• 基础研究 •

Pin1负向调控Notch1信号通路抑制神经干细胞增殖

潘　婷[1]，汪　静[1]，孙晓琦[1]，陆文晗[1]，李　琳[1,2]，戴一凡[1,2]，王　盈[1,2]，杨海元[1,2*]

[1]南京医科大学医学遗传学系，[2]江苏省器官衰竭生物治疗重点实验室，江苏　南京　211166

［摘　要］ **目的：**利用CRISPR/Cas9技术构建肽基脯氨酰顺反式异构酶永不分裂基因A相互作用蛋白（peptidyl-prolyl cis-trans isomerase never in mitosis A-interacting 1，*Pin1*）基因敲除的C17.2神经干细胞，揭示Pin1缺失对胚胎神经干细胞增殖能力的影响，并基于转录组测序探究其潜在的分子机制。**方法：**针对小鼠*Pin1*外显子2设计特异性小向导RNA（single guide RNA，sgRNA），构建靶向*Pin1*的CRISPR/Cas9打靶载体，转染C17.2神经干细胞并经G418筛选鉴定获得*Pin1*敲除的单细胞克隆。利用免疫荧光染色和Western blot验证*Pin1*敲除效率及干性标志物Nestin的表达；通过BrdU掺入实验和Ki67免疫荧光染色评估细胞增殖能力的改变。通过RNA-Seq筛选差异表达基因并进行通路富集分析，通过qRT-PCR和Western blot验证差异基因的表达；最后利用γ-分泌酶抑制剂DAPT阻断Notch通路，验证该通路在Pin1调控细胞增殖中的作用。**结果：**成功获得3个*Pin1*双等位基因敲除的C17.2细胞克隆。与野生型细胞相比，*Pin1*敲除细胞维持Nestin阳性表达，BrdU掺入率和Ki67阳性率显著升高（$P < 0.05$），呈过度增殖状态。RNA-Seq及验证实验表明，Pin1缺失导致Notch信号通路显著激活，表现为Notch1受体蛋白及其下游靶基因*Hes1*表达水平显著上调（$P < 0.05$）。DAPT处理不仅有效抑制了*Pin1*敲除细胞中Notch1通路的过度激活，而且显著降低了细胞的增殖速率。**结论：**Pin1在C17.2神经干细胞中作为一种负向调控因子，通过抑制Notch1信号通路来限制细胞的过度增殖。这一发现揭示了Pin1在胚胎神经干细胞发育阶段维持增殖稳态的新机制。

［关键词］ Pin1；Notch1；CRISPR/Cas9；神经干细胞；增殖

［中图分类号］ R329.2　　［文献标志码］ A　　［文章编号］ 1007-4368（2026）09-1315-09

doi：10.7655/NYDXBNSN251472

Pin1 negatively regulates the Notch1 signaling pathway to restrict the proliferation of neural stem cells

PAN Ting[1]，WANG Jing[1]，SUN Xiaoqi[1]，LU Wenhan[1]，LI Lin[1,2]，DAI Yifan[1,2]，WANG Ying[1,2]，YANG Haiyuan[1,2*]

[1]Department of Medical Genetics，[2]Jiangsu Provincial Key Laboratory of Biological Therapy for Organ Failure，Nanjing Medical University，Nanjing 211166，China

［**Abstract**］ **Objective：** To construct peptidyl-prolyl cis-trans isomerase never in mitosis A-interacting 1（*Pin1*）knockout C17.2 neural stem cell（NSC）lines using CRISPR/Cas9 technology，elucidate the impact of Pin1 deficiency on the proliferation capacity of embryonic NSCs，and explore the underlying molecular mechanisms based on transcriptome sequencing. **Methods：** Specific single guide RNAs（sgRNAs）targeting exon 2 of the mouse *Pin1* gene were designed to construct the CRISPR/Cas9 targeting vectors. These vectors were transfected into C17.2 NSCs，followed by G418 selection to obtain *Pin1* knockout single-cell colonies. The knockout efficiency and stemness maintenance（Nestin expression）were validated by immunofluorescence and Western blot analyses. Cell proliferation was evaluated using BrdU incorporation assays and Ki67 immunofluorescence staining. Differentially expressed genes（DEGs）were screened *via* RNA-Seq and subjected to pathway enrichment analysis. The expression of DEGs was further validated by quantitative real-time PCR（qRT-PCR）and Western blot. Finally，DAPT，a γ-secretase inhibitor，was employed to block the Notch signaling pathway to verify its role in Pin1-mediated cell proliferation. **Results：** Three C17.2 cell clones with biallelic *Pin1* knockout were successfully generated. Compared to wild-type cells，*Pin1* knockout cells maintained positive Nestin expression，but exhibited significantly increased BrdU incorporation and Ki67-positive rates（$P < 0.05$），indicating a state of hyperproliferation. RNA-Seq and subsequent validation experiments demonstrated that *Pin1* deletion resulted in the significant activation of the Notch signaling

［基金项目］ 国家自然科学基金（81970164）

*通信作者（Corresponding author），E-mail：hyyang@njmu.edu.cn（ORCID：0000-0001-5253-0079）

pathway, characterized by the marked upregulation of the Notch1 protein and its downstream target gene Hes1 ($P < 0.05$). Treatment with DAPT not only effectively inhibited the hyperactivation of the Notch1 pathway in *Pin1* knockout cells but also significantly reduced their proliferation rate. **Conclusion:** Pin1 functions as a negative regulator in C17.2 NSCs, restricting excessive cellular proliferation by inhibiting the Notch1 signaling pathway. These findings reveal a novel mechanism by which Pin1 maintains proliferation homeostasis during the development of embryonic NSCs.

