·专题研究：生殖医学·

PUS7通过mRNA假尿嘧啶化调控胚胎发育过程中神经谱系分化平衡

王新新[1,2]，黄伯贤[1,2*]，陆嘉逢[1*]

[1]苏州市立医院生殖遗传中心，南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室苏州分中心，江苏　苏州　215002；[2]南京医科大学生殖医学与子代健康全国重点实验室，江苏　南京　211166

［摘　要］ **目的：**探究假尿嘧啶合成酶7（pseudouridine synthase 7，PUS7）对小鼠胚胎干细胞（mouse embryonic stem cell，mESC）神经谱系分化的影响，并解析mRNA假尿嘧啶化在该过程中的调控作用。**方法：**采用CRISPR/Cas9技术构建*Pus7*敲除小鼠胚胎干细胞模型，并通过qRT-PCR、Western blot、免疫荧光、CCK-8及细胞周期流式分析等方法检测*Pus7*缺失对mESC多能性、增殖能力和细胞周期分布的影响；结合拟胚体（embryoid body，EB）分化、神经外胚层定向分化系统评估*Pus7*缺失对谱系分化倾向的影响，同时进行亚硫酸盐诱导缺失测序（bisulfite-induced deletion sequencing，BID-seq）与转录组测序（RNA sequencing，RNA-seq）差异分析及通路富集分析，筛选潜在的mRNA假尿嘧啶化调控靶基因。**结果：***Pus7*敲除未显著破坏mESC核心多能性网络，但导致细胞增殖能力下降，并伴随G1期延长。敲除细胞在拟胚体自发分化过程中表现为外胚层（包含神经外胚层）相关程序增强；在神经外胚层定向分化过程中，表现为神经祖细胞程序增强，而神经元细胞成熟相关程序受限。BID-seq与RNA-seq联合分析显示部分神经连接相关转录本如神经连接蛋白3（neurexin 3，Nrxn3）、去整合素样金属蛋白酶23（ADAM metallopeptidase domain 23，Adam23）、丛蛋白D1（plexin D1，Plxnd1）、溶质载体家族1成员1（solute carrier family 1 member 1，Slc1a1）、UNC-51样自噬激活激酶4（UNC-51 like autophagy activating kinase 4，Ulk4）和Abelson辅助整合位点1（Abelson helper integration site 1，Ahi1）同时出现假尿嘧啶修饰水平下降和mRNA表达下调。**结论：***Pus7*缺失通过延长G1期增强mESC向神经外胚层分化的倾向，并通过降低神经连接相关mRNA的假尿嘧啶化及表达水平，导致神经祖细胞程序增强而后续成熟相关程序受阻，引起胚胎发育过程中神经谱系分化失衡。

［关键词］ *Pus7*；小鼠胚胎干细胞；神经谱系分化；mRNA假尿嘧啶化

［中图分类号］ Q813　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1007-4368（2026）10-1437-13

doi：10.7655/NYDXBNSN260301

PUS7 regulates the balance of neural lineage differentiation during embryonic development through mRNA pseudouridylation

Wang Xinxin[1,2], Huang Boxian[1,2*], Lu Jiafeng[1*]

[1]Reproductive Genetics Center Suzhou Municipal Hospital, State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health (Suzhou Centre), Nanjing Medical University, Suzhou 215002; [2]State Key Laboratory of Reproductive Medicine and Offspring Health, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

［**Abstract**］ **Objective:** To investigate the role of pseudouridine synthase 7 (PUS7) in neural lineage differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs) and to elucidate the involvement of mRNA pseudouridylation in this process. **Methods:** A *Pus7*-knockout mESC model was generated using CRISPR/Cas9. qRT-PCR, Western blotting, immunofluorescence, CCK-8 assays, and flow cytometric cell-cycle analysis were performed to evaluate the effects of *Pus7* deficiency on pluripotency, proliferative capacity, and cell-cycle distribution in mESCs. Embryoid body (EB) differentiation and directed neural ectoderm differentiation were conducted to systematically assess the impact of *Pus7* deficiency on lineage differentiation propensity. Differential bisulfite-induced deletion

［基金项目］ 国家自然科学基金（92168104，82071720）

*通信作者（Corresponding author），E-mail：13770601687@163.com（ORCID：0009-0009-4087-5825）；huangboxiannj@163.com（ORCID：0000-0001-9913-9077）

sequencing(BID-seq)and RNA sequencing(RNA-seq)analyses, together with pathway enrichment analysis, were further performed to identify potential mRNA pseudouridylation-regulated target genes. **Results:** *Pus7* knockout did not markedly disrupt the core pluripotency network of mESCs but led to reduced cell proliferative capacity accompanied by G1-phase prolongation. During spontaneous EB differentiation, *Pus7*-deficient cells exhibited enhanced ectoderm-related programs, particularly neuroectodermal programs. During directed neural ectoderm differentiation, *Pus7* deficiency enhanced neural progenitor cell programs, whereas maturation-related programs of neurons were impaired. Integrated BID-seq and RNA-seq analyses revealed that a subset of neural connectivity-related transcripts, such as neurexin 3(Nrxn3), ADAM metallopeptidase domain 23(Adam23), plexin D1(Plxnd1), solute carrier family 1 member 1(Slc1a1), unc-51 like autophagy activating kinase 4(Ulk4), and Abelson helper integration site 1(Ahi1), displayed concurrent reductions in pseudouridylation and mRNA expression. **Conclusion:** *Pus7* deficiency prolongs the G1 phase, enhances the neuroectodermal differentiation propensity of mESCs, and reduces the pseudouridylation and expression of neural connectivity-related mRNAs, thereby promoting neural progenitor cell programs while impairing subsequent maturation and disrupting the balance of neural lineage differentiation during embryonic development.

[**Key words**] *Pus7*; mouse embryonic stem cells; neural lineage differentiation; mRNA pseudouridylation

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(10): 1437-1449]

胚胎发育是一个由细胞增殖、谱系承诺与组织重塑精细耦合的连续过程，胚胎干细胞在此过程中既要维持短暂的多能性状态，又需在恰当时间退出干性并进入特定谱系。近年来研究表明，除脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)和转录因子网络外，核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)层面的表观转录组调控同样发挥关键作用[1]。例如，N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)修饰参与naïve多能性向分化状态的转换[2-3]；转运RNA N7-甲基鸟苷修饰(transfer RNA N7-methylguanosine modification, tRNA m7G)通过影响翻译程序参与干细胞命运调控及自我更新过程[4-5]；N4-乙酰胞苷(N4-acetylcytidine, ac4C)、5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, m5C)及2′-O-甲基化等修饰分别从翻译效率、RNA加工等角度参与发育相关程序调控[6-8]。因此，从RNA修饰层面解析胚胎干细胞命运选择的转录后机制，已成为发育生物学研究的重要方向。

假尿嘧啶(pseudouridine, Ψ)是RNA上最常见的化学修饰之一，广泛存在于核糖体RNA(ribosomal RNA, rRNA)、tRNA、小核RNA(small nuclear RNA, snRNA)及mRNA中，在细胞谱系命运决定中具有重要作用。不同于m7G、ac4C、m5C等发生于核苷酸碱基侧链的修饰，Ψ修饰并非简单的化学基团添加，而是通过异构化将尿嘧啶碱基与核糖之间原有的N1-C1′糖苷键转变为更稳定的C5-C1′碳-碳键。这一结构改变可显著影响RNA的物理化学性质，增强RNA局部结构稳定性，并改变RNA-蛋白相互作用，从而参与剪接、翻译、RNA稳定性及应激应答等过程[9]。随着高通量测序技术的发展，研究人员逐渐认识到mRNA和前体信使RNA(precursor messenger RNA, pre-mRNA)上的Ψ并非偶发现象，而是可随细胞状态变化而动态重塑、并参与mRNA加工调控的转录后标记[10]。由于Ψ修饰属于RNA分子的转录后化学修饰，并不改变基因组DNA序列或mRNA的碱基编码顺序，因此不会像DNA突变直接导致固定的氨基酸序列变异，但编码区Ψ仍可能通过改变局部RNA结构、密码子识别、翻译保真度或终止密码子识别等过程[9,11-12]，间接影响蛋白表达和翻译结果。假尿嘧啶合成酶(pseudouridine synthase 7, PUS7)不仅能够修饰tRNA，还可参与pre-mRNA/mRNA上的Ψ沉积，从而具备同时影响转录后加工与翻译调控的潜力[10,13]。

