基础研究

靶向人 CPNE7 可变剪接异构体的鼠源抗血清制备与应用鉴定

王彬睿[1]，马中琪[2]，常 峥[3]，李艳萍[1]，周欢思[1]，金明静[1]，赵黎梅[3]，颜健华[2]，卢春花[1,3]

（1. 广西中医药大学附属国际壮医医院 壮瑶医药研究实验室，广西 南宁 530200；2. 广西大学 医学院，广西 南宁 530004；3. 南宁市第一人民医院 医学实验中心，广西 南宁 530021）

[摘 要] **目的** 钙依赖性膜结合蛋白 7（CPNE7）的关键可变剪接异构体在多种肿瘤中异常表达，为深入研究其功能，本研究拟制备一种能特异性同时识别 CPNE7-FL 与 CPNE7-S 两种主要可变剪接异构体的鼠源抗血清。**方法** 基于生物信息学筛选 CPNE7 异构体的共同保守序列，设计并合成肽段免疫 8 只 BALB/c 小鼠制备抗血清，通过间接 ELISA 测定抗血清效价。随后，构建 CPNE7 原核表达载体并建立 A549 细胞过表达体系，采用 Western blot 验证抗血清的特异性。**结果** 成功获得效价达 1∶320 00 的抗血清。Western blot 结果表明，该抗血清能有效识别原核表达的 GST-CPNE7 融合蛋白，并能在真核细胞中检测到过表达的 CPNE7-FL 与 CPNE7-S 异构体。**结论** 本研究成功制备了高效价、高特异性的抗人 CPNE7 抗血清，为后续开展 CPNE7 异构体表达谱分析、功能研究及其在肿瘤诊疗中的作用提供有效的研究工具。

[关键词] 钙依赖性膜结合蛋白 7；可变剪接；抗血清；抗体制备
[中图法分类号] R392.12 [文献标志码] A [文章编号] 2096-8159（2026）06-0596-09

Preparation and characterization of mouse antiserum targeting human CPNE7 alternative splice isoforms

Wang Binrui[1], *Ma Zhongqi*[2], *Chang Zheng*[3], *Li Yanping*[1], *Zhou Huansi*[1], *Jin Mingjing*[1], *Zhao Limei*[3], *Yan Jianhua*[2], *Lu Chunhua*[1,3]

（1. Department of Laboratory of Zhuang and Yao Medicine, Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi 530200, China; 2. College of Medicine, Guganxi University, Nanning Guangxi 530004, China; 3. Medical Experimental Center, The First People's Hospital of Nanning, Nanning Guangxi 530021, China）

[**Abstract**] **Objective** Aberrant expression of key alternative splice isoforms of calcium-dependent membrane-binding protein 7（CPNE7）has been observed in various cancers. To facilitate functional studies, this study aims to generate a mouse-derived antiserum capable of specifically recognizing both major splice variants, CPNE7-FL and CPNE7-S. **Methods** Conserved sequences shared among CPNE7 isoforms were identified by bioinformatic analysis, and synthetic peptides were designed and used to immunize eight BALB/c mice to prepare antiserum. The antiserum titer was determined by indirect ELISA. Subsequently, a prokaryotic expression vector for CPNE7 was constructed and an A549 overexpression system was established, and the specificity of the antiserum was verified by Western blot. **Results** A high-titer antiserum with a dilution of up to 1∶32 000 was successfully obtained. Western blot results showed that the antiserum effectively recognized recombinant GST－CPNE7 fusion proteins in E. coli and detected the overexpressed CPNE7-FL and CPNE7-S isoforms in mammalian cells. **Conclusion** A high-titer and high-specificity mouse antiserum against human CPNE7 was successfully prepared. This antiserum provides a valuable tool for future studies on the expression patterns and biological functions of

[基金项目]广西自然科学基金重点项目（NO:2018GXNSFDA050009）。
[通信作者]卢春花，女，博士，研究员，研究方向：肿瘤相关功能基因及抗肿瘤药物作用机制，E-mail：chl-bb@163.com。

CPNE7 isoforms, laying a foundation for exploring their potential roles in cancer diagnosis and therapy.
[**Key words**] calcium-dependent membrane-binding protein 7; alternative splicing; antiserum; antibody production

可变剪接(alternative splicing, AS)广泛存在于人类基因表达调控中,AS 失调几乎涉及肿瘤发生发展的各个环节,包括促进增殖、抑制凋亡、增强迁移侵袭、耐药与免疫逃逸等,被认为是肿瘤形成的关键分子事件之一[1-3]。因此,针对由 AS 产生的特定蛋白异构体开发研究工具,对于深入理解其生物学功能及肿瘤相关作用机制具有重要意义。

钙依赖性磷脂结合蛋白(calcium-dependent phospholipid-binding protein, CPNE)家族是一类钙依赖性膜结合蛋白,在哺乳动物中有 9 个成员(CPNE1 ~9),其典型结构由 N 端两个 C2 结构域(C2A/C2B)与 C 端 A-domain 样结构域组成,能够感应 Ca^{2+} 并与带负电的膜磷脂相互作用,以此参与膜转运、囊泡交通及信号转导等生物过程[4-6]。CPNE7 是该家族的重要成员,在发育与上皮分化中发挥关键作用。研究表明,CPNE7 由釉原上皮分泌,可诱导间充质细胞向成牙本质细胞分化[7],并通过与细胞表面受体 nucleolin 结合,调控原纤毛形成及分化信号[8-9]。近年来,CPNE7 在多种肿瘤中被发现异常高表达,尤其在结直肠癌中显著上调,与不良预后相关[10-12]。功能实验显示,CPNE7 可通过与 PKM2、NONO 等分子互作,分别激活 MAPK 信号通路或促进 ZFP42 转录,从而促进肿瘤细胞增殖、迁移与转移[11-12]。敲低 *CPNE7* 能增强结直肠癌细胞对 5-氟尿嘧啶的敏感性,提示其在化疗反应调控中具有潜在价值[12]。本课题组长期关注 CPNE 家族多个成员在肺癌发生发展中的作用,针对该家族关键成员开发特异性研究工具是系统研究的重要基础。

