

引用格式:

曹谱, 唐午阳, 张林林, 刘威哲, 王肖燕, 屠迪, 郑晓峰, 李丕顺. RBM25通过PRC1.6复合物调控小鼠胚胎干细胞向2C-like阶段的转换[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2026, 52(1): 113–121.

CAO P, TANG W Y, ZHANG L L, LIU W Z, WANG X Y, TU D, ZHENG X F, LI P S. RBM25 regulates the transition of mouse embryonic stem cells to the 2C-like stage through PRC1.6 complex[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2026, 52(1): 113–121.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



RBM25通过PRC1.6复合物调控小鼠胚胎干细胞向2C-like阶段的转换

曹谱, 唐午阳, 张林林, 刘威哲, 王肖燕, 屠迪, 郑晓峰, 李丕顺*

(湖南农业大学动物医学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 为阐明RNA结合蛋白25(RBM25)在小鼠胚胎干细胞(mESCs)命运转换中的作用及其分子机制, 采用短发夹RNA(shRNA)构建*Rbm25*稳定敲低细胞系, 并结合公开的RNA-seq/CUT&Tag数据、生物信息学分析、qRT-PCR、Western blot、碱性磷酸酶染色、2C::tdTomato报告系统、CUT&Tag-qPCR及双荧光素酶报告试验, 系统评估*Rbm25*在多能性维持和2C-like程序激活中的功能。结果表明: *Rbm25*下调后, mESCs集落形态异常, 碱性磷酸酶活性明显降低, Oct4GiP报告信号下降, 核心多能性基因*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*Nanog*在转录和蛋白水平的表达均明显降低; 与此同时, *Gata3*、*Gata4*、*Gata6*、*Foxa2*、*Cdx2*和*Wnt9a*等分化相关基因上调, *MERVL*、*Zscan4*、*Tcstv1*、*Tcstv3*、*Zfp352*和*Sp110*等2C阶段特异性基因明显激活, 2C-like细胞比例明显增加。RBM25可直接富集于*Rnf2*、*Pcgf6*、*Max*和*Mga*等PRC1.6关键亚基基因的启动子区域, 并增强其启动子活性, 当*Rbm25*缺失时, 这些亚基表达下调, 提示PRC1.6对2C转录程序的抑制能力被削弱。综上, RBM25不仅是维持mESCs多能性的重要调控因子, 也是限制mESCs向2C-like状态转换的关键分子, 其作用机制与转录激活PRC1.6复合物核心组分密切相关。

关键词: 小鼠胚胎干细胞; RNA结合蛋白25(RBM25); RNA干扰技术; 2C-like; 多梳抑制复合体1.6(PRC1.6)

中图分类号: Q78

文献标志码: A

文章编号: 1007–1032(2026)01–0113–09

RBM25 regulates the transition of mouse embryonic stem cells to the 2C-like stage through PRC1.6 complex

CAO Pu, TANG Wuyang, ZHANG Linlin, LIU Weizhe, WANG Xiaoyan, TU Di, ZHENG Xiaofeng, LI Pishun*

(College of Veterinary Medicine, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: To learn about the role of RNA-binding protein 25(RBM25) in cell-fate regulation of mouse embryonic stem cells(mESCs), this study established a stable *Rbm25*-knockdown mESC line using shRNA and systematically evaluated its function in pluripotency maintenance and 2-cell-like(2C-like) conversion by integrating public RNA-seq/CUT&Tag datasets, bioinformatic analyses, qRT-PCR, Western blot, alkaline phosphatase staining, a 2C::tdTomato reporter system, CUT&Tag-qPCR, and dual-luciferase assays. The results showed that *Rbm25* depletion disrupted colony morphology and alkaline phosphatase activity, reduced Oct4GiP reporter positivity, and markedly decreased the transcriptional and protein expression of the core pluripotency genes *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *Nanog*. And, differentiation-associated genes, including *Gata3*, *Gata4*, *Gata6*, *Foxa2*, *Cdx2*, and *Wnt9a*, were up-regulated, whereas 2C-specific genes such as *MERVL*, *Zscan4*, *Tcstv1*, *Tcstv3*, *Zfp352*, and *Sp110* were robustly activated, accompanied by a significant increase in the proportion of 2C-like cells. RBM25 was enriched at the promoter regions of key PRC1.6 subunit genes, including *Rnf2*, *Pcgf6*, *Max*, and *Mga*, and enhanced their promoter activities. Loss of *Rbm25* reduced the expression of these PRC1.6 components, suggesting that repression of the 2C transcription was weakened. These findings identify RBM25 as an essential regulator