近年来，人类遗传学和功能研究显示PUS7与神经系统发育密切相关。*Pus7*双等位基因致病变异可导致智力障碍、语言发育迟缓、小头畸形及攻击行为，并表明相关变异可削弱PUS7对tRNA和mRNA底物的修饰能力[14-15]；在独立家系中进一步验证了*Pus7*突变与智力障碍、进行性小头的关联，并检测到患者tRNA上Ψ13修饰显著缺失[16]；另外，有研究指出*Pus7*缺失患者的复杂神经发育表型可能与帽依赖性翻译失衡有关[17]。此外，干细胞和肿瘤体系中的研究表明，PUS7可通过转运RNA及其衍生片段(transfer RNA/tRNA-derived fragment, tRNA/tRF)相关机制参与翻译控制[18-19]；对成熟神经系统的研究显示，PUS7依赖的Ψ动态变化与突触相关基因外显子加工及学习记忆有关[20]。这些结果共同提示，

PUS7既可能通过tRNA-翻译轴发挥作用，也可能通过mRNA/pre-mRNA上的Ψ修饰直接调控神经相关转录本命运。

尽管已有证据支持PUS7与神经系统异常相关，但PUS7在早期神经谱系分化中的作用机制以及mRNA Ψ化在其中的作用尚不清楚。由于体内胚胎发育过程复杂，难以直接解析细胞自主性作用，本研究采用小鼠胚胎干细胞(mouse embryonic stem cell，mESC)体外拟胚体自发分化与神经外胚层定向分化体系，结合亚硫酸盐诱导缺失测序(bisulfite-induced deletion sequencing，BID-seq)和转录组测序(RNA sequencing，RNA-seq)联合分析，系统评估*Pus7*缺失对神经谱系分化的影响，并探讨其与mRNA Ψ化调控之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所使用的细胞系为mESC(中国科学院动物研究所)，相关细胞实验均按照实验室生物安全和细胞培养规范开展。

细胞培养相关试剂：高糖培养基(Dulbecco's modified eagle medium，DMEM)、DMEM/F12培养基、Neurobasal培养基、N2添加剂、B27添加剂(Gibco公司，美国)；CHIR99021、PD325901(Selleck公司，美国)；白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor，LIF)(Sigma公司，美国)；基质胶Matrigel(Corning公司，美国)以及全反式维甲酸(retinoic acid，RA)(MCE公司，美国)。RNA提取与检测相关试剂：TRIzol试剂(TaKaRa公司，日本)、HiScript Ⅲ qRT SuperMix反转录试剂盒、2×ChamQ SYBR qPCR Green Master Mix(南京Vazyme公司)。细胞周期检测相关试剂：核糖核酸酶A(ribonuclease A，RNase A)与碘化丙啶(propidium iodide，PI)(上海Sangon公司)。

转录组文库构建使用VAHTS Universal V10 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina(南京Vazyme公司)。免疫检测相关抗体：PUS7、SRY-box转录因子1(SRY-box transcription factor 1，SOX1)(上海Abcam公司)；SOX2、NANOG同源盒蛋白(NANOG homeobox，NANOG)抗体、Kruppel样因子4(Krüppel-like factor 4，KLF4)、配对盒基因6(paired box 6，PAX6)、八聚体结合转录因子4(octamer-binding transcription factor 4，OCT4)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH)(武汉Proteintech公司)。二抗包括：Goat Anti-Rabbit IgG H&L(合肥Biosharp公司)、Goat Anti-Mouse IgG H&L(武汉Abclonal公司)、Donkey Anti-Rabbit IgG(H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody、Alexa Fluor™ 488(Invitrogen公司，美国)。

1.2 方法

1.2.1 mESC培养与形态学观察

野生型(wild type，WT) mESC和*Pus7*基因敲除(*Pus7*-knockout，*Pus7*-KO) mESC均在含2i/LIF的N2B27体系中，于37 ℃、5% CO_2培养箱内维持培养。细胞密度达到约80%时使用温和消化液传代，并确保两组在相同起始密度和相近传代数下进行后续实验。于倒置显微镜下观察克隆边界、细胞大小及整体克隆形态，并拍摄代表性图像。通过这些指标评估*Pus7*缺失是否导致明显的基础状态异常。

1.2.2 细胞转染

采用Lonza电转体系进行CRISPR/Cas9相关质粒转染。每次取约1.0×10^6个细胞，加入Cas9质粒和双单导向RNA(single guide RNA，sgRNA)载体，按照电转仪说明书程序完成电转。转染后恢复培养，通过基因型PCR筛选阳性克隆。

1.2.3 *Pus7*基因敲除mESC构建

采用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建Pus7-KO mESC模型。在*Pus7*基因第2和第3外显子区域设计2条sgRNA，其靶向序列分别为5′-GCGCAGGAAGTGACGTCTCC-3′和5′-CACC-TGACTTTTTCACCTCA-3′，诱导目标区域300 bp片段切除，导致编码序列发生移码突变，从而造成*Pus7*基因功能丧失。将Cas9及sgRNA相关质粒通过电转方式导入WT mESC后，使用嘌呤霉素筛选3 d，以富集转染阳性细胞。药筛结束后继续培养，待细胞状态稳定并达到合适密度后，通过流式分选获得单细胞克隆。随后对候选单克隆细胞进行扩增培养，提取基因组DNA并进行PCR扩增，通过琼脂糖凝胶电泳初步鉴定基因型，并进一步采用测序确认目标片段缺失情况。WT mESC作为对照。用于基因敲除的sgRNA序列及基因型鉴定引物序列见表1。

1.2.4 Western blot实验

RIPA裂解液提取蛋白质。BCA法定量后加入上样缓冲液，于98 ℃变性10 min。蛋白样品经SDS-PAGE分离后，转移至PVDF膜，5%脱脂奶粉溶液封闭1 h，加入一抗4 ℃孵育过夜，再加HRP标记二抗(1∶5 000)室温孵育1 h，ECL化学发光液显色并采集图像。检测蛋白主要包括PUS7、OCT4、SOX2、NANOG、KLF4和PAX6(1∶2 000)，以Tubu-

表1　敲除细胞株鉴定所用引物序列

Table 1　Primer sequences used for identification of knockout cell lines

Name	Primer sequence(5′→3′)
Pus7 identification primer	Forward: AGTATAGAAGTGCATGTGCTCCA
	Reverse: AGTCACCCTTTAGTTAAGCACAGA
Gapdh	Forward: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	Reverse: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

lin、GAPDH(1∶5 000)作为内参。

1.2.5　RNA提取

细胞经TRIzol裂解后进行氯仿抽提和异丙醇沉淀，75%乙醇洗涤RNA沉淀后，用无RNA酶水溶解。采用NanoDrop检测RNA浓度和纯度，合格样品分装放置于−80 ℃保存，用于后续qPCR和测序。

1.2.6　荧光定量PCR

使用TRIzol试剂提取总RNA，测定RNA浓度。取1 μg总RNA，使用HiScript Ⅲ Q RT SuperMix试剂盒逆转录为cDNA。采用SYBR Green体系进行实时荧光定量PCR，*Gapdh*作为内参。引物覆盖多能性相关基因(*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*、*Klf4*)、三胚层相关基因(*Sox1*、*Pax6*、*Bmp4*、*Kdr*、*Sox17*、*Gata4*)、神经分化相关基因(*Sox1*、*Pax6*、*Map2*、*Ncam1*、*Aldh1l1*)及候选神经连接基因(*Nrxn3*、*Adam23*、*Plxnd1*、*Slc1a1*、*Ulk4*、*Ahi1*)。每个样本设置技术重复，使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量，并在至少3次独立生物学重复基础上进行统计分析。引物序列见表2。

1.2.7　CCK-8检测

以每孔2 000个细胞的密度接种于96孔板，分别在接种后6、24、48 h加入CCK-8工作液，37 ℃孵育30 min后于450 nm处读取吸光度。根据吸光度变化评估不同时间点的细胞活力和增殖趋势。

1.2.8　细胞周期检测

细胞接种于6孔板后，于指定时间点收集并以70%乙醇固定。固定细胞经FACS buffer清洗后，加入含RNase A和PI的染色液，在37 ℃避光孵育30 min。样本上机后选择PE通道收集PI荧光信号，并利用FlowJo软件拟合细胞周期分布，统计G1、S和G2/M期比例。

1.2.9　拟胚体(embryoid body，EB)形成

采用悬滴法建立EB分化体系。将单细胞悬液调整至2 000个/25 μL，滴加于培养皿盖上形成悬滴；第2天将形成的EB转入低吸附培养板继续培养，并分别在d0、d3和d5进行形态观察与样本收集。使用明场显微镜记录EB大小、边缘紧密程度及碎屑情况。收集样本用于RNA提取、qRT-PCR和RNA-seq，以分析三胚层和多能性相关基因的表达动态。

