型皮层蛋白产生的 FRET 为弱。因此推测,皮层蛋白在磷酸化后其分子结构处于“展开”状态,并可能以此增强和其他细胞蛋白的相互作用。

关键词 皮层蛋白;磷酸化;蛋白质结构

肿瘤细胞的运动性是肿瘤发生侵袭、转移的必要条件,这个过程需要肌动蛋白细胞骨架的参与。皮层蛋白(cortactin)是肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合物(ARP2/3)的激活因子,也是丝状肌动蛋白的结合蛋白。皮层蛋白是由 CTTN 基因(以前被称为 EMS1)编码,该基因位于染色体 11q13,这个区域在很多肿瘤,包括头和颈部肿瘤、卵巢、乳腺、肝和肺等肿瘤组织中存在扩增^[1-6]。

皮层蛋白是酪氨酸激酶 Src 的主要底物。细胞在许多情况下,例如 PDGF 和 EGF 刺激、细胞粘附、细胞收缩及细胞吞噬等都存在皮层蛋白的酪氨酸磷酸化。当癌细胞过表达磷酸化缺陷的皮层蛋白突变体,其迁移和转移能力都有下降^[5-7]。这些结果表明酪氨酸磷酸化对皮层蛋白功能起调节作用,然而到目前为止,确切的调节机制还不清楚。

我们对皮层蛋白分子的功能做过深入的研究,发现皮层蛋白的磷酸化在癌细胞内吞作用中发挥重要作用^[8,9]。在此过程中,皮层蛋白与发动蛋白(dynamitin)相互作用并受到磷酸化的调节。皮层蛋白羧基端有一个 SH3 结构域,能与发动蛋白的 PRD 结构域发生相互作用^[7]。皮层蛋白在磷酸化以后和发动蛋白的分子间相互作用增强。由此我们推测,磷酸化可能

对皮层蛋白本身的构象有改变作用。本研究首先设计皮层蛋白的生物传感器,构建表达质粒并转染细胞,将细胞做荧光共振能量转移(FRET)检测,结果表明皮层蛋白在磷酸化作用后分子构象发生了改变。

1 材料与方法

1.1 基于 SH3 功能的皮层蛋白传感器构建

以蓝绿色荧光蛋白(CFP)和黄色荧光蛋白(YFP)作为荧光共振能量转移的供体/受体配对。所需 pYFP-cortactin 表达质粒和 pCortactin-CFP 表达质粒以及相应载体 MGIN 来自美国马里兰大学癌症中心 Steven Zhan 实验室^[8,10]。首先以 pYFP-cortactin 作为模板,扩增 YFP-cortactin,将 YFP-cortactin 片段羧基端与 CFP 片段连接,设计内切酶位点 AgeI 和 NotI,将相应片段插入 MGIN 质粒,命名为 Cort-sensor-a。以全长发动蛋白质粒(梅约医学中心 Cao H 博士惠赠)为模板,采用 PCR 法扩增发动蛋白的 PRD 片段,并

收稿日期:2009-06-18 接受日期:2009-08-24

国家自然科学基金(No.30771126)、教育部回国留学人员启动基金(2008-890)及江苏省自然科学基金(No.BK2006058)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0513-81161221, E-mail: usazhujianwei@yahoo.com.cn

插入 pEYFP 质粒, 以 Cort-sensor-a 及 pYFP-PRD 为模板, PCR 扩增 cortactin-CFP 和 YFP-PRD 片段, 将两片段与接头连接, 将 cortactin-CFP-linker-YFP-PRD 插入 MGIN 载体, 命名为 Cort-sensor, 最终用于后续 FRET 实验。

1.2 细胞转染、荧光显微镜和蛋白质印迹检测

将 MGIN 质粒以 DNA 转导试剂 Lipofectamine 2000 转染包装细胞 GPG293, 在次日连续 3 天收集细胞病毒上清液, 将 NIH/3T3 细胞做常规培养(DMEM+10% 小牛血清, 37 °C, 5% CO₂), 做细胞感染时将病毒上清液加入细胞培养液, 并继续培养 24 h, 荧光显微镜观察表达效果, 加入 G418 筛选 2 周以上获得稳定表达细胞。为观察转染效果, 将 NIH/3T3 细胞收集裂解以 10% 聚丙烯酰胺垂直电泳分离并转移至硝酸纤维膜, 蛋白质印迹检测一抗为皮层蛋白单抗 (Upstate), HRP 标记的二抗来自 Sigma 公司, ECL 显影。