收稿日期: 2025–03–26

修回日期: 2026–03–13

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(2021JJ30354、2023JJ30291); 湖南省教育厅科学研究重点项目(23A0198); 湖南省普通高等学校科技创新团队支持项目(2050205)

作者简介: 曹谱(1998—), 男, 湖南益阳人, 硕士研究生, 主要从事小鼠胚胎干细胞研究, 2919031838@qq.com; *通信作者, 李丕顺, 博士, 副教授, 主要从事表观遗传学、动物胚胎干细胞研究, lipishun@hunau.edu.cn

of mESC pluripotency and a critical barrier to the 2C-like state transition, acting in part by transcriptionally activating core components of the PRC1.6 complex.

Keywords: mouse embryonic stem cells; RNA binding protein 25(RBM25); RNA interference technology; 2C-like; polycomb inhibitory complex 1.6(PC1.6)

胚胎干细胞(ESCs)是从胚胎发育早期囊胚内细胞团中分离获得的一种多能性细胞^[1]。ESCs在体外培养条件下具有自我更新能力,在特定条件下,ESCs可以分化成各种功能细胞,进而形成机体各种复杂的组织器官^[2-4]。此外,体外培养的ESCs具有高度的异质性。研究^[5]发现,培养中的ESCs中存在一类被称为“2C-like细胞”的细胞亚群,其转录谱与2细胞期胚胎的转录谱高度相似,且具有嵌合胚胎内外组织的能力,因此,被认定为一类全能性细胞。2C-like细胞亚群可以用来解析全能性细胞的分子特征,小鼠早期胚胎的生物学特性、发育调控和合子基因组激活分子机制等。近几年,2C-like细胞亚群已受到广泛关注。

ESCs向2C-like的转换受多种转录因子、表观遗传调控因子和染色质重塑复合物的精细调控^[6-8]。2C-like细胞具有激活内源性逆转录病毒(ERV)家族成员MERVL以及2C阶段特异性基因*Zscan4*和*Tcstv1/3*的显著特征^[9-11],显示出类似早期胚胎2细胞期的类全能性^[12]。研究表明,双同源盒转录因子DUX是启动2C转录程序的关键激活因子^[13],而*Zscan4*则在维持2C-like细胞的端粒稳定性和基因组完整性中发挥重要作用^[14]。相反,KAP1^[15]、SETDB1^[16]及多梳抑制复合体1.6(PC1.6复合物)^[17-18]可通过抑制2C特异性基因的表达,负调控2C-like细胞的激活。ESCs向2C-like细胞的转换涉及复杂的转录调控和表观遗传网络,这一过程对阐明细胞全能性建立机制、早期胚胎发育规律以及细胞重编程过程均具有重要意义。

PC1.6作为多梳抑制复合体1的一个亚型,在ESCs中具有重要的调控作用,主要参与基因转录抑制、细胞命运决定和发育过程。在ESCs中PC1.6与RING1A/B和PCGF6相互作用,通过H2AK119ub(组蛋白H2A的119位赖氨酸单泛素化)抑制关键转录因子,从而控制多能性基因的表达。已有研究^[19-21]表明,PC1.6可与Rif1结合,敲低PC1.6可促进小鼠胚胎干细胞(mESCs)向2C-like细胞转换,并影响mESCs的分化。