1.2.10　神经祖细胞定向分化

Matrigel预包被培养板，室温放置1 h，接种mESC后以N2B27神经诱导培养基培养，并于诱导第2天加入RA启动神经外胚层定向分化。RA储备液浓度为10 mmol/L，每孔取2 μL储备液加入N2B27培养基中，使培养体系终体积为2 mL，RA终浓度为10 μmol/L。分别在d0、d3和d5收集样本，用于形态观察、RNA/蛋白检测和流式分析。

1.2.11　细胞免疫荧光与流式分析

将细胞接种于包被的培养板中，4%多聚甲醛固定后以0.1% Triton X-100通透，使用含BSA和正常血清的封闭液封闭后加入SOX1一抗(1∶200)，4 ℃孵育过夜。次日洗涤后加入荧光二抗(1∶1 000)，DAPI或Hoechst(1∶1 000)复染细胞核并封片，在荧光显微镜下采集图像。为定量分析SOX1阳性细胞比例，分化细胞消化为单细胞悬液后按类似流程进行胞内染色，使用流式细胞仪检测信号，FlowJo软件统计SOX1阳性率。

1.2.12　RNA-seq建库和BID-seq建库

用TRIzol法提取总RNA，用于RNA-seq和BID-seq的建库。RNA-seq文库使用商业试剂盒VAHTS Universal V10 RNA-seq Library Prep Kit for Illumina，按说明书完成构建，并在Illumina平台进行双端测序。BID-seq文库参照文献报道的BID建库方法完成[21]，重点用于检测神经诱导阶段Ψ修饰差异。生物信息学分析包括质量控制、比对、表达量矩阵构建、差异分析、PCA及GO富集等。使用DESeq2包进行RNA-seq差异表达分析，差异基因筛选用Benjamini-Hochberg方法进行校正，判定标准为$P < 0.05$且$|\log_2 \text{fold change(FC)}| \geq 1$。BID-seq使用limma进行差异假尿嘧啶修饰化分析，并用Benjamini-Hochberg方法对多重检验结果进行FDR校正，差异Ψ化基因位点筛选标准为假发现率(false discovery rate，FDR)<0.05且$|\log_2 FC| \geq 1$。后续使用clusterProfiler包进行GO富集分析，富集结果用Benjamini-Hochberg校正，显著性判断标准为$P < 0.05$。

表2 qRT-PCR引物序列

Table 2 Sequence of qRT-PCR primers

Gene	Primer sequence（5′→3′）
Nanog	Forward：TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT
	Reverse：GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
Oct4	Forward：CGGAAGAGAAAGCGAACTAGC
	Reverse：ATTGGCGATGTGAGTGATCTG
Klf4	Forward：GTGCCCCGACTAACCGTTG
	Reverse：GTCGTTGAACTCCTCGGTCT
Sox2	Forward：GCGGAGTGGAAACTTTTGTCC
	Reverse：CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT
Sox1	Forward：AGACAGCGTGCCTTTGATTT
	Reverse：TGGGATAAGACCTGGGTGAG
Pax6	Forward：TACCAGTGTCTACCAGCCAAT
	Reverse：TGCACGAGTATGAGGAGGTCT
Bmp4	Forward：TTCCTGGTAACCGAATGCTGA
	Reverse：CCTGAATCTCGGCGACTTTTT
Kdr	Forward：TTTGGCAAATACAACCCTTCAGA
	Reverse：GCAGAAGATACTGTCACCACC
Sox17	Forward：GATGCGGGATACGCCAGTG
	Reverse：CCACCACCTCGCCTTTCAC
Gata4	Forward：CCCTACCCAGCCTACATGG
	Reverse：ACATATCGAGATTGGGGTGTCT
Ncam1	Forward：GACAGAACCCGAAAAGGGC
	Reverse：GTTGGGGACCGTCTTGACTT
Map2	Forward：GCCAGCCTCAGAACAAACAG
	Reverse：AAGGTCTTGGGAGGGAAGAAC
Aldh1l1	Forward：CAGGAGGTTTACTGCCAGCTA
	Reverse：CACGTTGAGTTCTGCACCCA
Nrxn3	Forward：TGGGCTGCCTTAAAGAGGTTG
	Reverse：GGGGTCTCAAAGTTGATGGGA
Adam23	Forward：CGTCCTTCTCCTGCTACCTG
	Reverse：TGATAGGGGCTTTCTGAGTCC
Plxnd1	Forward：GAGCAAGCGCAACATACAGC
	Reverse：GGCTACAGTCAGCACTCGC
Slc1a1	Forward：CTTCCTACGGAATCACTGGCT
	Reverse：CGATCAGCGGCAAAATGACC
Ulk4	Forward：TAACTGGGATATACGGTCCAAGG
	Reverse：TGTGATCGCCTCGATAACAGG
Ahi1	Forward：AAGCAGTCGCTCAGTAAGGG
	Reverse：CTCGGTCCTCCACGTTTTGAT

1.3 统计学方法

实验数据采用GraphPad Prism 10、FlowJo及R语言相关软件进行分析。定量数据表示为均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）。单一时间点两组间比较使用双侧非配对Student's *t*检验；同一实验中多个基因的两组间比较使用多重独立样本*t*检验，并进行FDR校正。涉及两个因素的实验使用two-way ANOVA，并用Šídák's multiple comparisons test进行组间多重比较。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 *Pus7*敲除mESC模型的构建与验证

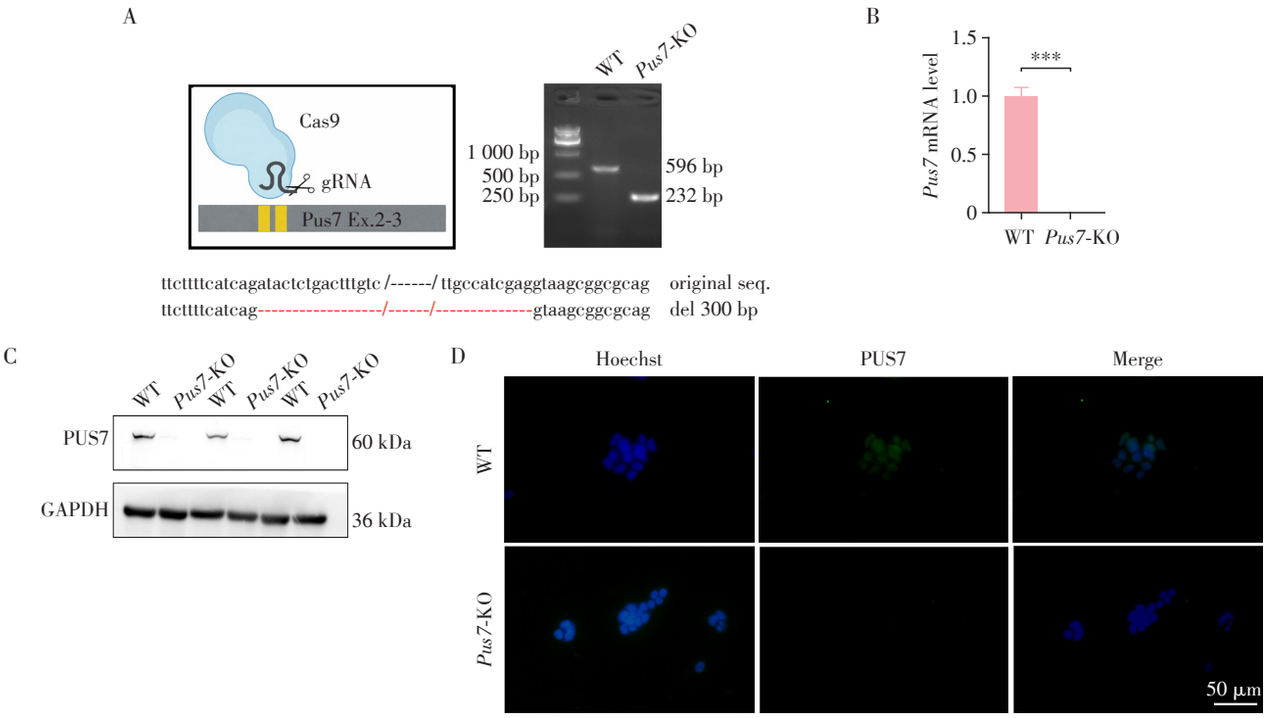
为明确PUS7在mESC命运调控中的作用，本研究首先采用CRISPR/Cas9技术敲除*Pus7*基因第2和第3号外显子并引入后续移码，建立*Pus7*敲除mESC模型（图1A）。基因组PCR及琼脂糖凝胶电泳结果显示，KO细胞出现与预期大小一致的特异性条带，而WT细胞保留完整扩增片段，测序结果显示目标区域300 bp已被成功切除。该结果从基因组水平初步证明了*Pus7*敲除细胞系构建成功。