1.3 FRET 检测

将培养的活细胞置于共聚焦显微镜观察台并保持在 37 °C 5% CO₂ 条件的小室中, 给予细胞促磷酸化(过钒酸盐, PV)和抑磷酸化(PP2)处理。FRET 分析时, 设定 405 nm 和 560 nm 为激发和发射波长。荧光强度作为绝对值用来计算 FRET, 采用下列公式: $\text{net FRET} = \text{IFRET} - \text{IYFP} \times a - \text{ICFP} \times b$ 。

2 结果

2.1 皮层蛋白传感器的设计和制备

皮层蛋白传感器组成由氨基端开始依次为全长皮层蛋白序列、CFP、连接序列、YFP、发动蛋白的 PRD 结构域(图 1)。

2.2 细胞表达和 FRET 分析

将 NIH/3T3 细胞常规培养(DMEM 含 10% 小牛血清, 37 °C, 5% CO₂), 细胞生长良好时将病毒上清液加入常规培养液中, 24~48 h 后观察表达情况并加入 G418 筛选 2 周以上。部分细胞裂解做蛋白质印迹分析, 检测转染后外源性皮层蛋白是否表达(图 2)。

选择表达良好的细胞做 FRET 分析, 设定 3 个组: (1)磷酸化组, 采用 PV 处理细胞使细胞内蛋白质磷酸化。(2)去磷酸化组, 采用 PP2 处理细胞抑制皮层蛋白的磷酸化。(3)对照组。分别测定在上述处理后的 FRET 变化。分析时将细胞置于共聚焦显微镜观察台并保持在 37 °C 5% CO₂ 条件的小室中。给予细胞促磷酸化(PV)和抑磷酸化(PP2)处理。对于 CFP, 设定 405 nm 和 440 nm 为激发和发射波长, 对于 YFP,

设定 514 nm 和 560 nm 为激发和发射波长, FRET 分析时, 设定 405 nm 和 560 nm 为激发和发射波长。荧光强度作为绝对值用来计算 FRET, 采用下列公式: $\text{net FRET} = \text{IFRET} - \text{IYFP} \times a - \text{ICFP} \times b$ 。结果表明: 所设计的生物传感器供体和受体工作良好(图 3)。

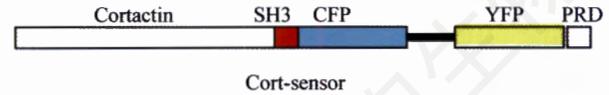


Fig.1 Schematic representation of construction of cortactin bio-sensors

The PRD region is a domain of dynamin, a cortactin binding protein.

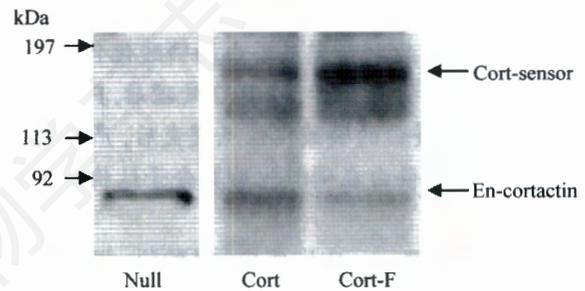


Fig.2 Cort-sensor expression in NIH/3T3 cells detected by Western blot assay

Cort: cort-sensor. Cort-F: cort-sensor with mutation of cortactin phosphorylation sites. En-cortactin: endogenous cortactin.