RNA结合蛋白25(RBM25)属于RNA结合蛋白大家族,是一个高度保守的剪切因子^[22-23],共有843个氨基酸,含有多个结构域,其主要由3个蛋白结构域组成:位于N末端的脯氨酸富集区和RNA识别结合结构域、富含精氨酸-天冬氨酸/精氨酸-谷氨酸二肽富集区(RD/RE-rich)的中央结构域、位于C末端的脯氨酸-色氨酸-异亮氨酸(PWI)结构域。RD/RE-rich结构域及PWI结构域是RNA结合蛋白家族所共有的特征。RD/RE-rich结构域可以介导RBM25定位到富含剪接因子的核斑点区域;C端PWI结构域也可以与RNA相结合,该结构域由一个保守的四螺旋束组成,侧翼的基本区域形成2个 α -螺旋,并与PWI结构域的螺旋H4相关联^[24-25]。已有研究^[26-28]表明,RBM25作为可变剪切因子调控下游靶基因的表达,*Rbm25*异常表达可引起多种疾病,如心力衰竭和各种癌症等。基于BioGPS数据库的分析结果显示,*Rbm25*在胚胎干细胞中高度表达,而目前在胚胎干细胞领域中对*Rbm25*的研究较少。

胚胎干细胞的显著特点是具有多能性和自我更新能力,前期研究^[29]筛选了一系列与mESCs多能性相关的基因,本研究在此基础上选取*Rbm25*作为研究对象,通过构建*Rbm25*敲低细胞系,观察其表型及分化方向并阐释其分子机制,以期进一步完善小鼠胚胎干细胞向2C-like细胞转换的调控网络。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠胚胎干细胞E14tg2a株、293T细胞由湖南农业大学湖南省兽药工程技术研究中心保存。

1.2 方法

1.2.1 *Rbm25*基因敲低小鼠胚胎干细胞系构建

根据小鼠*Rbm25*(NM_001364416.1)序列,设计并合成3条特异性短发夹RNA(shRNA):shRbm25-1(5'-CGATGATTCCTGTACCAATG-3')、shRbm25-2(5'-CCGTGTCCATGGTTGGAAAGC-3')、shRbm25-3(5'-CGAAGAGACCAGATGATTAAG-3')。以靶向绿

色荧光蛋白(GFP)的shRNA(shGFP)为阴性对照(NT)。各shRNA寡核苷酸经双链合成后,克隆至pLKO.1-TRC载体中。

使用293T细胞进行慢病毒包装,通过共转染pLKO.1-shRNA质粒、psPAX2及pMD2.G(质量比为3:2:1)完成。转染8 h后更换新鲜培养基,继续培养48 h,收集含病毒颗粒的上清液。将病毒液感染mESCs,培养48 h后使用含2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素的培养基筛选,获得稳定细胞系,分别记为shRbm25-1#、shRbm25-2#、shRbm25-3#。采用qRT-PCR及Western blot检测Rbm25基因敲低效率,验证敲低小鼠胚胎干细胞系是否构建成功。qRT-PCR试验的基因引物序列如表1所示。按照SuperScript™ III Platinum™一步法qRT-PCR试剂盒(赛默飞,货号11732088)的体系与程序进行qRT-PCR试验。