在此基础上，进一步从RNA和蛋白两个层面验证*Pus7*的敲除效果。qRT-PCR检测结果显示，*Pus7*-KO细胞中*Pus7* mRNA表达完全缺失（图1B）；Western blot结果同样证实KO组PUS7蛋白表达缺失（图1C）；免疫荧光染色结果也显示KO细胞内未检测到PUS7阳性信号（图1D）。这些结果均表明，*Pus7*-KO细胞中PUS7表达的完全缺失，已成功构建稳定可靠的*Pus7*敲除mESC模型。

2.2 *Pus7*敲除未显著破坏mESC核心多能性网络，但导致G1期延长

在2i/LIF维持条件下，WT与*Pus7*-KO mESC均可形成边界较清晰、排列相对致密的胚胎干细胞样克隆（图2A），表明*Pus7*缺失未明显破坏mESC的典型克隆形态。为进一步评价多能性状态，检测了*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*和*Klf4*核心多能性因子的表达。根据qRT-PCR结果，KO组*Oct4*、*Nanog*和*Klf4*转录水平与WT组相比未见显著下降，但*Sox2* mRNA略有下降（图2B）。在Western blot结果中，多能性核心因子蛋白总体维持稳定：SOX2、NANOG、KLF4在两组间无显著差异，OCT4蛋白出现一定程度上调（图2C、D）。因此，尽管*Pus7*敲除可引起部分多能性因子在RNA或蛋白层面的轻微波动，但整体上mESC的多能性状态仍可在2i/LIF条件下维持，未见明显多能性受损表型。以上结果表明，*Pus7*敲除不直接破坏mESC的核心干性网络，其后续产生的表型更可能来源于基础细胞状态改变以及命运转换能力异常，而非由多能性受损所致。

尽管多能性未受到显著影响，但*Pus7*-KO细胞在培养过程中表现出生长减慢的特征，克隆体积较WT偏小（图2A）。CCK-8检测结果显示，两组细胞



A: Schematic diagram showing the generation of the *Pus7*-KO mESC line. B: qRT-PCR analysis of *Pus7* mRNA levels in WT and *Pus7*-KO mESC, $^{***}P < 0.001$ (n=3). C: Western blot analysis of PUS7 protein levels in WT and *Pus7*-KO mESC (n=3). D: Immunofluorescence analysis of PUS7 expression in WT and *Pus7*-KO mESC (n=3); Hoechst was used for nuclear staining (blue), and PUS7 was shown in green. Scale bar=50 μm.

图1　*Pus7*敲除mESC系的构建及验证

Figure 1　Generation and validation of *Pus7* knockout in mESC

在接种后6 h时吸光度无明显差异；但在24 h和48 h时，KO组细胞活力明显低于WT组（图2E），表明*Pus7*敲除并未影响初始贴壁与早期存活状态而是抑制了mESC增殖。进一步通过流式细胞仪分析了细胞周期变化。与WT组相比，*Pus7*-KO细胞G1期比例升高，S期比例下降，而G2/M期比例变化不明显（图3F、G），已知mESC通常具有较短G1期和较快的增殖速度[22-24]，因此本研究中*Pus7*敲除后mESC的基础细胞状态已发生改变。

2.3　*Pus7*敲除促进EB分化过程中外胚层谱系倾向

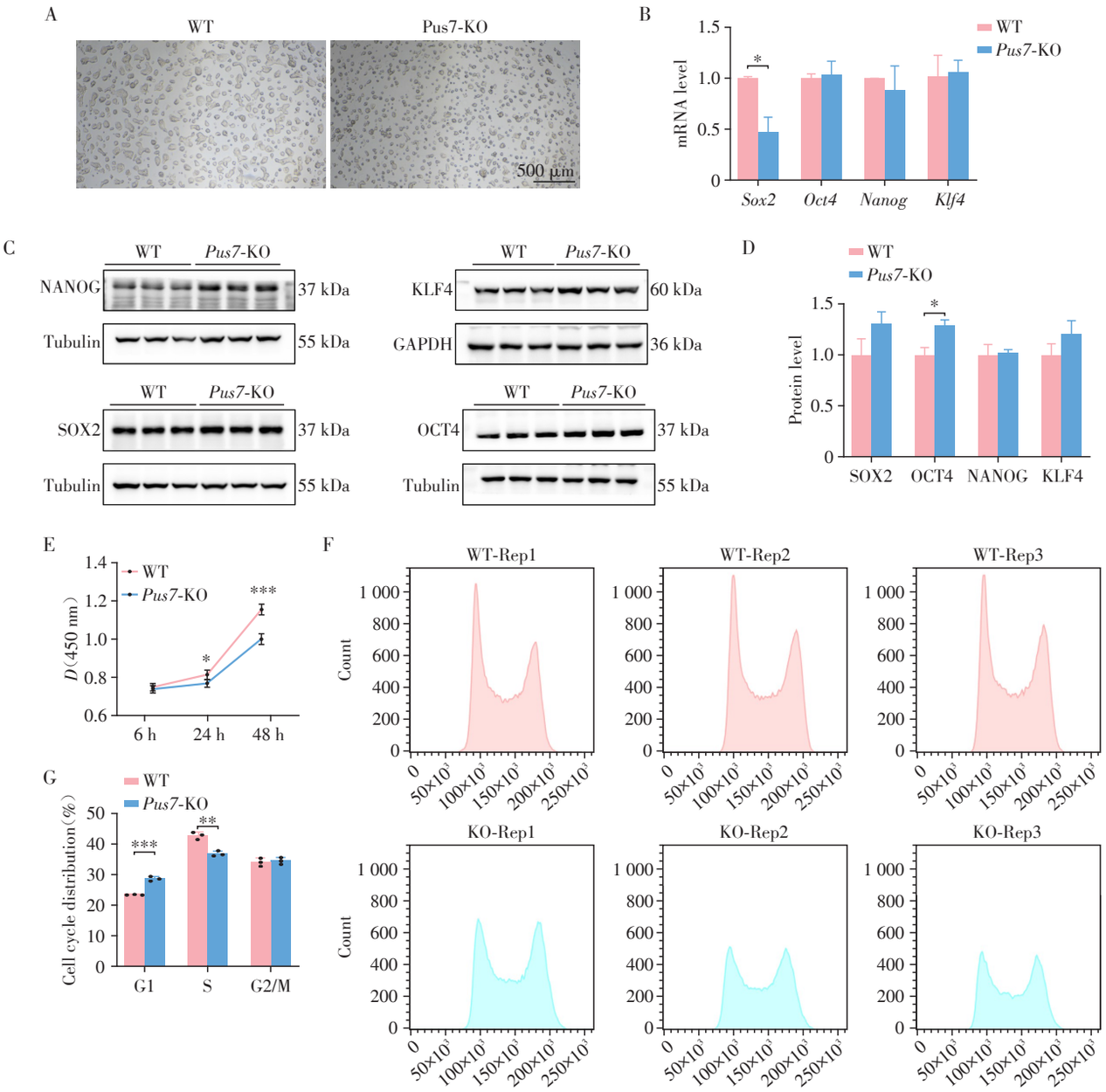
为评估*Pus7*敲除对mESC后续谱系分化的影响，本研究首先建立EB自发分化模型（图3A），从三胚层形成角度观察其效应。在相同起始接种条件下，KO来源的EB球体在分化过程中呈现一定形态学差异，主要表现为球体相对偏小、边缘较不规则，周围可见更多碎屑（图3B）。这些形态学观察提示，*Pus7*敲除可能影响EB形成过程中的细胞聚集状态及形态均一性。

为系统分析EB分化阶段的分子变化，在d0、d3和d5阶段进行RNA-seq检测。PCA分析显示，样本首先沿时间轴发生明显分离，符合EB分化过程中转录组逐步重塑的规律；同时，在同一时间点内WT与KO样本也呈现可区分趋势，且这种分离在d0阶段已开始出现，表明*Pus7*敲除的影响在分化程序启动前就已存在（图3C）。进一步比较三胚层相关标记基因发现，KO组外胚层相关基因整体呈上调趋势，其中*Sox1*、*Pax6*等经典外胚层和神经外胚层标志变化尤为明显（图3D）。