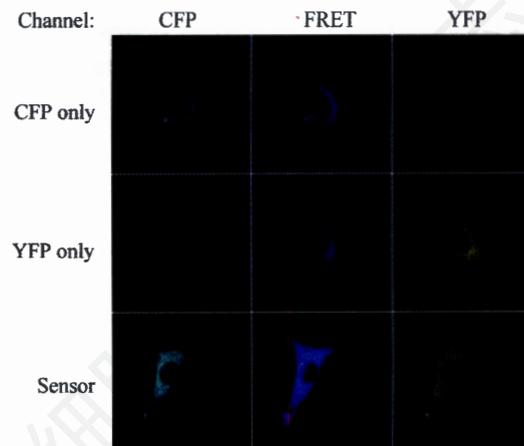


Fig.3 FRET assay of NIH/3T3 cells expressing cort-sensor

The FRET was digitally recorded to show that the cort-sensor worked perfectly. CFP only: cells transfected with CFP-Cortactin plasmid; YFP only: cells transfected with YFP-cortactin; Sensor: cells transfected with cort-sensor. CFP was viewed under a filter set with an excitation filter of 405 nm, and emission filter of 440 nm; YFP was viewed under excitation filter of 514 nm and emission filter of 560 nm. For FRET, the filter set was 405 nm for excitation and 560 nm for emission.

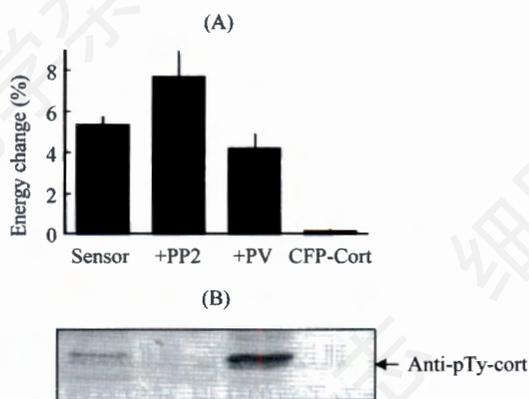


Fig.4 FRET change of cells with phosphorylation and dephosphorylation treatment

A: FRET assay of cells expressing cort-sensor to display a change of FRET in cells treated with PP2 and PV. B: Western blot assay of cortactin phosphorylation of cells with different treatments.

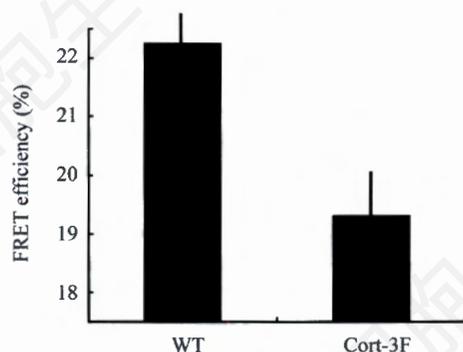


Fig.5 FRET assay of cells transfected with cort-sensor and cort-3F-sensor

WT: wild-type cortactin. Cort-3F: cortactin with mutation of phosphorylation sites

FRET 分析显示, 在 PP2 处理后, FRET 变化明显较对照组增高, 但以 PV 处理后, FRET 下降(图 4)。在传感器设计中, 我们将野生型(WT)皮层蛋白换成突变型的皮层蛋白, 即将皮层蛋白的 3 个磷酸化位点突变, 构建 cort-3F-sensor。皮层蛋白突变体(cort-3F)质粒由马里兰大学惠赠。同法观察 FRET 变化。由图 5 可见, 皮层蛋白磷酸化位点突变后, 产生的 FRET 明显较野生型皮层蛋白传感器产生的 FRET 为弱。

3 讨论

恶性肿瘤的侵袭和转移是一个多步骤的复杂过程, 然而每个步骤都离不开肿瘤细胞自身的运动。因此, 对细胞运动相关蛋白及其调控机制的了解将有助于发掘新的肿瘤治疗策略。细胞内肌动蛋白的动态装配是实现细胞运动的重要因素。这一过程依靠

ARP2/3 复合物的催化作用, 这个作用是肌动蛋白装配过程的主要限速步骤。ARP2/3 复合物促使肌动蛋白单体聚合, 并形成“Y”状分枝结构。细胞膜下的肌动蛋白“Y”状分枝动态地增加和延长, 形成一种推进力量, 促使胞膜变形、伪足形成, 最终实现细胞的迁移等运动^[1,2]。在细胞内, ARP2/3 复合物通常需要有有关因子进一步激活而发挥功能。在哺乳动物细胞, 皮层蛋白是一种新发现的重要激活因子^[3]。皮层蛋白分子量为 80/85 kDa, 其氨基端功能区参与 ARP2/3 的结合和激活。皮层蛋白的羧基端有一个 SH3 结构域。皮层蛋白通过 SH3 与其他细胞蛋白发生相互作用。在肌动蛋白聚合过程中, 皮层蛋白与 ARP2/3 在肌动蛋白丝的分叉处形成稳定的复合体^[4]。研究表明, 没有皮层蛋白的存在, 肌动蛋白丝的分枝结构及其物理强度将明显减少和削弱^[4,5], 细胞的迁移能力也明显减弱^[6]。