表1 qRT-PCR反应所用部分引物

Table 1 Partial Primers for qRT-PCR in this study	
引物	引物序列(5'—3')
Rbm25-F	GTTGAGCTGGAAGAGAGTGCA
Rbm25-R	CTCTCCAATCTGAAGGTCATG
Oct4-F	AACCTTCAGGAGATATGCAA
Oct4-R	ACCTCACACGGTTCTCAATGC
Sox2-F	AACTTTGTCCGAGACCGAGA
Sox2-R	CGCGGCCGGTATTATAATC
Nanog-F	AGCCTCCAGCAGATGCAAGA
Nanog-R	GCACTTCATCCTTTGGTTTTGA
Gata6-F	GAGCTGGTGCTACCAAGAGG
Gata6-R	ATTTTTGCTGCCATCTGGAC
Tcstv1-F	GACCACCTGAACCATCCATC
Tcstv1-R	CACCTCAGGCTGCAGTTGTA
Tcstv3-F	ACCAGCTGAAACATCCATCC
Tcstv3-R	CCATGGATCCCTGAAGGTAA
Eif1a-F	AACAGGCGCAGAGGTAATAA
Eif1a-R	GCACAGCCTCCTTACACCAT
Zscan4-F	AAATGCCTTATGTCTGTCCCTATG
Zscan4-R	TGTGGTAATTCTCAGGTGACGAT
Gata3-F	CCTCTGGAGGAGGAACGCTAAT
Gata3-R	GTTTCGGGTCTGGATGCCTTCT
Gata4-F	GCCTCTATACAAGATGAACGGC
Gata4-R	TACAGGCTCACCTCGGCATTA
Foxa2-F	CGAGCACCATTACGCCTCAAC
Foxa2-R	AGTGCATGACCTGTTCTGATGGC
Cdx2-F	AAACCAGGACGAAGGACAAATACCG
Cdx2-R	GGTGATATAGCGGCTGTAGTGGAAC
Pcgf6-F	GTGCGTGTTCAGGAGAAGCAAC
Foxa2-F	CGAGCACCATTACGCCTCAAC
Foxa2-R	AGTGCATGACCTGTTCTGATGGC
Cdx2-F	AAACCAGGACGAAGGACAAATACCG
Cdx2-R	GGTGATATAGCGGCTGTAGTGGAAC

表1(续)

引物	引物序列(5'—3')
Pcgf6-F	GTGCGTGTTCAGGAGAAGCAAC
Pcgf6-R	CACCTATTGCACGTCGGATTCC
MERVL-F	CGCAGTTGTTGGTTTTGGAA
MERVL-R	AGCCAGTTTCTGGGTGTTGT
Mga-F	AGCAGCAGCAGAGGAAAGAG
Mga-R	TTGGTGGTGATGGTGGTGTA
Max-F	AGGAGGAGGAGGAGGAGAAG
Max-R	TCTGCTGCTGCTGCTGTT
L3mbtl2-F	AGCAGCAGCAGCAGAAAGAA
L3mbtl2-R	TTGGTGGTGATGGTG

1.2.2 mESCs多能性测定

提取不同处理组mESCs总RNA,逆转录合成cDNA。采用qRT-PCR试剂盒,检测Oct4、Sox2、Klf4等多能性标志基因和Gata家族、Foxa2、Cdx2、Wnt9a等分化相关基因的表达。基因引物序列见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析数据。

采用Western blot法检测蛋白表达水平。细胞裂解提取总蛋白后,经SDS-PAGE电泳分离并转印至NC膜;封闭处理后依次孵育一抗及HRP标记的二抗,采用ECL化学发光法检测,运用ImageJ软件分析图像。

采用碱性磷酸酶(AP)试剂盒对mESCs的干性状态进行鉴定。弃去培养基,用PBS清洗2遍后,加入4%多聚甲醛固定10 min。按照10 mL AP显色缓冲液+33 μL BCIP+66 μL NBT的比例配制AP染色工作液。吸去甲醛,用PBS清洗3遍,每遍5 min;加入足量AP染色工作液覆盖样本,室温避光孵育30 min;弃去染色液,用蒸馏水洗涤1~2次以终止显色反应;室温避光静置过夜,次日拍照观察。

1.2.3 生物信息学分析

RNA-seq数据分析:从GSA数据库中下载Rbm25敲除(Rbm25 KO)与野生型(Rbm25 WT) mESCs的RNA-seq数据(<https://bigd.big.ac.cn/gsa/browse/CRA023754>),运用Cuffdiff软件识别数据中的差异基因,并保留差异有统计学意义($P < 0.05$)且 $|\log_2\text{FC}| \geq 1$ (FC为差异倍数)的基因,运用在线软件Hiplot(<https://hiplot.com.cn/login?redirect=%2Fcloud-tool%2Fdrawing-tool%2Flist>)进行差异表达可视化分析。