然而,目前对 CPNE7 不同可变剪接异构体的功能分化与调控机制尚缺乏系统研究,关键瓶颈在于缺乏能够同时识别 CPNE7-FL 与 CPNE7-S 两种主要异构体的特异性抗血清工具[13]。为此,本研究基于 CPNE7 异构体序列特征设计并合成多肽抗原,以 BALB/c 小鼠为模型制备抗血清,并通过 ELISA 与 Western blot 验证其效价与特异性,为进一步研究 CPNE7 异构体的表达分布及生物学功能提供实验基础,也为其在肿瘤诊断与治疗中的应用奠定技术支持[14]。

1　材料与方法

1.1　*实验材料*　实验所用人肺腺癌上皮细胞 A549 购自中国科学院细胞库,E. coli DH5α 及 E. coli BL21 购自上海生工生物工程有限公司,慢病毒(CPNE7-FL-FLAG 与 CPNE7-S-FLAG)由吉玛基因科技有限公司合成。DMEM 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自 Gibco 公司;Opti-MEM Ⅰ、Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司;氢氧化铝佐剂购自 MCE 公司;异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)购自 Sigma 公司;蛋白质相对分子质量(Mr)标准、PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司;聚凝胺、辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗、RIPA 裂解液、青霉素、链霉素、嘌呤霉素、胰蛋白酶细胞消化液、抗体稀释液、ECL 化学发光检测试剂盒购自 Beyotime 公司。6 ~8 周龄 BALB/c 雄性小鼠由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。本研究动物实验方案经广西大学实验动物伦理委员会审批通过(NO:GXU-2022-166),所有实验均遵循实验动物伦理相关规范进行。

1.2　*方法*

1.2.1　生物信息学分析　在 Ensembl 数据库(https://www.ensembl.org)检索人类 *CPNE7* 基因,获得其主要可变剪接异构体 NM_014427.5(CPNE7-FL)与 NM_153636.3(CPNE7-S)。比较两种转录本的外显子结构,识别缺失区域并确定可变剪接模式。

1.2.2　序列比对与二级结构预测　在 Clustal Omega(https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo)在线工具中将 CPNE7-FL 与 CPNE7-S 的氨基酸序列进行多序列比对,分析保守结构域差异。利用 ESPript 3.0(https://espript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi)对 CPNE7 序列保守性与二级结构进行整合分析。

1.2.3　剪接事件与表达谱分析　通过 TCGA SpliceSeq 数据库(http://bioinformatics.mdanderson.org/TCGASpliceSeq)分析 CPNE7 在不同癌种

中的可变剪接事件及 PSI 值(外显子在转录本中的包含比例,反映剪接事件在不同样本间的相对使用水平)分布;结合人类蛋白质图谱数据库(human protein atlas, HPA),分析其在各肿瘤组织中的表达模式。

1.2.4　抗原片段设计与合成　比对 CPNE7-FL 和 CPNE7-S 蛋白异构体的氨基酸序列,筛选出在主要转录本中高度保守且不涉及可变剪接的区域作为候选抗原表位。由苏州强耀生物科技有限公司负责合成偶联,并选取氨基酸序列合成多肽与载体蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)偶联以增强其免疫原性,同时与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)偶联多肽,用于后续 ELISA 检测与抗血清筛选。

1.2.5　小鼠免疫与抗血清制备　选用 8 只 6 ~ 8 周龄、体质量 18 ~ 22 g 的雄性 BALB/c 小鼠。按每只 25 μg 抗原剂量,首次免疫将合成的 CPNE7 多肽-KLH 偶联物与铝佐剂(体积比 9∶1)充分混匀并吸附,制备 200 μL 免疫混悬液,经背部多点皮下注射实施免疫;后续加强免疫继续采用铝佐剂制备免疫混悬液。共进行 3 次免疫,每次间隔 14 d。在终末取血前进行末次加强免疫,以进一步提高抗体滴度和特异性。每次免疫后通过尾静脉采血获取血清,采用间接 ELISA 方法检测抗体效价变化,对免疫应答水平进行动态监测。根据 ELISA 检测结果,筛选抗体反应较高且稳定的小鼠个体血清用于后续实验分析。末次免疫后 7 ~ 10 d,在麻醉下心脏取血,室温静置 1 h 后,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,分离血清并于 -80 ℃保存备用。

1.2.6　ELISA 测定抗血清效价　采用间接 ELISA 法测定抗血清效价。将 CPNE7 多肽-BSA 偶联物以 0.1 μg/孔包被 96 孔酶标板,4 ℃过夜孵育。弃包被液后用 PBST 洗涤 3 次,加入 200 μL 5% BSA 封闭液,于 37 ℃孵育 2 h。再以 1∶500 ~ 1∶64 000 梯度稀释的小鼠血清为一抗,37 ℃孵育 1 h,洗涤后加入 HRP 标记抗鼠 IgG(二抗,1∶5 000),37 ℃孵育 45 min。经洗涤后加显色液反应,测定各孔 OD 值,计算抗血清效价。以抗血清与阴性对照比值(P/N)≥2.1,阴性对照 OD_{450} 值 < 0.2 为阳性判定标准,据此确定抗血清的最高阳性稀释倍数作为其效价。各检测点均设置平行重复孔,结果取平均值。