除了对细胞迁移的影响外, 近来研究发现, 皮层蛋白对细胞的吞噬活动发挥重要作用。有人将皮层蛋白的抗体导入肝细胞, 发现能抑制细胞对转铁蛋白的摄取(一种代表性的细胞内吞作用)^[7]。我们采用皮层蛋白 siRNA 处理乳腺癌细胞, 也发现对癌细胞的吞噬作用有明显的抑制作用^[8]。采用一种体外模型, 模拟细胞内吞初始阶段胞膜凹陷及膜性小泡的形成过程, 我们发现皮层蛋白在这一阶段发挥作用。皮层蛋白这一功能的分子机制可能与皮层蛋白和发动蛋白的相互作用有关^[9]。两个蛋白质的结合发生在皮层蛋白羧基端的 SH3 结构域和发动蛋白中的 PRD 之间^[10]。这个相互作用使皮层蛋白将细胞内肌动蛋白聚合与内吞过程联系起来, 提供该过程中胞膜变形及膜性颗粒运动的力量^[9]。

皮层蛋白对细胞运动的影响与肿瘤细胞的侵袭转移有明显的关系^[10-13]。显微分析发现, 皮层蛋白常在肿瘤细胞的侵袭性伪足(invadopodia)定位, 并参与肿瘤细胞对细胞外基质的降解^[14]。皮层蛋白对细胞运动和肿瘤转移的重要性使人对其功能的调节机制发生兴趣。先前的研究发现皮层蛋白是酪氨酸激酶 Src 的主要底物^[15]。细胞在许多情况下, 例如 PDGF 和 EGF 刺激、细胞粘附、细胞收缩及细胞吞噬等都存在皮层蛋白的酪氨酸磷酸化^[16-20]。当癌细胞过表达磷酸化缺陷的皮层蛋白突变体, 其迁移和转移能力都有下降^[10]。这些结果表明酪氨酸磷酸化对皮层蛋白功能起调节作用, 然而到目前为止, 确切的调节机制还不清楚。研究发现, 皮层蛋白的磷酸化对于

皮层蛋白激活 Arp2/3、促进肌动蛋白聚合并没有影响^[21],提示皮层蛋白的氨基端功能区不是磷酸化调节的靶标。皮层蛋白羧基端具有一个 SH3 结构域,该区域的功能主要体现在与多种细胞蛋白的相互作用,其中包括发动蛋白、CortBP1、ZO1、N-WASP、WIP、FGD1、Cd2AP 以及 MIM 等^[22,23]。从皮层蛋白的酪氨酸磷酸化位点 Y422Y466Y482 的位置来看,它们正好位于 SH3 结构域附近。我们设想皮层蛋白的 SH3 功能会不会是酪氨酸磷酸化调节的目标?我们之前的研究发现,皮层蛋白的酪氨酸磷酸化和皮层蛋白的 SH3 结构域功能必须同时具备细胞才能实现正常的内吞活动,提示皮层蛋白的 SH3 功能与皮层蛋白的磷酸化存在着关联。由于皮层蛋白的 SH3 功能主要体现在与细胞蛋白的相互作用上,我们进一步观察了酪氨酸磷酸化对于皮层蛋白和内吞重要因子发动蛋白相互作用的影响,实验发现,与没有磷酸化的皮层蛋白相比,酪氨酸磷酸化的皮层蛋白和发动蛋白的结合明显增加,说明酪氨酸磷酸化能增进皮层蛋白和发动蛋白的相互作用^[24]。由于这一相互作用发生在皮层蛋白的羧基端 SH3 和发动蛋白之间,提示皮层蛋白的 SH3 结构域是皮层蛋白磷酸化调节的目标。那么磷酸化如何会使得皮层蛋白与发动蛋白的结合力增加?我们推想皮层蛋白的磷酸化有可能使得皮层蛋白的构象发生改变,羧基端由未磷酸化时的“折叠”状态转变为磷酸化时的“展开”状态,结果使得羧基端 SH3 结构域更容易被发动蛋白等 SH3 结合蛋白接近,由此带来相互结合的增加。