CUT&Tag数据分析:采用fastp(版本0.23.1)软件^[30]对原始数据(<https://bigd.big.ac.cn/gsa/browse/CRA023754>)进行数据质控,得到高质量的clean

data(质控后的有效数据);将clean data与参考基因组进行比对,以Input为背景对照,运用Bowtie2和MACS2软件分别完成数据比对与峰值识别,对各样品注释到的基因进行统计与GO功能富集分析,并使用IGV浏览器进行可视化展示。

1.2.4 2C-like细胞比例测定

提取不同处理组mESCs总RNA,逆转录合成cDNA,并通过qRT-PCR检测*MERVL*、*Zscan4*、*Tctvl1*等2C特异性基因的表达水平。基因引物序列见表1。使用带有2C特异性tdTomato(2C::tdTomato)报告基因的mESCs细胞系,经荧光显微镜观察及流式细胞术定量分析,评估*Rbm25*敲低对2C-like细胞比例的影响。

1.2.5 RBM25与PRC1.6基因启动子的结合水平检测

采用CUT&Tag方法检测RBM25在PRC1.6复合物亚基基因启动子区域的结合情况。使用磁珠固定收集的mESCs细胞,依次与RBM25一抗、Tn5转座酶复合体孵育,进行DNA片段化处理。构建测序文库后,采用Illumina高通量测序平台进行测序。后续数据分析同1.2.3的CUT&Tag数据分析。采用qRT-PCR检测

RBM25与*Pcgf6*、*Rnf2*、*Max*、*Mga*等基因启动子区域的结合水平。基因引物序列见表1。

1.2.6 双荧光素酶报告试验

分别克隆*Rnf2*、*Mga*、*Max*和*Pcgf6*基因启动子至载体pGL3;待293T细胞达70%~80%融合度时,使用Lipofectamine 3000(Invitrogen)进行转染,转染质粒为荧光素酶报告质粒、pRL-TK(Renilla内参质粒)及RBM25过表达质粒(HA-RBM25)或空载体。转染48 h后,采用双荧光素酶检测系统(Promega)测定荧光素酶活性。试验设3个平行孔,结果以荧光素酶活性相对值表示。