随后，对外胚层、中胚层和内胚层代表基因进行了qRT-PCR验证。结果显示，KO组*Sox1*、*Pax6*外胚层标记基因显著升高（图3E），表明*Pus7*敲除主要伴随外胚层相关分化程序的增强。

2.4　*Pus7*敲除促进早期神经祖细胞程序增强并伴随后续成熟相关程序受阻

在EB模型中观察到*Pus7*缺失导致外胚层分化增强，尤其是神经外胚层相关基因*Sox1*和*Pax6*表达异常升高，基于上述发现，本研究进一步采用RA诱导的体外神经谱系定向分化体系（图4A），探究*Pus7*敲除在神经谱系分化过程中的影响。在诱导过程中，WT细胞逐渐形成相对有序的神经上皮样结构，并出现更明显的细胞延展和突起趋势；相比之下，KO组形成大面积致密的神经上皮样细胞结构，细胞排列更



A: Bright-field images of WT and *Pus7*-KO mESC (Scale bar=500 μm). B: qRT-PCR analysis of the mRNA expression of pluripotency-associated genes (*Sox2*, *Oct4*, *Nanog*, and *Klf4*) in WT and *Pus7*-KO mESC (n=3). C: Western blot analysis of SOX2, OCT4, NANOG, and KLF4 protein expression in WT and *Pus7*-KO mESC (n=3). D: Quantification of SOX2, OCT4, NANOG, and KLF4 protein expression. Protein levels were normalized to TUBULIN or GAPDH and expressed relative to WT (n=3). E: CCK-8 assay showing the growth curves of WT and *Pus7*-KO mESCs, as measured by absorbance at 450 nm (n=3). F: Cell-cycle distribution of WT and *Pus7*-KO mESC analyzed by PI staining followed by flow cytometry. G: Quantification of the percentages of cells in G1, S, and G2/M phases in WT and *Pus7*-KO mESC (n=3). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

图2　*Pus7*敲除未显著破坏mESC核心多能性网络，但导致G1期延长

Figure 2　*Pus7* knockout did not markedly disrupt the core pluripotency network of mESC but prolonged the G1 phase

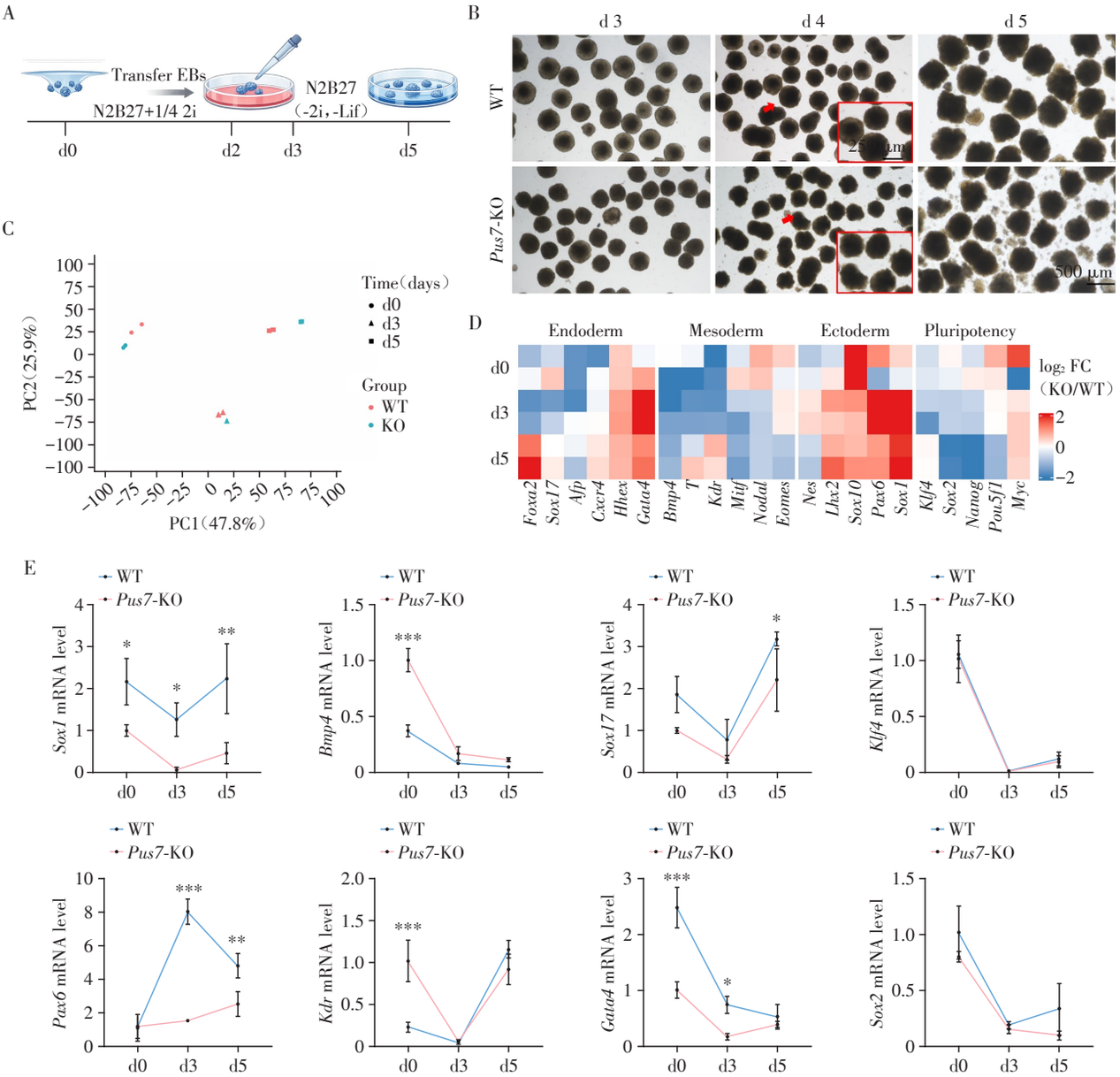
聚集（图4B），上述形态学观察提示，*Pus7*敲除可能影响神经诱导过程中细胞的排列状态及形态变化。

本研究对分化d0和d3的细胞进行了RNA-seq和分析，结果显示在神经定向分化过程中，KO组神经祖细胞相关基因*Sox1*、*Pax6*显著升高，而与后续神经元成熟相关的*Map2*、*Ncam1*等基因下降（图4C），qRT-PCR结果与RNA-seq变化趋势保持一致（图4D）。在蛋白水平上，检测了SOX1和PAX6的表达。Western blot结果显示，KO组PAX6蛋白表达高于WT组（图4E）；免疫荧光和流式分析结果显示，KO组SOX1免疫荧光信号明显增强（图4F）且阳性细胞比例升高（图4G、H）。综上，*Pus7*缺失导致了

神经定向分化过程中神经祖细胞相关程序增强，而后续成熟相关程序受阻。

2.5 *Pus7*敲除通过mRNA假尿嘧啶化扰动神经连接相关基因程序

假尿嘧啶化扰动神经连接相关基因程序为进一步阐明上述神经分化阶段性失衡的分子机制，本研究首先进行了BID-seq检测（图5A），并对d3阶段的BID-seq与RNA-seq数据进行联合分析。考虑到PUS7缺失可能导致部分靶转录本Ψ修饰水平下降，而Ψ修饰降低可能进一步影响mRNA稳定性、加工