FRET 是距离很近的两个荧光分子间产生的一种能量转移现象。当供体荧光分子的发射光谱与受体荧光分子的吸收光谱重叠,并且两个分子的距离在 10 nm 范围以内时,就会发生一种非放射性的能量转移,即 FRET 现象,以此可以推测细胞内分子的相互作用^[25]。本研究采用 CFP 和 YFP 作为荧光共振能量转移的供体/受体配对,与皮层蛋白的首尾相连成为 CFP-cortactin-YFP。若皮层蛋白存在“折叠”,使得 CFP 与 YFP 紧靠,便可能产生 FRET;当分子“展开”时,CFP 和 YFP 远离,FRET 便会消失。考虑到如果 CFP-cortactin-YFP 中的皮层蛋白由于受两头荧光蛋白的影响不能很好折叠,因而产生的 FRET 较弱而不易被探测,我们同时设计另一种皮层蛋白传感器:将 YFP 连接到皮层蛋白的羧基端,将 CFP 与发动蛋白的单独的 PRD 序列连接,再通过一个无意义的短肽(linker)将两者的 YFP 和 CFP 连接起来,成为 PRD-CFP-linker-YFP-cortactin (N 端)。当皮层蛋白的 SH3 在

皮层蛋白磷酸化时“展开”并和 PRD 靠近时预期能产生更强的 FRET。本实验结果显示,在 PP2 处理后,FRET 能量变化明显较对照组增高,但以 PV 处理后,FRET 下降(图 4)。皮层蛋白磷酸化位点突变后,产生的 FRET 明显较野生型皮层蛋白传感器产生的 FRET 为弱(图 5)。本研究显示,磷酸化通过改变皮层蛋白的分子构象成为调节皮层蛋白羧基端 SH3 结构域和细胞蛋白相互作用,并由此在肿瘤细胞的运动中发挥促进作用。通过本研究,我们对皮层蛋白受磷酸化调节的机制有了新的认识,研究有助于我们从分子水平认识肿瘤细胞的运动特性和侵袭转移的内机制。

参考文献(References)

- [1] Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell*, 2003, 112(4): 453-465
- [2] Small JV, Stradal T, Vignall E, et al. The lamellipodium: where motility begins, *Trends Cell Biol*, 2002, 12(3): 112-120
- [3] Uruno T, Liu J, Zhang P, et al. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin, *Nat Cell Biol*, 2001, 3(3): 259-266
- [4] Uruno T, Liu J, Li Y, et al. Sequential interaction of actin-related proteins 2 and 3 (Arp2/3) complex with neural Wiscott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cortactin during branched actin filament network formation, *J Biol Chem*, 2003, 278(28): 26086-26093
- [5] Bryce NS, Clark ES, Leysath JL, et al. Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence, *Curr Biol*, 2005, 15(2):1276-85
- [6] Somogyi K, Rorth P. Cortactin modulates cell migration and ring canal morphogenesis during *Drosophila* oogenesis, *Mech Dev*, 2004, 121(1): 57-64
- [7] Cao H, Orth JD, Chen J, et al. Cortactin is a component of clathrin-coated pits and participates in receptor-mediated endocytosis, *Mol Cell Biol*, 2003, 23(6): 2162-2170
- [8] Zhu J, Zhou K, Hao JJ, et al. Regulation of cortactin/dynamin interaction by actin polymerization during the fission of clathrin-coated pits, *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 4): 807-817
- [9] Chen L, Wang ZW, Zhu JW, et al. The role of cortactin, an actin polymerization mediator, in cell endocytosis, *Acta Biochim Biophys Sin*, 2006, 38(2):95-103
- [10] Li Y, Tondravi M, Liu J, et al. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells, *Cancer Res*, 2001, 61(18): 6906-6911
- [11] Huang J, Asawa T, Takato T, et al. Cooperative roles of Fyn and cortactin in cell migration of metastatic murine melanoma, *J Biol Chem*, 2003, 278(48): 48367-48376
- [12] Chuma M, Sakamoto M, Yasuda J, et al. Overexpression of cortactin is involved in motility and metastasis of hepatocellular carcinoma, *J Hepatol*, 2004, 41(4): 629-636
- [13] Luo ML, Shen XM, Zhang Y, et al. Amplification and overexpression of CTTN (EMS1) contribute to the metastasis of