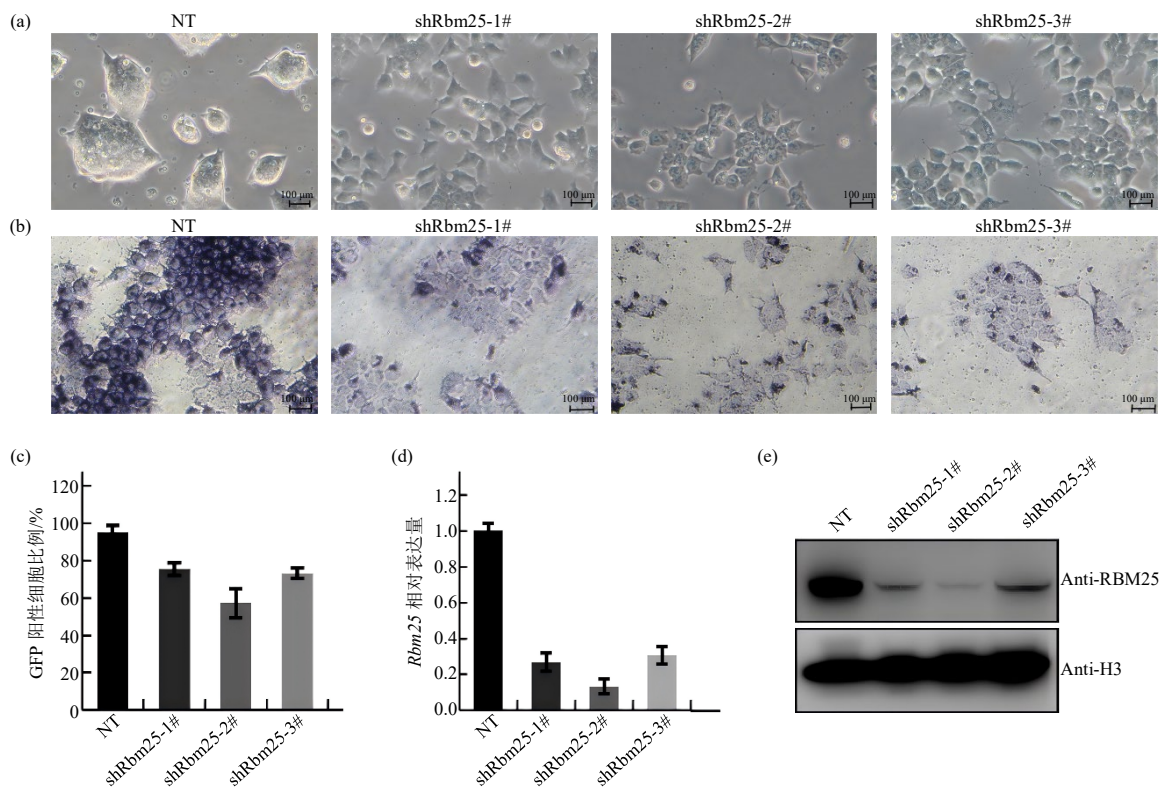
1.3 数据处理与统计分析

所有试验均设3个重复,每组试验重复3次。采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 RBM25是维持ESCs多能性状态的重要因子

从图1可知,*Rbm25*敲低后,mESCs集落形态异



(a) *Rbm25*敲低后ESCs的形态; (b) *Rbm25*敲低后碱性磷酸酶(AP)的活性; (c) shRbm25处理后GFP阳性细胞比例; (d) *Rbm25*在NT和不同shRbm25干扰组中的表达水平; (e) RBM25在NT和shRbm25干扰细胞中的表达情况

图1 *Rbm25*敲低效率及mESCs的表型变化

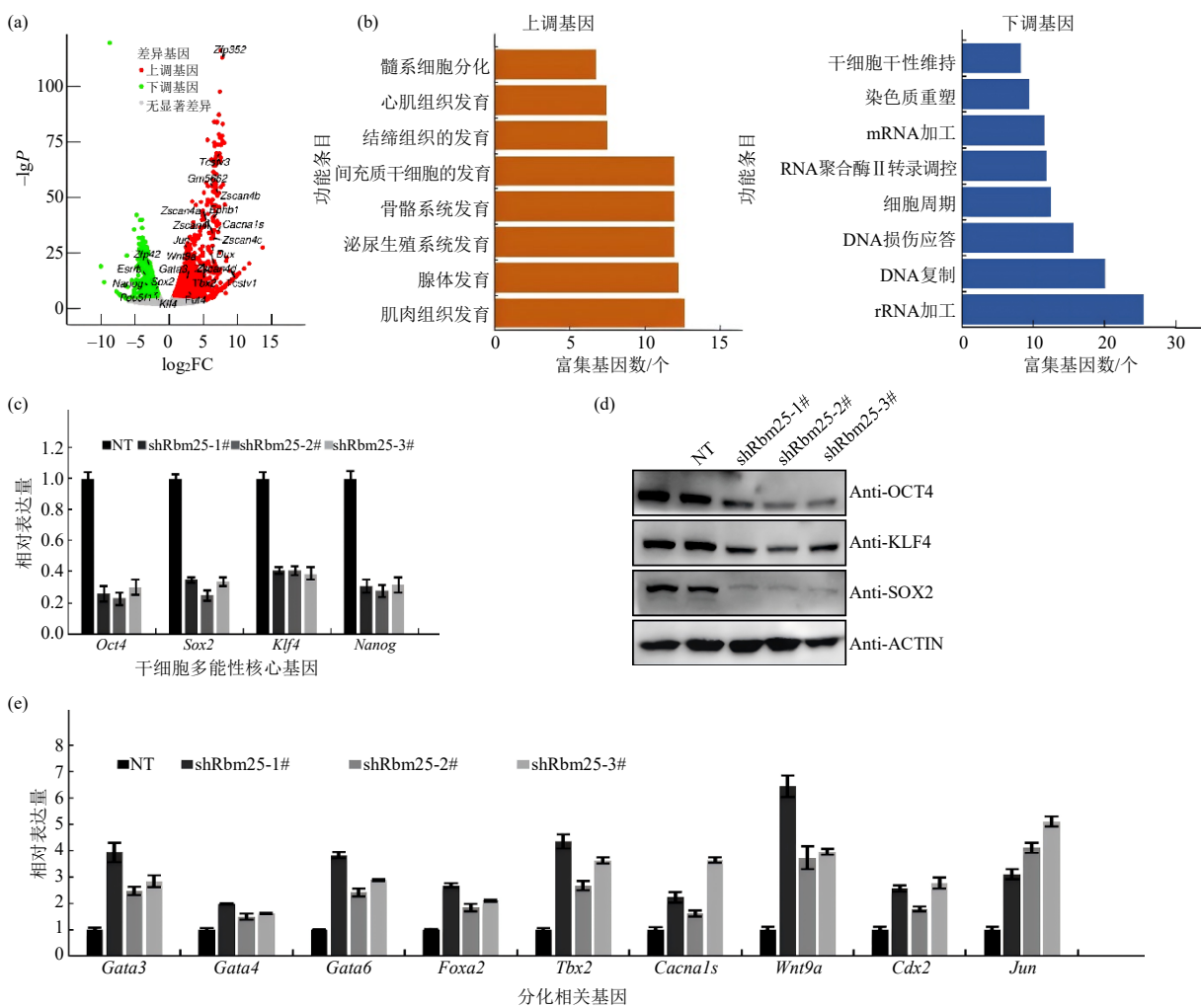
Fig. 1 The efficiency of *Rbm25* knockdown and the phenotypic changes of mESCs