[**Key words**] Pin1; Notch1; CRISPR/Cas9; neural stem cell; proliferation

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(09): 1315-1322, 1330]

肽基脯氨酰顺反式异构酶永不分裂基因A相互作用蛋白(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, never in mitosis A-interacting 1, *Pin1*)基因编码一种高度保守的特异性肽酰-脯氨酰顺反异构酶。它是目前已知的唯一能够识别并结合磷酸化丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸(pSer/Thr-Pro)基序的蛋白,通过催化该位点肽键的顺反异构化,诱导靶蛋白构象改变,进而调节其稳定性、亚细胞定位及催化活性[1-2]。Pin1的底物谱极为广泛,涵盖p53、β-淀粉样前体蛋白等多种蛋白[3-5]。既往研究表明,Pin1通常作为细胞增殖的"正向调节因子",在多种肿瘤细胞中高表达并驱动细胞周期的进程[6-9]。然而,Pin1的功能具有高度的细胞类型依赖性,其在神经系统发育特别是神经干细胞(neural stem cell, NSC)的增殖与分化中的具体调控机制仍有待深入阐明[10-12]。

NSC的自我更新与分化是神经系统发育及损伤修复的基础[13-14],NSC移植在神经退行性疾病及其他脑损伤的治疗中备受关注[15-17],其临床价值日益凸显。C17.2神经前体细胞系(常称为C17.2神经干细胞系)来源于新生小鼠小脑组织,通过逆转录病毒介导*v-myc*癌基因永生化处理后,不仅保留了多向分化潜能与干细胞核心特性,还具备稳定的自我更新能力,是解析神经发育早期分子机制的经典体外模型[18]。已有研究指出,Pin1在成体神经发生及神经退行性疾病(如阿尔茨海默病)中扮演重要角色,通常被认为有助于维持神经元的存活与功能[11,19]。但是,在胚胎发育阶段的神经干细胞中,Pin1是否通过特定的信号通路(如Notch、Wnt等)精确调控细胞的增殖速率,目前尚缺乏系统的实验证据。

鉴于此,本研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,构建了*Pin1*稳定敲除的C17.2 NSC模型。相比传统的RNA干扰技术,CRISPR/Cas9系统能够实现基因的完全敲除,从而彻底消除*Pin1*蛋白的背景表达干扰[20-21]。本研究旨在通过构建*Pin1*敲除NSC,明确Pin1缺失对C17.2细胞干性维持(Nestin表达)及增殖的影响;同时结合高通量RNA-Seq转录组测序技术,解析*Pin1*敲除所引起的差异表达基因,揭示Pin1在胚胎NSC中作为潜在增殖调控因子的分子机制,为神经系统相关疾病的机制探索提供新的理论依据。

1　材料和方法

1.1　材料

C17.2 NSC(IM-M072,厦门细胞资源平台逸漠生物);DMEM培养基(Gibco公司,美国);青链霉素(penicillin-streptomycin, PS)、多聚甲醛(paraform-aldehyde, PFA)、二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)(Sigma公司,美国);0.25% Trypsin-0.02% EDTA(Gibco公司,美国);PX330(Addgene公司,美国);DH5α感受态、质粒中提试剂盒(北京天根生化科技公司);DNA Marker DL2000、pMD18-T载体(TaKaRa公司,日本);胶回收试剂盒(Qiagen公司,德国);*Bbs* Ⅰ限制性内切酶(New England Biolabs公司,美国);PEI40000液体DNA转染试剂(上海拓然生物科技有限公司);G418(遗传霉素)(Thermo Fisher Scientific公司,美国);RNApure FAST Tissue&Cell Kit试剂盒、HiFiScript All-in-one RT Master Mix for qPCR试剂盒、MixTaq酶(泰州康为世纪公司);Mouse anti-Nestin(BD Biosciences公司,美国);Rabbit anti-KI67、Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594、Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488(Abcam公司,英国);Rabbit anti-cleaved Notch1(NICD)(Cell Signalling Technology,美国);Rabbit anti-Pin1(Proteintech公司,美国);Mouse anti-β-actin(武汉abclonal公司);DAPI(Te-dia公司,美国)。

1.2　方法

1.2.1　C17.2 NSC复苏

将含有细胞悬液的冻存管在37 ℃水浴中迅速摇晃解冻,加完全培养基混合均匀。1 000 r/min离心3 min,弃去上清液,加完全培养基后轻柔吹匀。

然后将所有细胞悬液加入培养皿中，放入37 ℃、5%的CO_2培养箱培养。定期检查细胞密度，C17.2 NSC细胞单层贴壁生长，在显微镜下观察到的形态呈现长梭形，扁平态。

1.2.2 C17.2 NSC的传代与培养

弃去培养皿上清，用磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffered saline，PBS）润洗细胞1~2次。然后加消化液（0.25% Trypsin-0.02% EDTA）于培养皿中，使消化液浸润所有细胞，37 ℃培养箱中消化1~3 min，然后在显微镜下观察细胞消化情况，若细胞大部分变圆并脱落，迅速拿回操作台，加少量完全培养基终止消化。轻轻打匀后装入无菌离心管中，1 000 r/min离心5 min，弃去上清液，加完全培养基后吹匀。将细胞悬液按1∶3或1∶4比例分到新的培养皿，置于培养箱中培养。

1.2.3 sgRNA的设计与CRISPR/Cas9载体构建

根据在NCBI中已查找到的小鼠*Pin1*基因序列（Gene ID：23988），设计靶向*Pin1*第2个外显子的sgRNA，合成5′磷酸化修饰的寡核苷酸：sgRNA-F：5′-CACCGAGCCAGTGGGAGCGGCCCAG-3′，sgRNA-R：5′-AAACCTGGGCCGCTCCCACTGGC-TC-3′（上海生工生物工程股份有限公司合成）。寡核苷酸退火后克隆到*Bbs* Ⅰ酶切的pX330质粒，转化DH5α感受态细菌，涂布于溶菌肉汤（Luria-Bertani，LB）固体培养基进行培养，37 ℃培养箱过夜。8~12 h后可挑取单克隆菌落，测序确定正确的重组子。