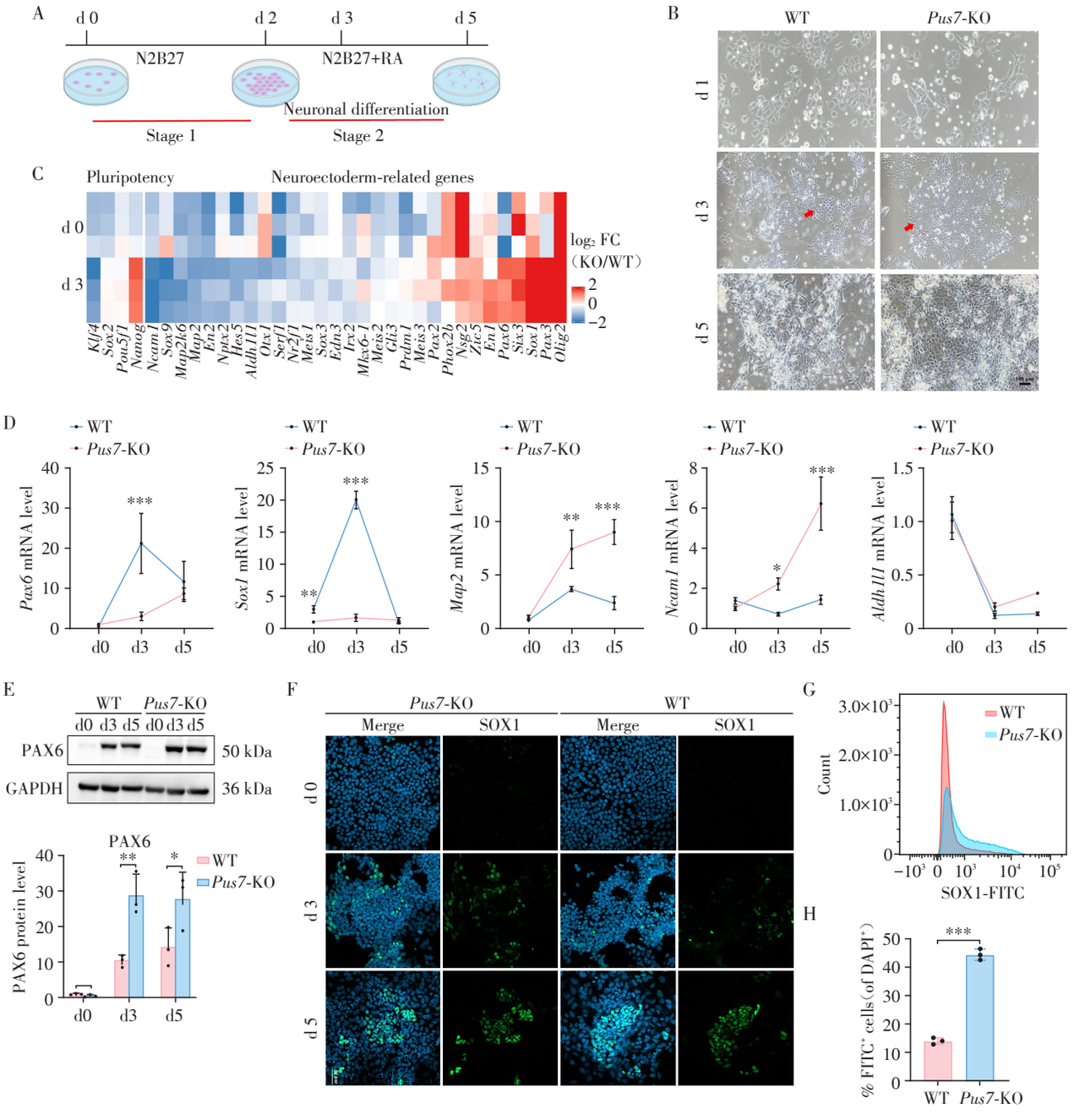


A: Schematic illustration of the experimental workflow for spontaneous EB differentiation of mESCs. B: Representative bright-field images of WT and *Pus7*-KO mESC-derived EB at the indicated time points during differentiation. Magnified views of the indicated regions at day 4 are shown in the insets. Scale bar=500 μm for overview images and 250 μm for magnified images. C: Principal component analysis (PCA) of RNA-seq samples from WT and *Pus7*-KO cells during EB differentiation (n=2). D: Heatmap showing the $\log_2$FC of pluripotency- and germ layer-associated marker genes in *Pus7*-KO relative to WT, based on RNA-seq analysis at d0, d3, and d5 during EB differentiation (n=2). E: qRT-PCR analysis of the mRNA expression of ectoderm/neuroectoderm marker genes (*Sox1* and *Pax6*), mesoderm marker genes (*Bmp4* and *Kdr*), endoderm marker genes (*Sox17* and *Gata4*), and pluripotency marker genes (*Klf4* and *Sox2*) in WT and *Pus7*-KO mESC at the indicated time points during EB differentiation (n=3). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

图3　*Pus7*敲除促进EB分化过程中的外胚层谱系倾向

Figure 3　*Pus7* knockout biased EB differentiation toward the ectodermal lineage

或表达维持[9]，这类同步变化的基因更可能反映*Pus7*缺失后Ψ修饰降低与转录本表达受损之间的关联。因此，本研究重点关注Ψ修饰下降且mRNA表达下调的交集基因，以筛选可能受PUS7介导mRNA Ψ



A: Schematic illustration of the experimental workflow for directed neural ectoderm differentiation of mESC. B: Representative bright-field images of WT and *Pus7*-KO cells at the indicated time points during directed neural ectoderm differentiation (Scale bar=100 μm). C: Heatmap showing the $\log_2$ FC in the expression of pluripotency- and neuroectoderm-associated marker genes in *Pus7*-KO relative to WT at day 0 and day 3 of directed neural ectoderm differentiation (n=3). D: qRT-PCR analysis of the mRNA expression of neural progenitor cellmarker genes (*Sox1* and *Pax6*), mature neuronal marker genes (*Ncam1* and *Map2*) and glial marker gene (Aldh1l1) in WT and *Pus7*-KO cells during directed neural ectoderm differentiation (n=3). E: Western blot analysis of PAX6 protein expression in WT and *Pus7*-KO cells during directed neural ectoderm differentiation (n=3). Quantification of PAX6 protein levels is shown on the right. F: Immunofluorescence staining of SOX1 in WT and *Pus7*-KO cells during directed neural ectoderm differentiation; DAPI was used for nuclear staining (blue), and SOX1 is shown in green. Scale bar=50 μm (n=3). G: Distribution of SOX1-FITC fluorescence signals in WT and *Pus7*-KO cells at d3 (n=3). H: Quantification of the proportion of SOX1-positive cells in WT and *Pus7*-KO groups. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, and $^{***}P<0.001$.

图4　*Pus7*敲除促进早期神经祖细胞程序增强并伴随后续成熟相关程序受阻

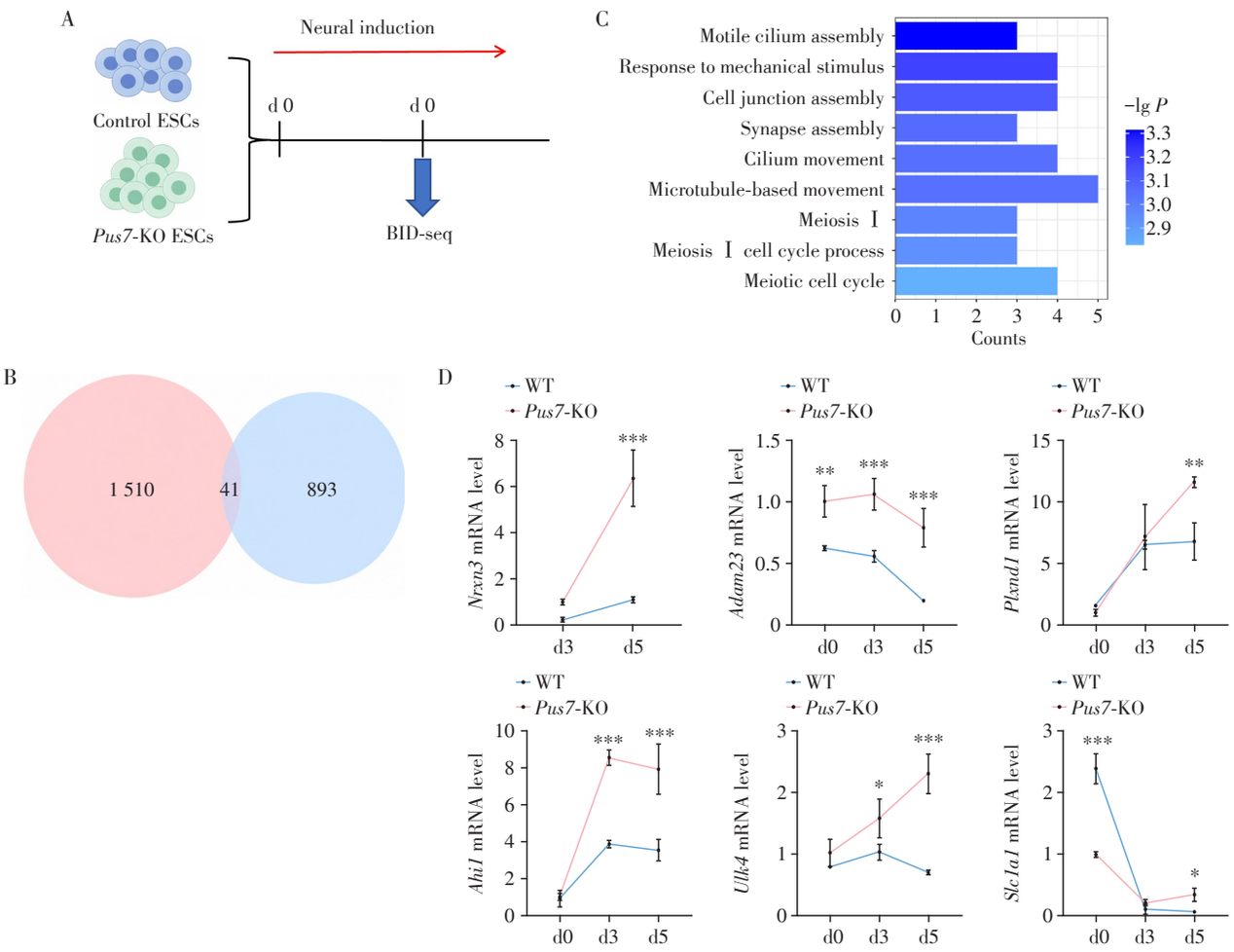
Figure 4　*Pus7* knockout enhanced early neural progenitor cell programs while impairing subsequent maturation-related programs