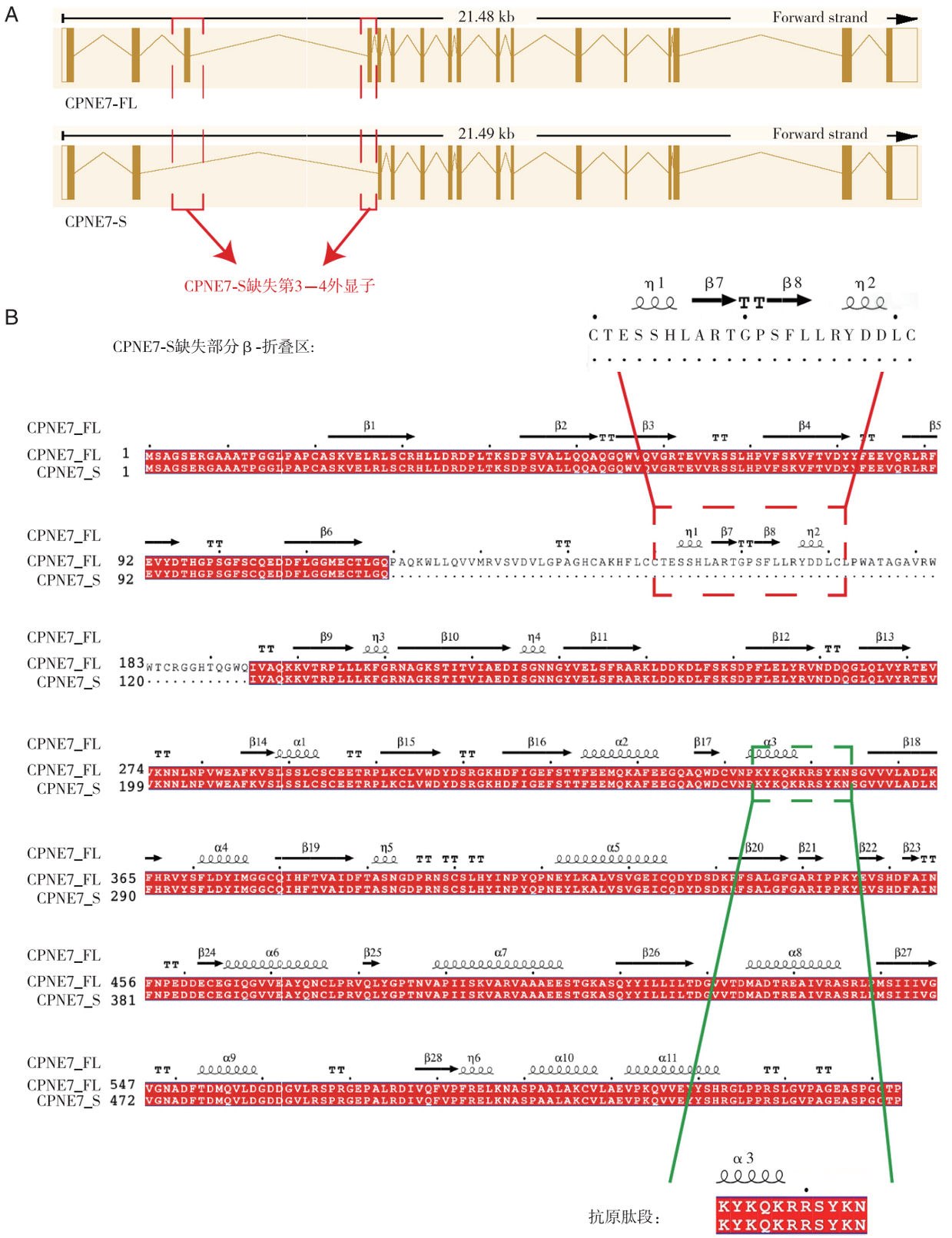
1.2.7　载体构建与蛋白提取　将 CPNE7-FL 与 CPNE7-S 编码序列分别克隆至 pGEX-4T-1 载体,在 N 端融合 GST 标签。测序鉴定正确的重组质粒经 E. coli DH5α 扩增后转入 E. coli BL21 菌株,在含 100 mg/L Ampicillin 的 LB 培养基中 37 ℃培养。细胞生长至 OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时,加入 0.5 mmol/L IPTG,于 20 ℃诱导过夜。收集菌体后超声裂解,12 000 × *g*、4 ℃离心 20 min,取上清用于后续分析。

1.2.8　Western blot　蛋白样品经 12% 分离胶、5% 浓缩胶 SDS-PAGE 分离,部分胶用于考马斯亮蓝染色评估目标蛋白分子质量及表达水平,其余转移至 0.45 μm PVDF 膜。膜以 5% 脱脂奶粉 TBST 封闭 1 h,加入自制 CPNE7 抗血清(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,TBST 洗涤后加入 HRP-标记抗鼠 IgG(1∶5 000)于室温孵育 1 h,经 ECL 显色检测并成像记录。为进一步验证,切取与理论分子质量一致的蛋白条带,经脱色和胰蛋白酶酶解后,采用 MALDI-TOF MS/MS 鉴定。

1.2.9　过表达细胞系的制备及抗血清应用　由吉玛基因科技有限公司合成 CPNE7-FL-FLAG 与 CPNE7-S-FLAG 慢病毒,在 N 端融合 FLAG 标签。选取 A549 细胞,于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。待细胞融合度达 40% ~ 60% 时,加入含有 8 mg/L 聚凝胺的病毒感染液进行感染,24 h 后更换为新鲜培养基。感染 72 h 后加入 2 mg/L 嘌呤霉素进行筛选,持续约 1 周,获得稳定表达 FLAG 标记 CPNE7-FL 或 CPNE7-S 的 A549 过表达细胞系。细胞融合度达 80% ~ 90% 时更换培养基,PBS 洗涤后用裂解液裂解 20 min,于 4 ℃、12 000 × *g* 离心 20 min,取上清测定蛋白浓度并于 -80 ℃保存。所得蛋白样品用于 Western blot 分析。