1.2.4 细胞转染及单克隆细胞的筛选和鉴定

转染前，在培养皿中铺板C17.2 NSC，直至细胞密度达60%~80%。根据拓然生物PEI40000说明书配制DNA-PEI转染复合物，然后将DNA-PEI转染复合物逐滴均匀加入到细胞培养基中充分混匀，于培养箱中培养18~72 h。然后用0.25% Trypsin-0.02% EDTA消化重悬成细胞悬液，转移至10 cm皿中进行铺板培养。在细胞贴壁后用含有1 mg/mL G418的无血清培养基继续培养，10~15 d后，可获得单细胞克隆。提取细胞克隆的基因组进行PCR扩增和测序鉴定。

1.2.5 Western blot验证敲除效果

收集待测细胞沉淀，经过RIPA裂解提取蛋白，经过SDS-PAGE电泳分离、转膜、封闭，4 ℃孵育一抗过夜，取出清洗3遍，室温孵育二抗（1∶8 000），再清洗3遍，最后加入ECL发光显色。一抗稀释比例：Pin1（1∶1 000）；cleaved-Notch1（1∶1 000）；β-actin（1∶8 000）。

1.2.6 Pin1敲除和野生型的C17.2 NSC免疫荧光染色

将待测C17.2 NSC进行细胞爬片，PBS清洗3遍，然后用4% PFA固定20 min，PBS清洗3遍，加入Triton X-100通透20 min后，PBS清洗3遍，室温封闭1 h，加入一抗，4 ℃过夜，PBS清洗3遍，加入荧光标记二抗，室温避光孵育1 h，PBS清洗3遍，滴加DAPI抗淬灭剂，避光孵育5 min，荧光显微镜拍照。一抗稀释比例：Pin1（1∶500）、Nestin（1∶300）、BrdU（1∶500）、Ki67（1∶1 000）。

1.2.7 *Pin1*敲除C17.2 NSC的转录组学分析

将*Pin1*敲除和野生型C17.2 NSC分别收集并委托诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序，分别设置WT组、*Pin1*$^{-/-}$组，每组各5个样本。利用诺禾致源网站对转录组结果进行分析，首先将得到的基因read count利用DESeq2的方法标准化，按照$|\log_2(\text{fold change})|\geq 1.0$，$P_{adj}\leq 0.05$的标准筛选差异表达基因（differentially expressed gene，DEG）。其次，对差异基因以$P_{adj}<0.05$作为显著性富集的阈值进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析。提取注释到KEGG数据库的基因集对其进行聚类分析。将获得的数据利用hiplot网站（https://hiplot.com.cn/）对结果进行可视化呈现。

1.2.8 qRT-PCR检测基因mRNA水平

收集野生型、*Pin1*敲除以及敲除后用DAPT处理后的C17.2神经干细胞沉淀到EP管中，用PBS清洗1遍；根据RNApure FAST Tissue&Cell Kit试剂盒，提取细胞的RNA（取少量RNA溶液进行核酸凝胶电泳，查看RNA质量情况）并测定浓度。将上述提取总RNA使用HiFiScript All-in-one RT Master Mix for qPCR试剂盒逆转录为cDNA；利用NCBI网站和PrimerBank网站设计靶向小鼠目的基因的qRT-PCR引物，按实时荧光定量PCR说明书检测。引物序列见表1。

1.3 统计学方法

本研究采用GraphPad Prism 9.5软件进行统计分析。计量资料以均值±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用Shapiro-Wilk检验进行正态性检验。两组间比较采用双尾独立样本t检验；多组间比较采用单因素方差分析（one-way ANOVA），两两比较采用Tukey事后多重比较检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。对RNA-seq获得的差异表达基因进行KEGG通路富集分析时，采用基于超几何分布的Fisher确切概率法评估富集显著性，并采用Benjamini-Hochberg方法进

表1　PCR引物序列

Table 1　Sequence of PCR primers

Primers	Forward(5′→3′)	Reverse(5′→3′)
Alcam	TCCTGCCGTCTGCTCTTCT	TTCTGAGGTACGTCAAGTCGG
Ramp1	GAGACTATTGGGAAGACGCTATG	CTCCTCCAGACCACCAGTG
Rictor	GCTAGGTGCATTGACATACAACA	AGTGCTAGTTCACAGATAATGGC
Hes1	TCAACACGACACCGGATAAAC	GCCGCGAGCTATCTTTCTTCA
Notch3	TGGCGACCTCACTTACGACT	CACTGGCAGTTATAGGTGTTGAC
Actb	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

行多重检验校正，以校正后P值或FDR<0.05作为显著富集的判定标准。

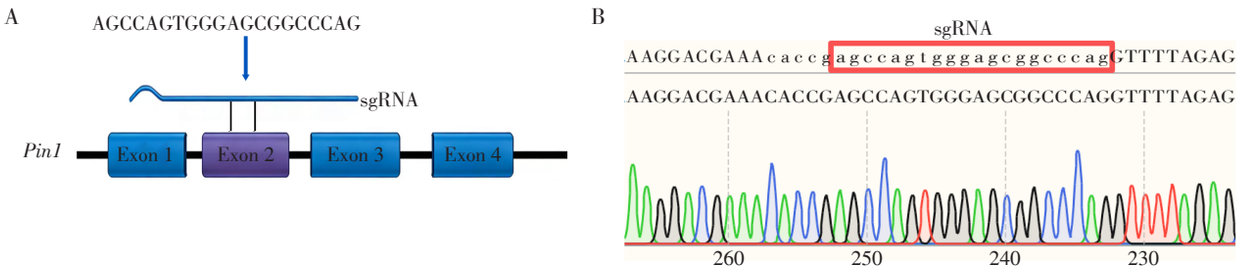
2　结　果

2.1　构建靶向小鼠*Pin1*基因的CRISPR/Cas9打靶载体

利用CHOPCHOP在线工具(https://chopchop.cbu.uib.no/)，针对小鼠*Pin1*外显子2设计特异性的sgRNA，将合成的sgRNA寡核苷酸链退火后，克隆至经*Bbs* Ⅰ酶切线性化的pX330质粒(addgene #42230)。Sanger测序结果证实，靶向*Pin1*的CRISPR/Cas9打靶载体构建成功(图1A、B)。