常, ESCs发生分化(图1(a)); AP活性下降(图1(b)); Oct4GiP报告试验结果显示, GFP阳性细胞比例降低(图1(c)); 且*Rbm25*在mRNA和蛋白水平表达均明显下降(图1(d)和图1(e)), 这表明*Rbm25*在维持小鼠胚胎干细胞多能性状态中起重要作用。

2.2 *Rbm25*敲低改变mESCs转录谱

从图2可知, *Rbm25*敲除导致mESCs转录谱显著改变(图2(a)), 其中上调基因主要富集于肌肉组织发育、泌尿生殖系统发育等分化相关功能, 而下调基因则涉及染色质重塑、RNA聚合酶II转录调控、DNA

损伤应答等干细胞稳态相关功能(图2(b)); 此外, 干细胞多能性核心基因*Oct4*、*Sox2*、*Klf4*和*Nanog*在mRNA水平(图2(c))和蛋白水平(图2(d))的表达均明显下调, 这表明*Rbm25*敲低降低了mESC的干性维持能力; 同时, 多种胚层和分化相关基因(如*Gata*家族、*Foxa2*、*Cdx2*、*Wnt9a*等)在*Rbm25*敲低后表达上调(图2(e)), 这表明mESC发生了分化倾向。上述结果表明, RBM25通过维持干细胞关键转录因子的表达、抑制分化相关基因转录, 维持mESCs的多能性和自我更新状态。



(a) 敲除*Rbm25*后差异表达基因(DEGs)的分布; (b) GO功能富集分析结果; (c) 干细胞核心基因在NT和sh*Rbm25*细胞中的相对表达水平; (d) 干细胞核心转录因子在NT和sh*Rbm25*细胞中的表达情况; (e) 分化相关基因在*Rbm25*敲低后的表达水平