2　结果

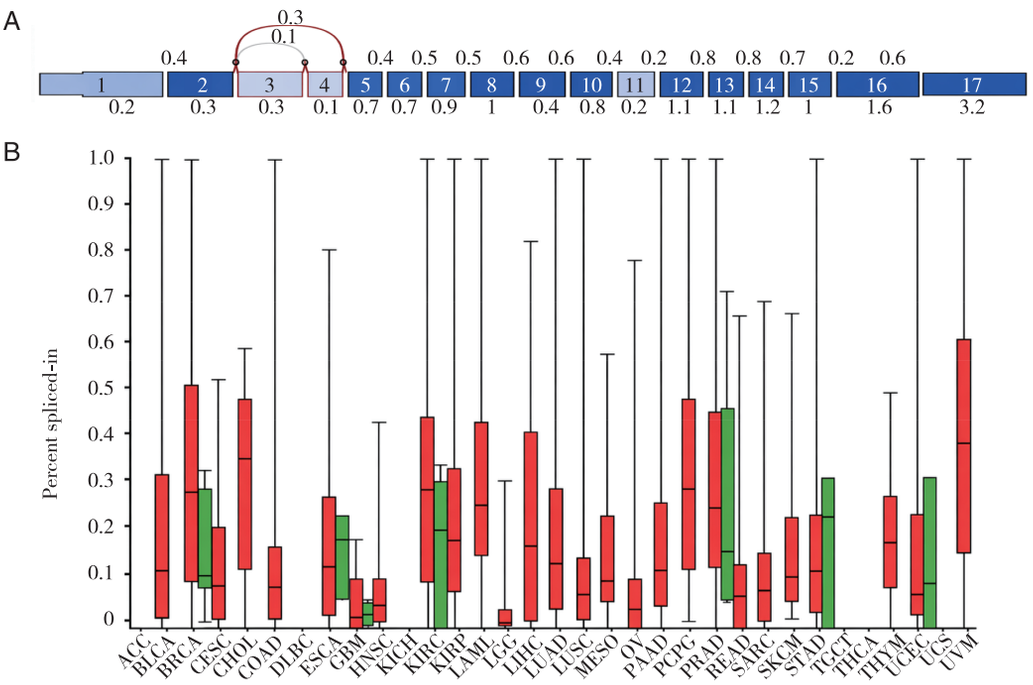
2.1　*转录本与蛋白结构分析*　人类 *CPNE7* 基因通过可变剪接产生功能不同的主要异构体, Ensembl 数据库检索显示,存在两种编码蛋白的转录本:CPNE7-FL(全长型,NM_014427.5)和 CPNE7-S(缺失型,NM_153636.3),后者缺失第 3 -4 外显子(图 1A)。序列比对表明,两者在主要功能结构域区域高度保守,但 CPNE7-S 缺失部分 β-折叠区(图 1B),可能影响局部构象稳定性。第 344 - 354 位氨基酸序列“KYKQKRRSYKN”在上述两种主要异构体中未涉及可变剪接(图 1B),因此被选作抗原肽段用于抗血清制备。



A:CPNE7-FL 与 CPNE7-S 转录本结构对比,黄色方块表示外显子,黑色连线表示内含子区域,箭头表示转录方向,与 CPNE7-FL 相比,CPNE7-S 缺失第 3－4 外显子(红色标记区域);B:CPNE7-FL 与 CPNE7-S 二级结构比对,红色高亮区域表示两种异构体共有的氨基酸序列,红色虚线方框标示由于可变剪接导致缺失的 β-折叠结构区域,绿色方框标示所筛选的抗原肽段。

图 1　CPNE7 转录本及序列分析

2.2　肿瘤中的剪接事件与表达谱分析　TCGA SpliceSeq 数据库分析表明，*CPNE7* 基因第 3 – 4 外显子存在外显子跳跃事件，形成 CPNE7-S 转录本（图 2A）。该事件在多种肿瘤中具有一定发生率，不同癌种间 PSI 值存在差异，提示 CPNE7 在不同组织来源的肿瘤中具有特异的可变剪接模式，可能与肿瘤发生发展密切相关（图 2B）。结合 HPA 数据库分析发现，CPNE7 在多种肿瘤组织中均有不同程度的阳性表达，其中淋巴瘤呈中至强阳性；甲状腺癌及部分结直肠癌、卵巢癌、睾丸癌和皮肤癌呈中等强阳性，而肝癌、宫颈癌、子宫内膜癌表达较低（图 3）。其中，肺癌组织呈中低水平表达，A549 细胞本底表达较低，适合作为过表达验证模型。以上结果提示，CPNE7 在不同肿瘤组织中异常表达，其可变剪接异构体可能与组织特异性功能及肿瘤进展相关。



A：*CPNE7* 基因外显子结构，蓝色方块表示外显子（Exon 1 ~ 17），连线表示内含子，红色标记表示外显子 3 – 4 跳跃事件，对应剪接异构体 CPNE7-S；B：不同癌种中 CPNE7 外显子 3 – 4 跳跃事件的 PSI 值分布，横坐标为肿瘤类型（TCGA），纵坐标为 PSI 值（0 ~ 1），红色表示肿瘤组织，绿色表示正常组织，箱线图显示数据分布及中位数。