2.2　*Pin1*基因敲除的神经干细胞克隆的筛选与鉴定

将*Pin1*打靶载体和带有新霉素抗性基因质粒共转染C17.2 NSC。经G418筛选10~15 d后，获得20个抗性的单细胞克隆。选取其中6个生长状态良好的单细胞克隆进行PCR及测序鉴定。结果显示，其中3个细胞克隆在*Pin1*靶点发生了双等位基因突变(表2)，提示为*Pin1*纯合敲除的细胞克隆。选取其中的8#单细胞克隆用于后续功能验证，其基因型鉴定结果如图2A所示。免疫荧光染色(图2B)及Western blot(图2C)结果均显示，野生型(wild type，WT)NSC中Pin1蛋白正常表达，而8#细胞克隆中Pin1蛋白表达完全缺失，证实CRISPR/Cas9基因编辑技术成功实现了*Pin1*基因的敲除。为评估*Pin1*基因敲除是否影响NSC的干性，检测了NSC标志物Nestin的表达。免疫荧光结果显示，*Pin1*基因敲除后的NSC仍维持高水平的Nestin表达(图2D)，表明



A：sgRNA targeting site of *Pin1*. B：Sequencing chromatogram of the *Pin1* gene targeting vector.

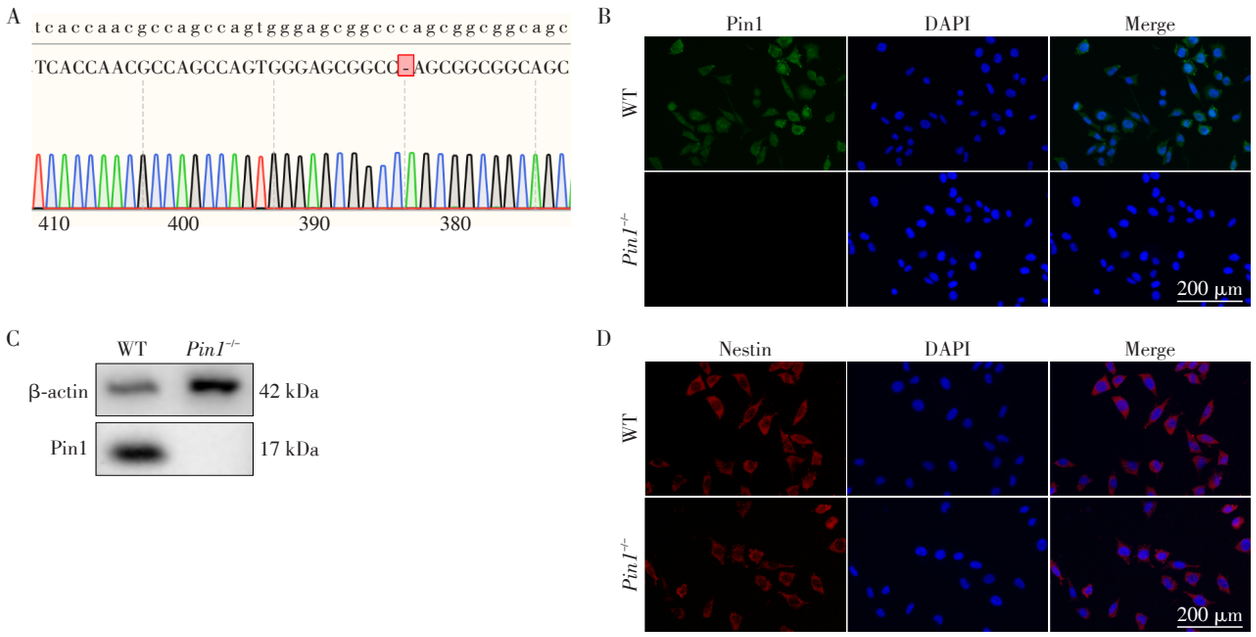
图1　构建靶向*Pin1*的CRISPR/Cas9表达载体

Figure 1　Construction of *Pin1* gene-targeting vector *via* CRISPR/Cas9 system

表2　*Pin1*$^{-/-}$单细胞克隆的基因型

Table 2　Genotypes of *Pin1*$^{-/-}$ colonies

Colonies	*Pin1*	Indel
Wild type	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCCCAGCGG	WT
3#	ACGCCAGCCAGTGGGAGCG---CAGCGG	−3/+1 bp
	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCCCCAGCGG	
8#	ACGCCAGCCAGTGGGAGCG---CAGCGG	−3/−1 bp
	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCC-AGCGG	
21#	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCCCA-CGG	−1/−3/+1 bp
	ACGCCAGCCAGTGGGAGCG---CAGCGG	
	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCCCCAGCGG	



A：Sequencing analysis of single-cell colony 8#. B：Immunofluorescence staining for Pin1 in *Pin1*$^{-/-}$ NSCs（n=3）. C：Western blot analysis of Pin1 expression in *Pin1*$^{-/-}$ NSC（n=3）. D：Immunofluorescence staining for Nestin in *Pin1*$^{-/-}$ NSC（n=3）.