- esophageal squamous cell carcinoma by promoting cell migration and anoikis resistance, *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11690-11699
- [14] Artym VV, Zhang Y, Seillier-Moisewitsch F, *et al.* Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function, *Cancer Res*, 2006, 66(6): 3034-3043
- [15] Huang C, Liu J, Haudenschild CC, *et al.* The role of tyrosine phosphorylation of cortactin in the locomotion of endothelial cells, *J Biol Chem*, 1998, 273(40): 25770-25776
- [16] Craig AW, Zirngibl R, Williams K, *et al.* Mice devoid of fer protein-tyrosine kinase activity are viable and fertile but display reduced cortactin phosphorylation, *Mol Cell Biol*, 2001, 21(2): 603-613
- [17] Maa MC, Wilson LK, Moyers JS, *et al.* Identification and characterization of a cytoskeleton-associated, epidermal growth factor sensitive pp60c-src substrate, *Oncogene*, 1992, 7(3): 2429-2438
- [18] Taliana L, Benezra M, Greenberg RS, *et al.* ZO-1: lamellipodial localization in a corneal fibroblast wound model, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(6): 96-103
- [19] Kapus A, Szaszi K, Sun J, *et al.* Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na⁺/H⁺ exchangers, *J Biol Chem*, 1999, 274(18): 8093-8102
- [20] Selbach M, Backert S. Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens, *Trends Microbiol*, 2005, 13(4): 181-189
- [21] Illes A, Enyedi B, Tamas P, *et al.* Inducible phosphorylation of cortactin is not necessary for cortactin-mediated actin polymerization, *Cell Signal*, 2006, 18(6): 830-840
- [22] Daly RJ. Cortactin signalling and dynamic actin networks, *Biochem J*, 2004, 382(Pt1): 13-25
- [23] Lin J, Liu J, Wang Y, *et al.* Differential regulation of cortactin and N-WASP-mediated actin polymerization by missing in metastasis (MIM) protein, *Oncogene*, 2005, 24(6): 2059-2066
- [24] Zhu J, Yu D, Zeng X, *et al.* Receptor mediated endocytosis involves tyrosine phosphorylation of cortactin, *J Biol Chem*, 2007, 282(22): 16086-16094
- [25] Mahajan NP, Linder K, Berry G, *et al.* Bcl-2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer, *Nat Biotechnol*, 1998, 16(6): 547-52

Analysis of Conformation Change of Cortactin Oncoprotein in Response to Tyrosine Phosphorylation by Fluorescence Resonance Energy Transfer

Jian-Wei Zhu^{1,2*}, Yi-Xiang Lu², Li-Lin Ma¹, Bao-Yu Huang¹, Pei-Gen Liu¹, Xu Zhan²

(¹Department of General Surgery, ²Clinical Medical Research Center, Affiliated Hospital Nantong University, Nantong 226001, China)

Abstract Oncoprotein cortactin is a substrate of tyrosine phosphorylation kinase Src. So far it is still not fully understood about the mechanism of phosphorylation of cortactin. The purpose of this study is to probe the conformation change of cortactin in response to phosphorylation. Bio-sensor of cortactin using cyan fluorescence protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP) was first designed. Cortactin DNA was inserted into plasmid MGIN and transfected NIH/3T3 cells. Expression was examined and analyzed by fluorescence resonance energy transfer (FRET). Cells were then treated with pervanadate (PV) and PP2. FRET change was recorded before and after treatment. Meanwhile, F-mutant cortactin was in place of wild type cortactin in the biosensor to observe the change of FRET after cell treatment. Biosensor of cortactin worked effectly in cells. The FRET was increased after PP2 treatment of cells and decreased after PV treatment in comparison with the controls. When wild type cortactin was replaced by F-mutant one in the sensor, FRET was attenuated compared to the wild type one. Thus, cortactin molecule might be changed to an 'unfolded' conformation after phosphorylation and more available for cell proteins to interact.

Key words cortactin; phosphorylation; conformation

Received: July 18, 2009 Accepted: August 24, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30771126), the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry (2008-890), and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2006058)

*Corresponding author. Tel: 86-513-81161221, E-mail: usazhujianwei@yahoo.com.cn