图 2　CPNE7 外显子可变剪接事件分析

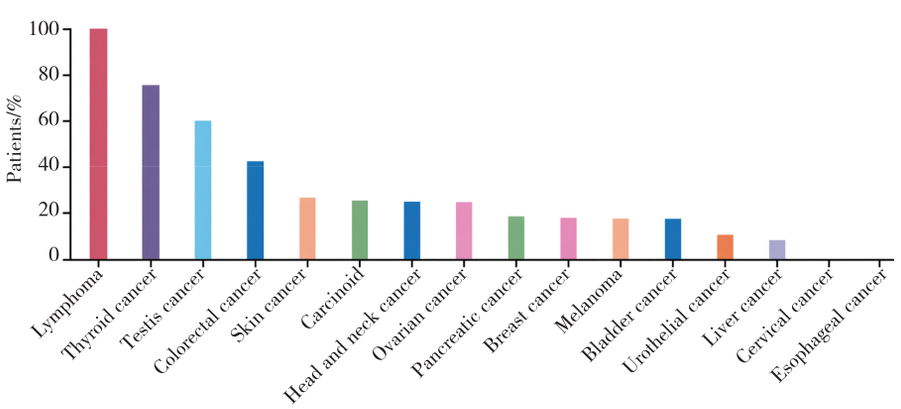


图 3　CPNE7 蛋白在不同肿瘤组织中阳性表达比例

2.3　CPNE7 抗血清效价检测　将 KLH-CK-YKQKRRSYKN 肽免疫小鼠，采集免疫鼠的血清作为抗血清，进行梯度稀释后，以 BSA-CKYKQKRRSYKN 肽段作为包被抗原，用间接 ELISA 对抗血清的血清效价进行测定。以抗血清与阴性对照比值（P/N）≥ 2.1 且阴性对照 OD_{450} 值 < 0.2 为阳性判定标准，据

此确定所制备的抗血清的最大滴度达到 1∶32 000（图 4），所制备的抗血清具有较高免疫反应性和良好的特异性识别能力，可用于后续的蛋白表达与功能研究。

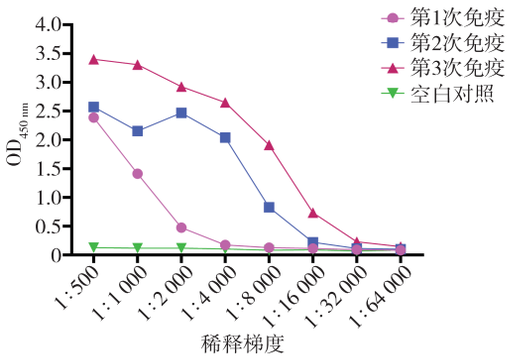
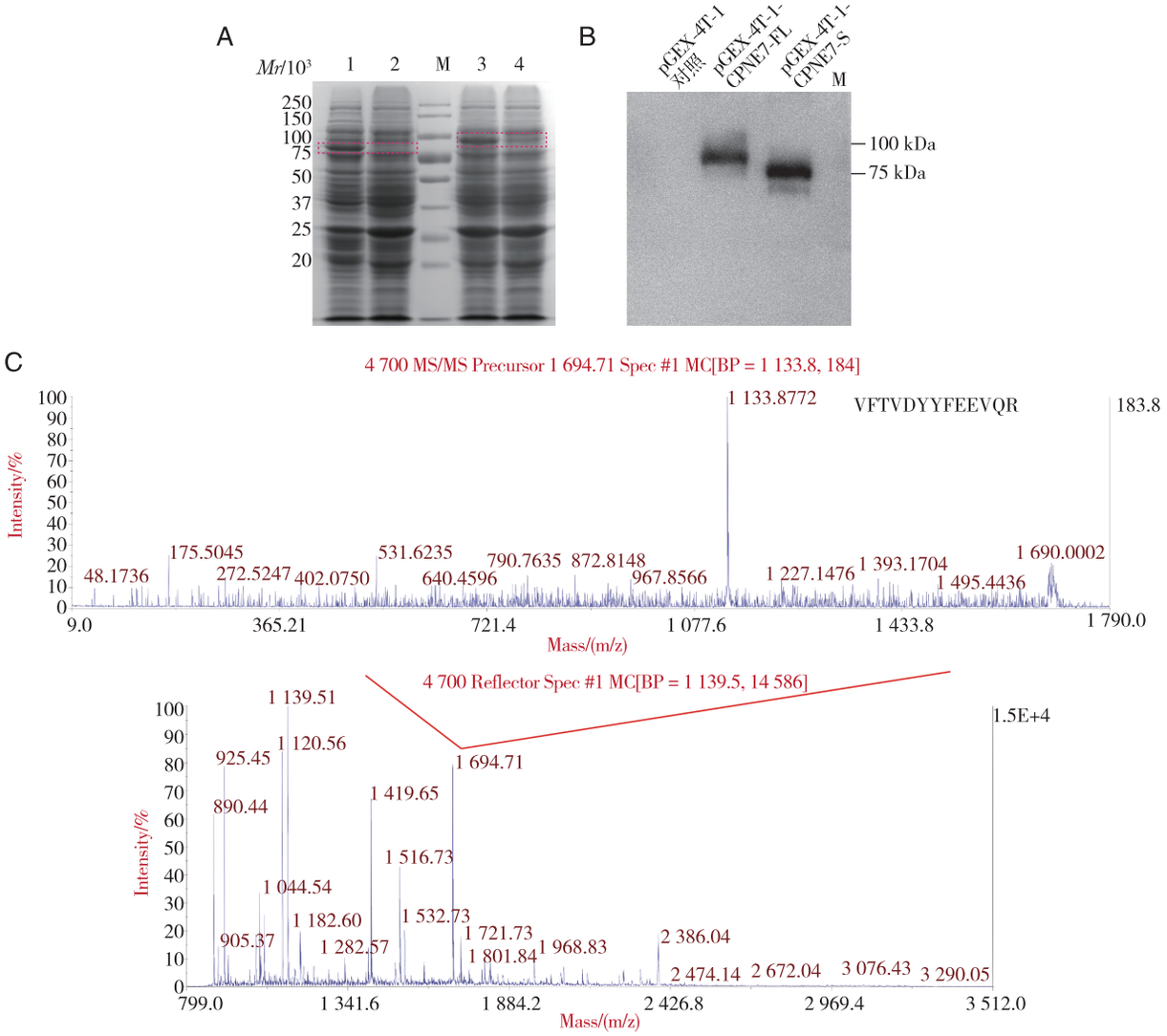