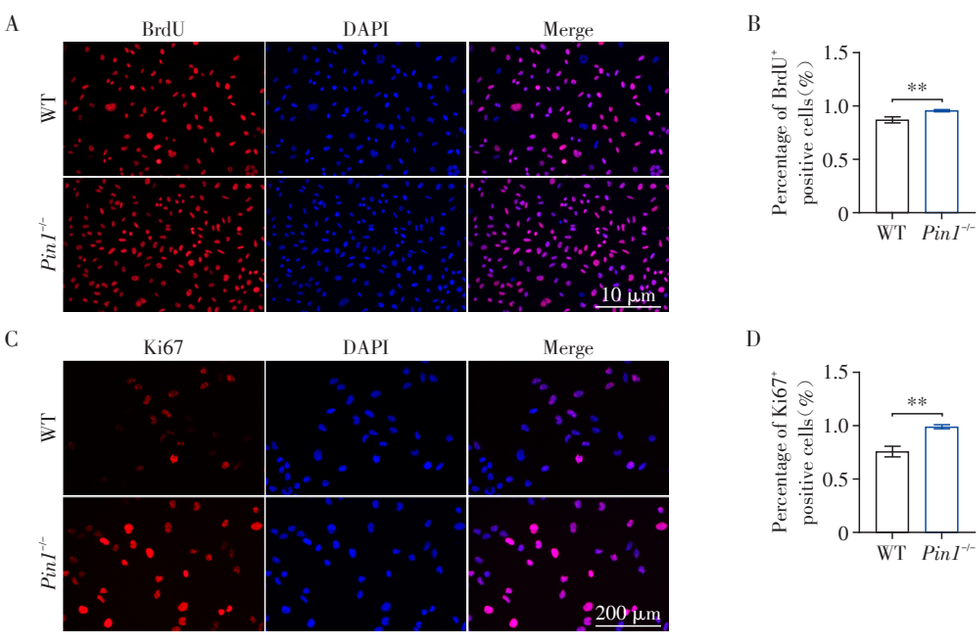
图2　*Pin1*敲除的NSC的基因型和表型鉴定

Figure 2　Genotyping and phenotyping of *Pin1*$^{-/-}$ NSC

Pin1缺失未损害C17.2细胞的干性特征。

2.3　*Pin1*敲除显著增强NSC的增殖能力

为了明确*Pin1*敲除对NSC增殖能力的具体影响，采用BrdU掺入实验和Ki67免疫荧光染色进行评估。BrdU检测结果显示，*Pin1*敲除的C17.2 NSC的BrdU阳性细胞比例显著高于WT对照（图3A、B）。同时，细胞增殖标志物Ki67的免疫荧光分析也证实，*Pin1*敲除的C17.2 NSC的Ki67阳性细胞数较



A：Representative immunofluorescence images of BrdU staining in NSC. B：Quantification of the percentage of BrdU-positive cells（n=3）. C：Representative immunofluorescence images of Ki67 staining in NSC. D：Quantification of the percentage of Ki67-positive cells（n=3）. $^{**}P < 0.01$.

图3　*Pin1*$^{-/-}$ NSC增殖能力增强

Figure 3　*Pin1* knockout enhanced the proliferation ability of NSC

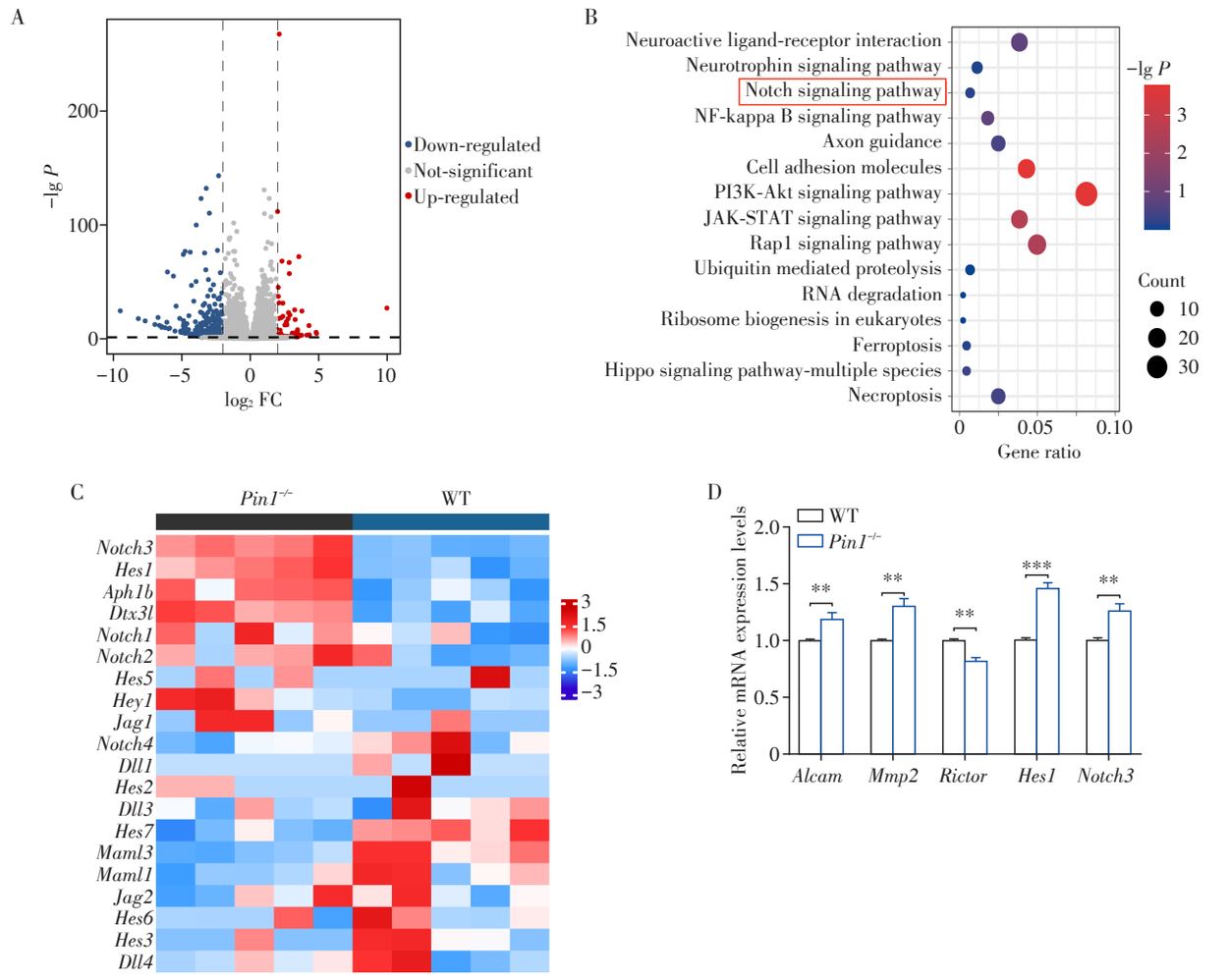
WT对照明显增多（图3C、D）。上述结果一致表明，*Pin1*敲除解除了对C17.2 NSC的分裂限制，显著增强了其增殖能力。