化调控并参与神经分化过程的候选靶基因。联合分析发现，KO组共有893个Ψ修饰下降基因（$P < 0.05$）和1 510个mRNA下调基因（$P < 0.05$），两者交集为41个（图5B）。对交集基因进行GO富集后发现，其功能显著集中于纤毛装配、纤毛运动、微管依赖运动、细胞连接组装、突触装配及神经连接等模块（图5C），表明*Pus7*敲除影响了神经结构建立、连接形成和功能成熟密切相关的基因网络。

结合富集结果及神经发育意义，对神经发育基因*Nrxn3*、*Adam23*、*Plxnd1*、*Slc1a1*、*Ulk4*和*Ahi1*进行了检测。qRT-PCR结果显示，这些基因在*Pus7*-KO mESC中均明显下调（图5D），与测序结果一致。上述基因多与轴突导向、突触黏附、神经连接建立、谷氨酸转运及神经结构维持相关，其同步下降与前述表型相一致，即细胞虽已进入神经谱系，但缺乏支持成熟连接形成和功能建立的关键分子基础，导致神经祖细胞程序增强而成熟程序受阻。本研究结果支持PUS7介导的mRNA Ψ修饰参与小鼠胚胎干细胞神经谱系分化过程。

3　讨　论

本研究使用mESC体外分化体系模拟早期神经发生过程，围绕未分化状态、谱系偏移以及神经定向分化等阶段，系统分析了*Pus7*缺失对神经谱系分化的影响，并结合BID-seq与RNA-seq联合分析，对其潜在分子机制进行了初步探讨。整体结果表明，



A: Schematic illustration of the experimental design for BID-seq. B: Venn diagram showing the overlap between genes with decreased pseudouridylation identified by BID-seq ($\log_2FC \leq -1$, $P < 0.05$) and genes with reduced mRNA expression identified by RNA-seq ($\log_2FC \leq -1$, $P < 0.05$) at day 3 of directed neural ectoderm differentiation (n=3). C: Gene ontology (GO) enrichment analysis of the 41 overlapping genes shown in B. D: qRT-PCR analysis of the mRNA expression of neural connectivity-associated genes (*Nrxn3*, *Adam23*, *Plxnd1*, *Slc1a1*, *Ulk4*, and *Ahi1*) in WT and *Pus7*-KO cells during directed neural ectoderm differentiation (n=3). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

图5　*Pus7*敲除通过mRNA假尿嘧啶化扰动神经连接相关基因程序

Figure 5　*Pus7*knockout perturbed mRNA pseudouridylation and affected neural connectivity-related gene programs

*Pus7*缺失并未显著破坏mESC基础多能性的维持，但可以在分化启动前重塑细胞的基础状态，并进一步影响后续神经谱系分化进程。

既往研究表明，干细胞状态的维持并不完全依赖单一RNA修饰酶，而更多取决于核心转录因子网络及其表观调控稳态[25-26]。以m6A相关研究为例，*Mettl3*缺失的胚胎干细胞和胚前上胚层在存活前提下仍可维持多能状态，但其向分化状态转换受阻，提示分化缺陷并不一定以多能性崩塌为前提[27-28]。本研究中，*Pus7*缺失同样未从根本上破坏mESC的多能性维持网络，而是更可能通过改变细胞增殖和细胞周期状态，间接影响其后续分化潜能。值得注意的是，*Pus7*缺失后细胞出现G1期延长，表明其基础生理状态已经发生改变。已有研究表明，mESC通常具有较短的G1期和较快的增殖特征，而G1期延长往往意味着细胞对分化信号更为敏感，并与神经外胚层倾向增强相关[29]。因此，本研究在EB分化中观察到的外胚层倾向增强，以及在神经定向分化中观察到的早期神经程序增强，可能首先起始于*Pus7*缺失引起的细胞周期重塑和命运准备状态改变。

不同Ψ合成酶在底物选择和生物学功能上存在差异。DKC1/Dyskerin主要参与rRNA假尿嘧啶化、核糖体生物发生及端粒维持等基础细胞过程，而PUS3主要介导tRNA特定位点Ψ化，并与神经发育异常相关[30-32]。与上述酶相比，PUS7不仅可作用于tRNA，还可参与mRNA/pre-mRNA的Ψ化修饰，因此其在发育调控中的作用可能具有更明显的转录后调控特征。本研究中通过BID-seq，检测到*Pus7*缺失导致893个mRNA上Ψ化的丢失，证明PUS7参与了mRNA的修饰加工；从功能上来说，*Pus7*缺失并未造成mESC多能性崩塌或早期致死样表型，而更突出地表现为外胚层程序增强。这提示PUS7在发育中的作用并非主要体现为基础生存必需，而更倾向于通过调节转录后程序影响命运转换的方向性。

神经发生并非简单线性过程，而是涉及多能性退出、神经外胚层指定、神经祖细胞扩增、神经元细胞成熟及神经连接建立等连续阶段[33]。已有研究表明，m6A可参与神经干/祖细胞状态转换和分化时序调控，其异常可导致神经前体细胞状态维持异常或成熟延迟；m5C、m7G等RNA修饰也可通过影响RNA稳定性、翻译效率和细胞应激反应，参与神经前体细胞增殖、迁移及成熟过程[34-35]；这些研究表明，RNA修饰异常并不一定阻止细胞进入神经谱系，但常常会影响其从祖细胞状态向成熟细胞状态的推进。本研究中，*Pus7*缺失同样并非简单决定细胞是否分化，而是更具体地影响神经谱系分化的阶段转换效率：细胞更容易进入早期神经祖细胞程序，却难以顺利完成后续神经元成熟相关程序。因此，PUS7的作用重点不在于决定细胞是否进入神经谱系，而在于维持神经谱系分化不同阶段之间的有序转换。

本研究表明，PUS7对神经发育的调控作用并非局限于单一层面，而更可能体现为多个RNA调控环节的共同失衡。既往研究表明，PUS7可通过tRNA/tRF相关机制调控翻译，并影响干细胞状态或肿瘤发生[18-19]。在本研究的神经定向分化模型中，部分神经连接相关转录本同时出现Ψ修饰下降和表达下调，如*Nrxn3*、*Adam23*、*Plxnd1*、*Slc1a1*、*Ulk4*和*Ahi1*等。这些基因多与轴突导向、突触黏附、神经网络建立及细胞骨架动态调控等过程相关[36-37]，证明了PUS7介导的mRNA Ψ修饰参与了神经分化后期分子程序的维持。结合PUS7作用于pre-mRNA并影响RNA加工的报道[10,13]，推测*Pus7*缺失所致的神经发育相关表型是层次RNA转录后调控异常共同作用的结果。

目前已有报道*Pus7*致病变异患者常表现为智力障碍、小头畸形、语言发育迟缓和行为异常等复杂表型[15-16]。本研究发现，*Pus7*缺失不仅影响早期神经祖细胞程序，还干扰后续神经成熟及神经连接相关基因网络，该结果为理解PUS7致病变异患者提供了细胞和分子层面的解释。后续系统的研究将为临床诊断和治疗提供靶点和理论依据。本研究仍存在一定局限，mESC体外分化体系虽有助于解析*Pus7*缺失的细胞自主性效应，但不能完全模拟体内胚胎发育过程中复杂的组织微环境、信号梯度和细胞间相互作用，未来需结合小鼠模型、体内神经发育分析及*Pus7*挽救实验进一步验证PUS7在体内神经发生中的作用。

综上，*Pus7*并非维持mESC多能性的核心必需因子，但其缺失可在未分化阶段通过改变细胞周期结构重塑命运准备状态，并在神经分化过程中导致早期神经祖细胞程序增强、后期成熟相关程序受阻。这一过程可能与神经连接相关mRNA的Ψ修饰下降及其表达受损有关。本研究为理解mRNA Ψ化参与胚胎早期神经发生提供了实验依据，也为阐释PUS7异常与神经发育障碍之间的联系提供了新的线索。

利益冲突声明：

作者单位与期刊出版部均隶属于南京医科大学，但无利益冲突。

Conflict of Interests:

The author's affiliation and the publishing department of this journal are affiliated with Nanjing Medical University, but there is no conflict of interest in this work.