图 4　抗 CPNE7 抗血清 ELISA 效价曲线

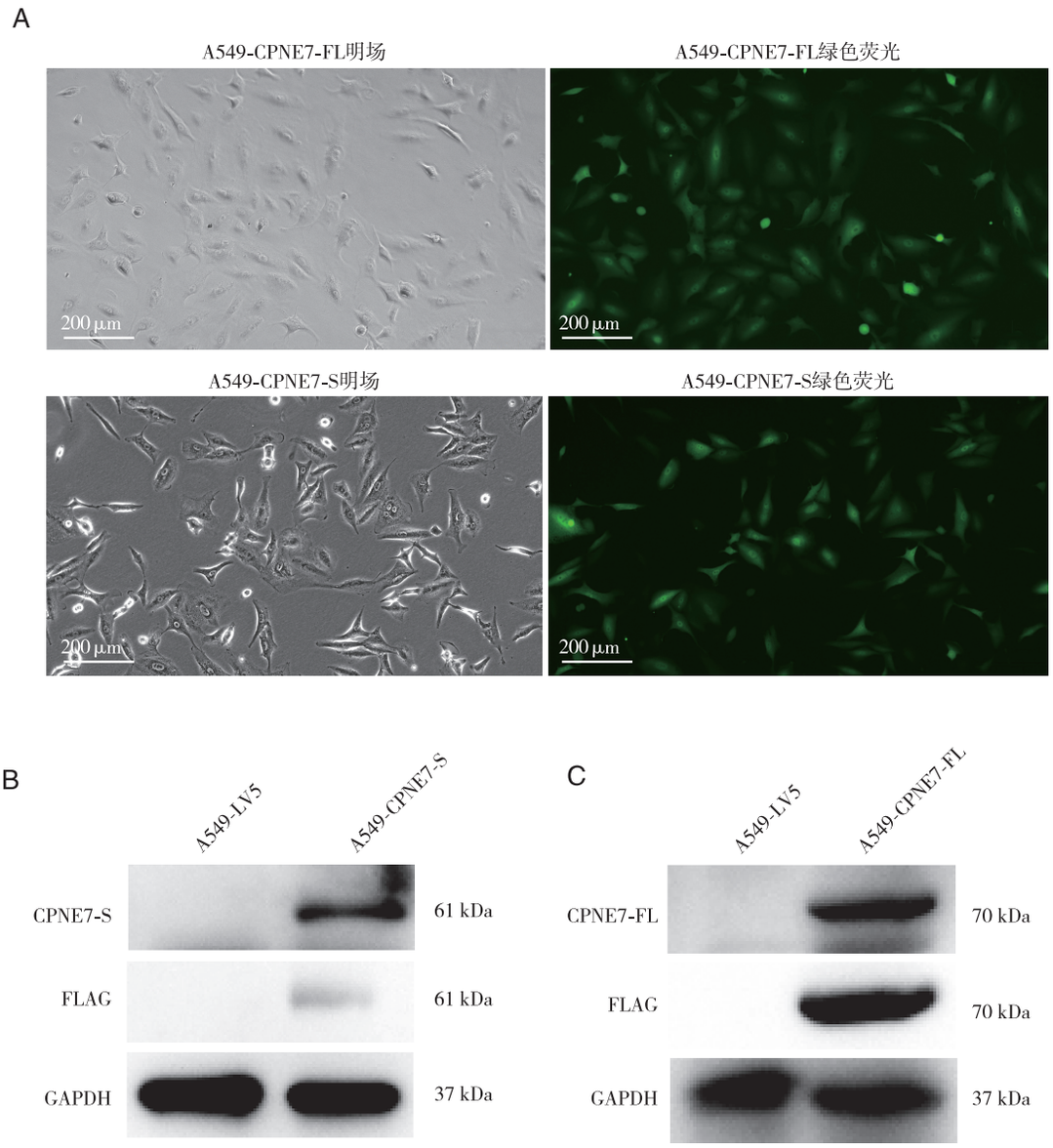
2.4　原核表达与抗血清验证　收集 IPTG 诱导表达后的菌体进行蛋白提取，并通过 12% SDS-PAGE 分离后以考马斯亮蓝染色观察到在 pGEX-4T-1-CPNE7-S 目的分子质量（87 kDa）pGEX-4T-1-CPNE7-FL 目的分子质量（96 kDa）附近出现特异性条带（图 5A），MALDI-TOFMS/MS 鉴定，结果显示所得肽段与 CPNE7 蛋白序列高度一致（图 5C），确认该条带确系 CPNE7 重组蛋白。Western blot 检测，结果表明自制 CPNE7 抗血清能够在理论分子量处识别出特异性条带。其中，GST-CPNE7-S 原核表达蛋白理论分子质量约为 87 kDa，GST-CPNE7-FL 原核表达蛋白约为 96 kDa，而空载体菌未检测到条带（图 5B），该抗血清具有良好的特异性与应用价值。



A：GST-CPNE7 蛋白 SDS-PAGE 图（泳道 1：pGEX-4T-1-CPNE7-S 诱导后；泳道 2 和泳道 4：pGEX-4T-1-CPNE7 诱导前；泳道 3：pGEX-4T-1-CPNE7-FL 诱导后；泳道 M：蛋白质 Mr marker）；B：Western blot 检测 CPNE7 抗体识别 CPNE7-S 及 CPNE7-FL 原核表达蛋白；C：质谱鉴定 GST-CPNE7 蛋白质谱图。