2.4　*Pin1*$^{-/-}$ NSC的转录组学分析

为了探究Pin1影响NSC增殖能力的分子机制，对WT型和*Pin1*敲除型C17.2 NSC分别进行了转录组测序（RNA sequencing，RNA-seq）。测序结果显示，共检测到41 097个基因表达。按照|log$_2$（fold change）|≥1，*P*adj≤0.05的标准，共筛选出1 215个DEG，其中上调基因359个，下调基因856个（图4A）。KEGG信号通路富集分析显示，Notch信号通路在差异基因中显著富集（图4B）。聚类热图进一步展示了Notch通路相关基因在两组间的表达差异（图4C）。qRT-PCR验证结果显示，*Ramp1*、*Mmp2*、*Hes1*、*Notch3*、*Rictor*等基因的表达趋势与测序结果高度一致（图4D），提示Notch信号通路可能介导了Pin1缺失引起的增殖表型。

2.5　Pin1通过负向调控Notch1通路抑制NSC增殖

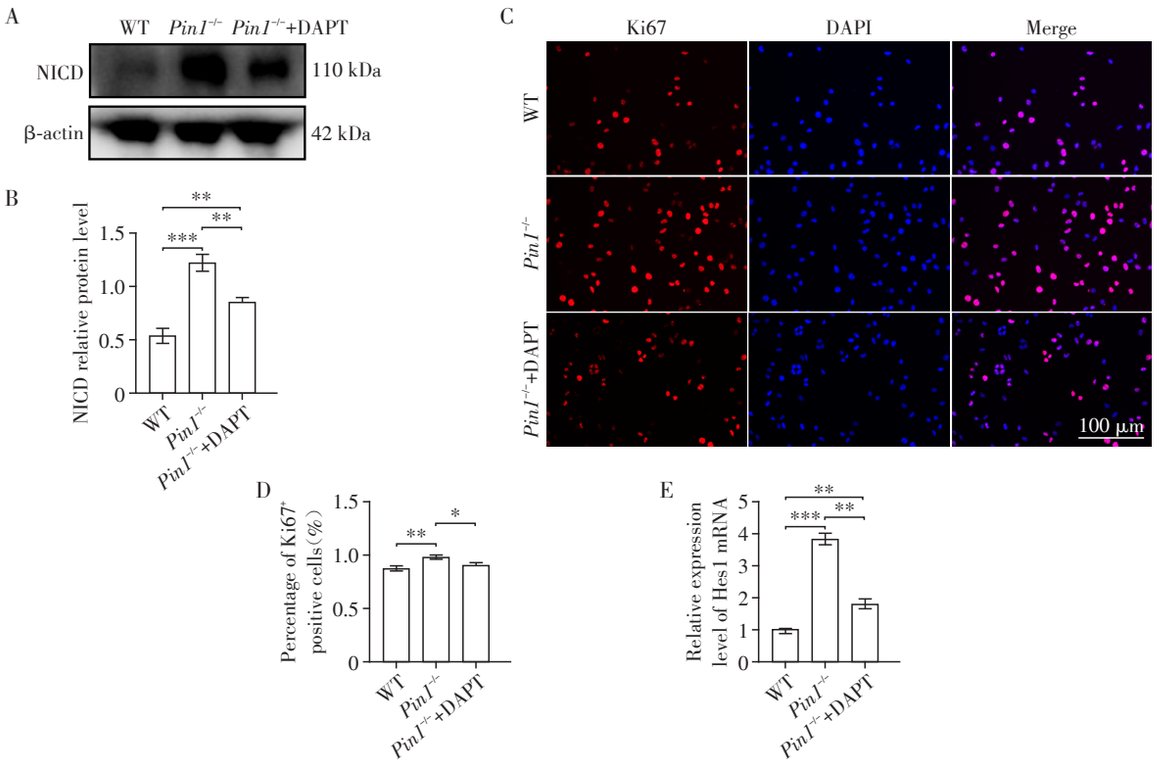
为确证*Pin1*敲除引起的增殖增强是否依赖于Notch信号通路的激活，进一步开展回补实验。使用了γ-分泌酶抑制剂DAPT处理细胞，DAPT能够特异性抑制γ-分泌酶的活性，从而阻断Notch受体胞内段（Notch intracellular domain，NICD）的剪切与释放，抑制Notch信号通路的向下游传递。Western blot结果显示，相比WT组，*Pin1*$^{-/-}$ NSC中Notch1受体蛋白水平显著升高（图5）。DAPT处理后*Pin1*$^{-/-}$ NSC中*Hes1*基因表达下降，Notch1蛋白的高表达被有效逆转，且Ki67阳性细胞比例也显著下降。这一结果证实，*Pin1*敲除导致的NSC异常增殖是通过过度激活Notch1信号通路实现的，即Pin1在生理状态



A：Volcano plot of the RNA-seq data. B：KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes in the *Pin1*$^{-/-}$ NSC. C：Heat map of differentially expressed genes. D：qRT-PCR validation of differentially expressed genes（n=3）. $^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$.

图4　*Pin1*$^{-/-}$ NSC的转录组学分析

Figure 4　Transcriptomic analysis of *Pin1*$^{-/-}$ NSCs



A: Western blot analysis of NICD protein expression in *Pin1*$^{-/-}$ NSC following DAPT treatment (n=3). B: Quantitative analysis of relative NICD protein levels in DAPT-treated *Pin1*$^{-/-}$ NSC (n=3). C: Representative immunofluorescence images of Ki67 staining in *Pin1*$^{-/-}$ NSC following DAPT treatment (n=3). D: Quantification of Ki67-positive signals in DAPT-treated *Pin1*$^{-/-}$ NSC (n=3). E: qRT-PCR analysis of Hes1 expression in *Pin1*$^{-/-}$ NSC following DAPT treatment (n=3). $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, and $^{***}P < 0.001$.