作者贡献声明：

王新新负责设计及实施实验、数据收集与处理、文章撰写；黄伯贤负责研究设计与实验指导，论文审阅；陆嘉逢负责研究设计与实验指导，论文审阅。

Author's Contributions:

Wang Xinxin was responsible for research design, implementation of experiments, data collection and analysis, and manuscript writing; Huang Boxian was responsible for research design, experimental guidance, and manuscript review and revision; Lu Jiafeng was responsible for research design, experimental guidance, and manuscript review and revision.

[参考文 献]

[1] Tang C, Hu W Q. Epigenetic modifications during embryonic development: gene reprogramming and regulatory networks[J]. J Reprod Immunol, 2024, 165: 104311

[2] Wang M K, Gao C C, Yang Y G. Emerging roles of RNA methylation in development[J]. Acc Chem Res, 2023, 56(23): 3417-3427

[3] Zhang J, Tong L L, Liu Y C, et al. The regulatory role of m6A modification in the maintenance and differentiation of embryonic stem cells[J]. Genes Dis, 2024, 11(5): 101199

[4] Sun Y S, Li J T. Mechanistic insights into stem cell fate regulation *via* RNA methylation [J]. Ageing Res Rev, 2025, 107: 102717

[5] Orellana E A, Liu Q, Yankova E, et al. METTL1-mediated M7G modification of Arg-TCT tRNA drives oncogenic transformation[J]. Mol Cell, 2021, 81(16): 3323-3338

[6] Ge J B, Wang Z X, Wu J. NAT10-mediated ac4C modification promotes ectoderm differentiation of human embryonic stem cells *via* acetylating NR2F1 mRNA [J]. Cell Prolif, 2024, 57(4): e13577

[7] Moon J, Lee H, Oh M, et al. Embryonic stem cell-specific intragenic enhancer RNA essential for NSUN2-mediated stem cell fate regulation[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 319: 145470

[8] Li Y Q, Yi Y, Gao X L, et al. 2′-O-methylation at internal sites on mRNA promotes mRNA stability [J]. Mol Cell, 2024, 84(12): 2320-2336

[9] Luo N, Huang Q, Zhang M L, et al. Functions and therapeutic applications of pseudouridylation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2025, 26(9): 691-705

[10] Martinez N M, Su A, Burns M C, et al. Pseudouridine synthases modify human pre-mRNA co-transcriptionally and affect pre-mRNA processing[J]. Mol Cell, 2022, 82(3): 645-659

[11] Eyler D E, Franco M K, Batool Z, et al. Pseudouridinylation of mRNA coding sequences alters translation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(46): 23068-23074

[12] Song J H, Dong L T, Sun H X, et al. CRISPR-free, programmable RNA pseudouridylation to suppress premature termination codons[J]. Mol Cell, 2023, 83(1): 139-155

[13] Rodell R, Robalin N, Martinez N M. Why U matters: detection and functions of pseudouridine modifications in mRNAs[J]. Trends Biochem Sci, 2024, 49(1): 12-27

[14] Muda A, Malerba L, Giordano L, et al. A PUS7 gene pathogenic variant causing self-injurious behavior, sleep disturbances, and developmental delay: a case report[J]. Am J Med Genet A, 2023, 191(7): 1953-1958

[15] De Brouwer A P M, Abou Jamra R, KöRtel N, et al. Variants in PUS7 cause intellectual disability with speech delay, microcephaly, short stature, and aggressive behavior[J]. Am J Hum Genet, 2018, 103(6): 1045-1052

[16] Shaheen R, Tasak M, Maddirevula S, et al. PUS7 mutations impair pseudouridylation in humans and cause intellectual disability and microcephaly [J]. Hum Genet, 2019, 138(3): 231-239

[17] Han S T, Kim A C, Garcia K, et al. PUS7 deficiency in human patients causes profound neurodevelopmental phenotype by dysregulating protein translation [J]. Mol Genet Metab, 2022, 135(3): 221-229

[18] Guzzi N, Cieśla M, Ngoc P C T, et al. Pseudouridylation of tRNA-derived fragments steers translational control in stem cells[J]. Cell, 2018, 173(5): 1204-1216

[19] Cui Q, Yin K L, Zhang X T, et al. Targeting PUS7 suppresses tRNA pseudouridylation and glioblastoma tumorigenesis[J]. Nat Cancer, 2021, 2(9): 932-949

[20] Liu R M, Dong Y H, Gao Z P, et al. PUS7-dependent Ψ reshapes specific synaptic gene exons to facilitate fear extinction memory formation[J]. Mol Brain, 2025, 18(1): 80

[21] Zhang L S, Ye C, Ju C W, et al. BID-seq for transcriptome-wide quantitative sequencing of mRNA pseudouridine at base resolution[J]. Nat Protoc, 2024, 19(2): 517-538

[22] Huang X, Wang Y J, Li Q S, et al. Coupling of stemness maintenance with cell cycle control in stem cells [J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1693489

[23] Deveale B, Liu L Q, Boileau R, et al. G1/S restriction point coordinates phasic gene expression and cell differentiation[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3696

[24] Correia B，Sousa M I，Branco A F，et al. Leucine and arginine availability modulate mouse embryonic stem cell proliferation and metabolism[J]. Int J Mol Sci，2022，23(22)：14286

[25] Yang J，Yang Y K，Zhang X F，et al. HDAC2-mediated recruitment of METTL3 to chromatin regulates human embryonic stem cell differentiation[J]. Cell Rep，2025，44(10)：116414

[26] Zhang W Y，Fu H F，Huang Y Y，et al. METTL3-dependent M6A RNA methylation regulates transposable elements and represses human naïve pluripotency through transposable element-derived enhancers[J]. Nucleic Acids Res，2025，53(8)：gkaf349

[27] Wiener D，Schwartz S. The epitranscriptome beyond m6A[J]. Nat Rev Genet，2021，22(2)：119-131

[28] Quarto G，Li Greci A，Bizet M，et al. Fine-tuning of gene expression through the Mettl3-Mettl14-Dnmtl axis controls ESC differentiation[J]. Cell，2025，188(4)：998-1018

[29] Pauklin S，Vallier L. The cell-cycle state of stem cells determines cell fate propensity[J]. Cell，2013，155(1)：135-147

[30] Lin T Y，Smigiel R，Kuzniewska B，et al. Destabilization of mutated human PUS3 protein causes intellectual disability[J]. Hum Mutat，2022，43(12)：2063-2078

[31] Lin T Y，Kleemann L，Jezowski J，et al. The molecular basis of tRNA selectivity by human pseudouridine synthase 3[J]. Mol Cell，2024，84(13)：2472-2489

[32] Garus A，Autexier C. Dyskerin：an essential pseudouridine synthase with multifaceted roles in ribosome biogenesis，splicing，and telomere maintenance[J]. RNA，2021，27(12)：1441-1458

[33] Yoon K J，Ringeling F R，Vissers C，et al. Temporal control of mammalian cortical neurogenesis by m6A methylation[J]. Cell，2017，171(4)：877-889

[34] Moon J，Lee H，Jang Y，et al. NSUN-mediated M5C RNA modification in stem cell regulation[J]. Cells，2025，14(20)：1609

[35] Wu Q H，Fu X D，Liu G Q，et al. N7-methylguanosine modification in cancers：from mechanisms to therapeutic potential[J]. J Hematol Oncol，2025，18(1)：12

[36] Lloyd B A，Han Y，Roth R，et al. Neurexin-3 subsynaptic densities are spatially distinct from neurexin-1 and essential for excitatory synapse nanoscale organization in the hippocampus[J]. Nat Commun，2023，14(1)：4706

[37] Cuhadar U，Calzado-reyes L，Pascual-caro C，et al. Activity-driven synaptic translocation of LGI1 controls excitatory neurotransmission[J]. Cell Rep，2024，43(5)：114186

（收稿：2026-03-12；修回：2026-06-01；录用：2026-07-15）
（本文编辑：戴王娟）

我刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆http://jnmu.njmu.edu.cn/即可在线投稿并查询稿件审理情况。