图 5　CPNE7 原核表达与抗血清应用

2.5　过表达细胞系构建与验证　A549 细胞经慢病毒感染并稳定整合后，成功获得 CPNE7-FL-FLAG 与 CPNE7-S-FLAG 的过表达细胞株。蛋白质提取后进行 Western blot 检测，结果显示在目的蛋白分子质量位置出现与理论值相符且信号强度明显高于对照组的特异性条带，且相应的 FLAG 抗体验证亦显示阳性结果（图 6）。



A：A549-CPNE7 过表达细胞显微镜成像；B：Western blot 检测 CPNE7 抗血清识别 A549 中过表达的 CPNE7-S 蛋白，以 GAPDH 作为内参对照；C：Western blot 检测 CPNE7 抗血清识别 A549 中过表达的 CPNE7-FL 蛋白，以 GAPDH 作为内参对照。

图 6　CPNE7 过表达细胞系与抗血清应用

3　讨论

本研究围绕 *CPNE7* 基因的可变剪接异构体开展系统性研究，结合生物信息学分析与实验验证，明确了 CPNE7 主要存在 2 种转录本：全长型 CPNE7-FL 与缺失型 CPNE7-S。有研究表明可变剪接在肿瘤发生中广泛失调[3, 15]，本研究生物信息学结果显示，短转录本缺失第 3－4 外显子，导致部分 β－折叠结构缺失，该剪接事件在多种肿瘤组织中频繁发生，肿瘤组织 PSI 值存在差异，且 CPNE7 总体表达在多癌种中呈阳性，由此推测 CPNE7 的可变剪接与其在肿瘤发生发展中的作用密切相关[15-17]。

在此基础上,本研究选择了上述两种主要异构体中高度保守的氨基酸序列“KYKQKRRSYKN”作为免疫抗原,并成功制备获得针对 CPNE7 的抗血清。该抗血清可同时识别 CPNE7-FL 与 CPNE7-S 两种异构体,在 Western blot 实验中均可检测到与理论分子质量一致的特异性条带。结合结构生物学分析,CPNE7-S 缺失的第3 – 4 外显子区域对应部分 β-折叠区,可能影响 C2 结构域的空间稳定性,从而削弱其 Ca^{2+} 依赖性膜结合能力及蛋白相互作用界面[4, 6]。CPNE7-FL 含有完整的 C2A/C2B 结构域,可感应 Ca^{2+} 并与带负电的膜磷脂相互作用;而 CPNE7-S 结构域缺失可能导致膜结合能力下降或信号转导特性改变。结合文献报道,CPNE7 可通过与 PKM2、NONO 等分子互作调控 MAPK 及转录网络通路[11-12, 18],推测 CPNE7 的可变剪接可能通过改变其相互作用蛋白谱和亚细胞定位,进而影响肿瘤细胞的代谢调控、迁移和药物耐受性。

蛋白功能研究高度依赖于稳定且特异的研究工具的建立。已有研究通过原核表达系统成功获得重组蛋白,并结合活性检测与虚拟筛选策略,筛选出具有功能调控作用的小分子抑制剂,为相关蛋白的功能研究及药物开发提供了重要基础[19]。

本研究成功获得了可识别 CPNE7 两种主要异构体的抗血清,但仍存在一定局限性。由于 A549 细胞内源性 CPNE7 表达水平较低,可在低背景条件下清晰地评估抗血清对目标蛋白的识别能力,从而有效避免内源性表达差异及非特异性条带对结果判读的干扰。同时,该体系可分别构建 CPNE7-FL 与 CPNE7-S 两种异构体的表达模型,有助于直接验证抗血清对不同剪接异构体的识别能力。后续研究将利用 Raji(淋巴瘤)或 NTERA-2(睾丸癌)等细胞系,进一步评估该抗血清对内源 CPNE7 蛋白的识别效果。并且,目前主要验证了抗血清在 Western blot 中的应用效果,尚未在免疫组化、免疫荧光或免疫沉淀等实验中系统评估其适用性。此外,尽管本研究制备的抗血清在过表达体系中具有良好的识别性能,但在多种细胞系中未能检测到内源性 CPNE7 蛋白。本研究在肝癌 HepG2 及肺癌 H1299 等常用细胞系中进行了检测,均未观察到明确的内源性特异性条带。其原因可能与 CPNE7 在上述细胞系中整体表达水平较低,或抗体识别的线性表位在天然构象中暴露不足有关。由此推测,该抗血清目前主要适用于 CPNE7 过表达体系的相关研究(如功能恢复实验),其在内源性检测中的应用仍需借助免疫沉淀等高灵敏度技术进一步验证。同时,本研究对 CPNE7 异构体功能差异的推测主要基于生物信息学与结构分析,尚缺乏细胞及动物水平的实验证据。未来研究可在此基础上进一步优化抗体制备策略,开发能够区分特定异构体的单克隆抗体或通过抗体工程提高特异性与稳定性。同时也利用该抗体系统研究 CPNE7 异构体在不同癌种及分期组织中的表达分布,并结合细胞与动物模型阐明其在肿瘤发生、转移及药物反应中的具体作用。

[参考文献]

[1] Bradley R K, Anczukow O. RNA splicing dysregulation and the hallmarks of cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2023, 23(3): 135-155.

[2] Zhang Y, Qian J, Gu C, et al. Alternative splicing and cancer: a systematic review[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021,6(1): 78.

[3] Kahles A, Lehmann K V, Toussaint N C, et al. Comprehensive analysis of alternative splicing across tumors from 8,705 patients[J]. Cancer Cell, 2018,34(2): 211-224.