图5　*Pin1*敲除通过激活Notch1信号通路促进NSC增殖及挽救实验

Figure 5　*Pin1* knockout promoted NSC proliferation *via* Notch1 pathway activation and rescue experiments

下对Notch1通路具有负向调控作用。

3　讨　论

NSC的自我更新与分化平衡是神经系统发育及损伤修复的基础[13-17]。而相比原代胚胎干细胞分离自囊胚内细胞团，C17.2细胞系则来源于新生小鼠小脑，来源不同；同时C17.2细胞系增殖速度、稳定性等更适合细胞特性、初步分子机制研究，而原代胚胎干细胞更适用于全能性调控、胚胎发育机制等研究方向。因此C17.2细胞系是经典的小鼠胚胎NSC模型，又因其遗传背景清晰且具备多向分化潜能，被广泛用于解析神经发育早期的分子机制。本研究利用CRISPR/Cas9技术构建了*Pin1*稳定敲除的C17.2细胞系，首次揭示了肽基脯氨酰顺反异构酶Pin1在NSC中作为一种负向调控因子，通过抑制Notch1信号通路来限制细胞的过度增殖。这一发现丰富了Pin1在神经系统中的功能图谱。

本研究的核心发现在于*Pin1*缺失导致了Notch1信号通路的异常激活及NSC增殖能力的显著增强。RNA-Seq及实验验证表明，*Pin1*$^{-/-}$细胞中Notch1受体及其下游靶基因*Hes1*表达显著上调，且使用DAPT阻断Notch通路可逆转Pin1缺失引起的促增殖表型。既往研究多报道Pin1在多种肿瘤（如乳腺癌、膀胱癌）中过表达，通过稳定Cyclin D1、β-catenin等癌蛋白促进细胞增殖，因此Pin1常被视为促癌因子[6-9, 22]。然而，本研究结果显示Pin1在C17.2神经干细胞中扮演了相反的角色——即“增殖刹车”的角色。这种组织或细胞特异性的功能差异可能与底物蛋白及其磷酸化状态的差异有关。Pin1特异性识别磷酸化的丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸（pSer/Thr-Pro）基序并催化其发生顺反异构。因此推测，在C17.2细胞中，NICD或其上游调控因子可能存在Pin1识别位点，Pin1结合后可能诱导了Notch1的构象改变，从而促进其泛素化降解或抑制其入核转录活性；当Pin1缺失时，这种抑制被解除，导致Notch信号持续激活。这与近期有文献报道Pin1在某些特定背景下（如早幼粒细胞白血病）可作为抑癌因子的发现相呼应[3]，提示Pin1的功能具

有高度的上下游依赖性。特别是，Pin1在不同类型或不同发育阶段的神经干细胞中是否招募了不同的辅助因子，或底物磷酸化位点发生了时空特异性改变，仍需后续在原代细胞或动物模型中进一步阐明。

Notch信号通路是维持神经干细胞及其未分化状态的关键通路。本研究中，*Pin1*$^{-/-}$细胞干性标志物Nestin表达未受影响，当然，干性的维持不仅体现在标志物表达上，更体现在持续的自我更新能力上。与Nestin的结果相一致，本研究数据显示，*Pin1*$^{-/-}$细胞的增殖活性显著增强，表现为Ki67阳性细胞比例的增加以及BrdU掺入率的升高，提示Pin1主要调控NSC的细胞周期进程，而非直接诱导分化[23-24]。这一特性在神经损伤修复中具有潜在价值：若能通过药物暂时抑制Pin1活性，适度激活Notch通路，可能有助于内源性NSC的快速扩增，从而补充受损神经元。然而，持续的Notch激活也与神经胶质瘤的发生密切相关[25]。因此，Pin1在NSC中的表达水平必须受到精细调控，以维持“增殖-分化”的稳态。

综上所述，本研究基于基因编辑的C17.2细胞模型，发现Pin1缺失通过解除对Notch1信号通路的抑制从而促进NSC增殖。这一结果揭示了Pin1作为胚胎神经干细胞增殖负向调控因子的新功能，也提示Pin1对Notch通路的调控具有复杂的时空异质性，为深入理解神经发育调控网络提供了新的实验依据。

利益冲突声明：

所有作者声明无利益冲突。

Conflict of Interests:

The authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明：

潘婷负责主要实验的实施、实验数据的获取和整理，并完成论文初稿撰写；汪静、孙晓琦和陆文晗参与实验实施并协助完成相关实验工作；李琳负责实验资源管理；戴一凡参与课题设计并提供实验指导；王盈参与课题设计、实验指导和数据分析及论文修订。杨海元负责研究设计、实验指导、论文撰写，并提供基金项目支持。

Author's Contributions:

PAN ting performed the major experiments, collected and organized the data, and drafted the manuscript. WANG Jing, SUN Xiaoqi, and LU Wenhan participated in and assisted with the experiments. LI Lin was responsible for the management of research resources and experimental materials. DAI Yifan contributed to study design and provided experimental supervision. WANG Ying was responsible for study design, experimental supervision, data analysis, and manuscript revision. YANG Haiyuan was responsible for study design, experimental supervision, manuscript writing, and funding acquisition.

[参考文献]

[1] YAFFE M B, RITTINGER K, VOLINIA S, et al. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity [J]. Cell, 1997, 91(7): 961-971

[2] FAGIANI F, GOVONI S, RACCHI M, et al. The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in neuronal signaling: from neurodevelopment to neurodegeneration[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(3): 1062-1073

[3] HLEIHEL R, EL HAJJ H, WU H C, et al. A Pin1/PML/P53 axis activated by retinoic acid in *NPM-1c* acute myeloid leukemia[J]. Haematologica, 2021, 106(12): 3090-3099

[4] LANNI C, MASI M, RACCHI M, et al. Cancer and Alzheimer's disease inverse relationship: an age-associated diverging derailment of shared pathways[J]. Mol Psychiatry, 2021, 26(1): 280-295

[5] QIU C X, LI Z X, LEIGH D A, et al. The role of the Pin1-*cis* p-tau axis in the development and treatment of vascular contribution to cognitive impairment and dementia and preeclampsia [J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1343962

[6] CALIGIURI I, VINCENZO C, ASANO T, et al. The metabolic crosstalk between PIN1 and the tumour microenvironment[J]. Semin Cancer Biol, 2023, 91: 143-157

[7] WANG X, LEE D, XU H, et al. PIN1 prolyl isomerase promotes initiation and progression of bladder cancer through the SREBP2 - mediated cholesterol biosynthesis pathway[J]. Cancer Discov, 2025, 15(3): 633-655

[8] XIE G, OKUDA S, GAO J Y, et al. The central role of Pin1 in age-related cancer signaling pathways[J]. Semin Cancer Biol, 2025, 114: 173-194

[9] YU J H, IM C Y, MIN S H. Function of PIN1 in cancer development and its inhibitors as cancer therapeutics [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 120

[10] BALASTIK M, ZHOU X Z, ALBERICH-JORDA M, et al. Prolyl isomerase Pin1 regulates axon guidance by stabilizing CRMP2A selectively in distal axons[J]. Cell Rep, 2015, 13(4): 812-828

[11] MALTER J S. Pin1 and Alzheimer's disease[J]. Transl Res, 2023, 254: 24-33

[12] ZHENG F, LI Y, ZHANG F, et al. Cobalt induces neurodegenerative damages through Pin1 inactivation in mice and human neuroglioma cells[J]. J Hazard Mater, 2021, 419: 126378

[13] SHABANI K, PIGEON J, BENAISSA T Z M, et al. The temporal balance between self-renewal and differentiation

（下转第1330页）

2025,20:821-830
[14] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Global Strategy for Prevention, Diagnosis and Management of COPD: 2026 Report[EB/OL](2025-11-11)[2026-06-03]https://goldcopdorg/2026-gold-report/, 2026
[15] PENG J, LI X, ZHOU H, et al. Clinical value of impulse oscillometry in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis [J]. Respiration, 2025,104(2):100-109
[16] TAMURA K, SHIRAI T, HIRAI K, et al. Mucus plugs and small airway dysfunction in asthma, COPD, and asthma-COPD overlap [J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2022, 14(2):196-209
[17] KLITGAARD A, LØKKE A, HILBERG O. Impulse oscillometry as a diagnostic test for pulmonary emphysema in a clinical setting [J]. J Clin Med, 2023, 12(4):1547
[18] XU J, SUN X, ZHU H, et al. Long-term variability of impulse oscillometry and spirometry in stable COPD and asthma [J]. Respir Res, 2022, 23(1):262
[19] LU L, TANG G, WAN Q, et al. Long-term variability of impulse oscillometry defined small airway dysfunction in participants with and without chronic obstructive pulmonary disease [J]. BMJ Open Respir Res, 2026, 13(1): e003918
[20] FÄRDIG M, LINGMAN K, LISSPERS K, et al. Peripheral airway function and disease burden in COPD [J]. ERJ Open Res, 2025, 11(4):01078-2024
[21] HUANG Y, ZHANG X, WANG J, et al. Role of impulse oscillometry in chronic obstructive pulmonary disease and asthma-chronic obstructive pulmonary disease overlap [J]. Clin Transl Allergy, 2025, 15(4):e70057

(收稿:2026-05-06;修回:2026-07-03;录用:2026-07-06)
(本文编辑:唐　震)

(上接第1322页)

of human neural stem cells requires the amyloid precursor protein[J]. Sci Adv, 2023, 9(24): eadd5002
[14] SONG P W, HAN T Y, WU Z M, et al. Transplantation of neural stem cells loaded in an IGF-1 bioactive supramolecular nanofiber hydrogel for the effective treatment of spinal cord injury[J]. Adv Sci, 2024, 11(17): e2306577
[15] HAYASHI Y, LIN H T, LEE C C, et al. Effects of neural stem cell transplantation in Alzheimer's disease models[J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 29
[16] LIU Y F, LIU H T, CHANG C, et al. Stereotactically intracerebral transplantation of neural stem cells for ischemic stroke attenuated inflammatory responses and promoted neurogenesis: an experimental study with monkeys [J]. Int J Surg, 2024, 110(9): 5417-5433
[17] RAO J, LI H, ZHANG H, et al. Periplaneta Americana (L.) extract activates the ERK/CREB/BDNF pathway to promote post-stroke neuroregeneration and recovery of neurological functions in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 321: 117400
[18] SNYDER E Y, DEITCHER D L, WALSH C, et al. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum[J]. Cell, 1992, 68(1): 33-51
[19] STALLINGS N R, O'NEAL M A, HU J, et al. Long-term normalization of calcineurin activity in model mice rescues Pin1 and attenuates Alzheimer's phenotypes without blocking peripheral T cell IL-2 response[J]. Alzheimers Res Ther, 2023, 15(1): 179
[20] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 57
[21] FRANGOUL H, ALTSHULER D, CAPPELLINI M D, et al. CRISPR-Cas9 gene editing for sickle cell disease and β-thalassemia[J]. N Engl J Med, 2021, 384(3): 252-260
[22] RUSTIGHI A, ZANNINI A, CAMPANER E, et al. PIN1 in breast development and cancer: a clinical perspective[J]. Cell Death Differ, 2017, 24(2): 200-211
[23] LA R S. Diagnostic, prognostic, and predictive role of Ki67 proliferative index in neuroendocrine and endocrine neoplasms: past, present, and future[J]. Endocr Pathol. 2023, 34(1): 79-97
[24] 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
[25] HAARWOOD D S L, PEDERSEN V, BAGER N S, et al. Glioblastoma cells increase expression of notch signaling and synaptic genes within infiltrated brain tissue[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 7857

(收稿:2025-12-26;修回:2026-03-22;录用:2026-03-24)
(本文编辑:戴王娟)