[4] Creutz C E, Tomsig J L, Snyder S L, et al. The copines, a novel class of C2 domain-containing, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins conserved from Paramecium to humans[J]. J Biol Chem, 1998,273(3): 1393-1402.

[5] Khvotchev M, Soloviev M. Copines, a family of calcium sensor proteins and their role in brain function[J]. Biomolecules, 2024,14(3):255.

[6] Tang H, Pang P, Qin Z, et al. The CPNE family and their role in cancers[J]. Front Genet, 2021,12: 689097.

[7] 杨玥,赵溟昱,谢旭东,等. Copine7 蛋白在牙、牙周组织发育与再生中的作用[J]. 口腔医学, 2023,43(7): 647-651.

[8] Seo Y M, Park S J, Lee H K, et al. Copine-7 binds to the cell surface receptor, nucleolin, and regulates ciliogenesis and Dspp expression during odontoblast differentiation[J]. Sci Rep, 2017,7(1):11283.

[9] Park S H, Lee Y S, Lee D S, et al. CPNE7 Induces biological dentin sealing in a dentin hypersensitivity model [J]. J Dent Res, 2019,98(11): 1239-1244.

[10] Kong H J, Kang D H, Ahn T S, et al. The Role of CPNE7 (Copine-7) in colorectal cancer prognosis and metastasis[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(23):16704.

[11] Yu T, Huang C, Lai C, et al. Copine 7 promotes color-

ectal cancer proliferation through PKM2 interaction and MAPK signaling pathway[J]. Front Oncol, 2023,13:1166444.

[12]Zhao L, Sun X, Hou C, et al. CPNE7 promotes colorectal tumorigenesis by interacting with NONO to initiate ZFP42 transcription[J]. Cell Death Dis, 2024,15(12):896.

[13]陈谱,张敏,赵曼. 2 型糖尿病患者血清抗核抗体的检测及临床意义[J]. 遵义医科大学学报, 2021,44(4):504-507.

[14]蒙光雪,马洪,廖德仲.可变剪接在基因转录中的作用机制及其在头颈部鳞状细胞癌中的研究进展[J].新医学,2023,54(3):172-176.

[15]Ryan M, Wong W C, Brown R, et al. TCGASpliceSeq a compendium of alternative mRNA splicing in cancer[J]. Nucleic Acids Res, 2016,44(D1): D1018-D1022.

[16]Tang Z, Kang B, Li C, et al. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis[J]. Nucleic Acids Res, 2019,47(W1): W556-W560.

[17]Chandrashekar D S, Karthikeyan S K, Korla P K, et al. UALCAN: an update to the integrated cancer data analysis platform[J]. Neoplasia, 2022,25: 18-27.

[18]Ji X, Sun T, Xie S, et al. Upregulation of CPNE7 in mesenchymal stromal cells promotes oral squamous cell carcinoma metastasis through the NF-kappaB pathway[J]. Cell Death Discov, 2021,7(1): 294.

[19]宋煜,李海涛,邵敏,等. 蛋白质二硫键异构酶 a3 的表达纯化、活性测定与小分子抑制剂的筛选[J]. 遵义医科大学学报, 2022,45(6):775-781.

[收稿 2026-03-17;修回 2026-04-29]

(编辑:陈　婷)

(上接第 595 页)

[15]Eid W, Dauner K, Courtney K C, et al. mTORC1 activates SREBP-2 by suppressing cholesterol trafficking to lysosomes in mammalian cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2017,114(30):7999-8004.

[16]Fan S, Wang Y, Wang C, et al. Hepatocyte-specific deletion of LASS2 protects against diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance[J]. Free Radic Biol Med, 2018,120:330-341.

[17]Raichur S, Wang S T, Chan P W, et al. CerS2 haploinsufficiency inhibits β-oxidation and confers susceptibility to diet-induced steatohepatitis and insulin resistance[J]. Cell Metab, 2014,20(4):687-695.

[18]Clayton-Chubb D, Kemp W, Majeed A, et al. Understanding NAFLD: from case identification to interventions, outcomes, and future perspectives[J]. Nutrients, 2023,15(3):687.

[19]Xie R, Liu M. Relationship between non-alcoholic fatty liver disease and degree of hepatic steatosis and bone mineral density[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022,13:857110.

[20]Manikat R, Nguyen M H. Nonalcoholic fatty liver disease and non-liver comorbidities[J]. Clin Mol Hepatol, 2023,29(Suppl):s86-s102.

[21]Bauer R, Voelzmann A, Breiden B, et al. Schlank, a member of the ceramide synthase family controls growth and body fat in Drosophila[J]. EMBO J, 2009,28(23):3706-3716.

[22]Meng C, Zhou L, Huang L, et al. Chlorogenic acid regulates the expression of NPC1L1 and HMGCR through PXR and SREBP2 signaling pathways and their interactions with HSP90 to maintain cholesterol homeostasis[J]. Phytomedicine, 2024,123:155271.

[23]Weinberg S E, Chandel N S. Mitochondria reactive oxygen species signaling-dependent immune responses in macrophages and T cells[J]. Immunity, 2025,58(8):1904-1921.

[24]Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs[J]. Cell Death Differ, 2015,22(3):377-388.

[25]Yang B, Shen M, Lu C, et al. RNF144A inhibits autophagy by targeting BECN1 for degradation during L. monocytogenes infection[J]. Autophagy, 2025,21(4):789-806.

[26]Yang Y, Liu X, Yang D, et al. Interplay of CD36, autophagy, and lipid metabolism: insights into cancer progression[J]. Metabolism, 2024,155:155905.

[收稿 2026-04-13;修回 2026-05-19]

(编辑:陈　婷)