图2 *Rbm25*敲低mESCs的转录组表达情况

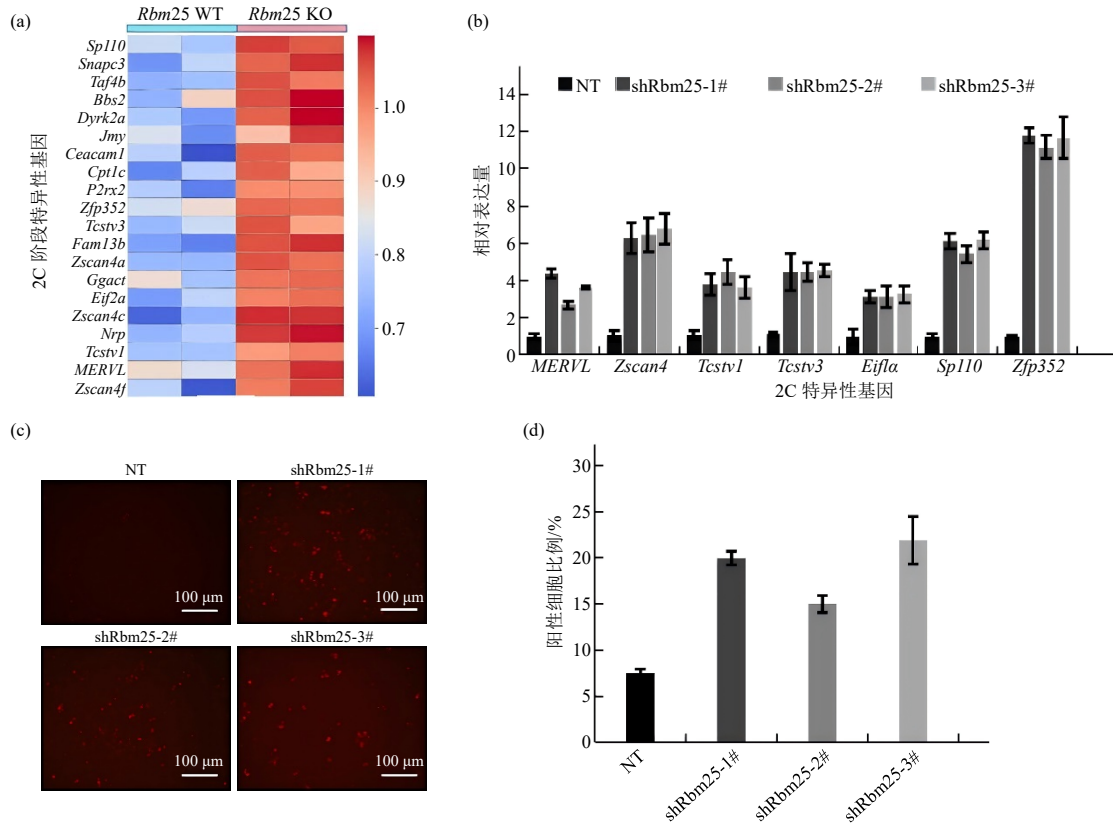
Fig.2 The transcriptional expression profile of mESCs with *Rbm25* knockdown

2.3 *Rbm25*敲低促进2C阶段特异性基因的高表达
通过对RNA-seq数据的进一步分析发现,

*Rbm25*敲除明显激活了2C特异性基因的表达(图2(a)和图3(a))。qRT-PCR检测结果(图3(b))显示, 包括

Zfp352、*Zscan4*、*Tcstv1*、*Tcstv3*等2C特异性基因在*Rbm25*沉默后表达水平明显升高,这表明RBM25可能调控ESCs向2C-like细胞转换。*Rbm25*沉默后,tdTomato阳性细胞明显增加(图3(c)和图3(d))。

tdTomato阳性细胞可指示2C-like细胞,由此可见,RBM25在ESCs向2C-like细胞转换过程中发挥重要调控作用。



(a) NT和*Rbm25*敲除细胞中2C特异性基因的转录表达情况; (b) 2C特异性基因在NT和shRbm25细胞中的相对表达水平;

(c) 2C-like细胞荧光显微镜图像; (d) NT和shRbm25细胞中tdTomato阳性细胞的比例

图3 *Rbm25*敲低mESCs的2C特异性基因表达情况及报告细胞中的荧光强度和阳性细胞比例

Fig. 3 The expression of 2C-specific genes in *Rbm25* knockdown mESCs and the fluorescence intensity and proportion of positive cells in reporter cells

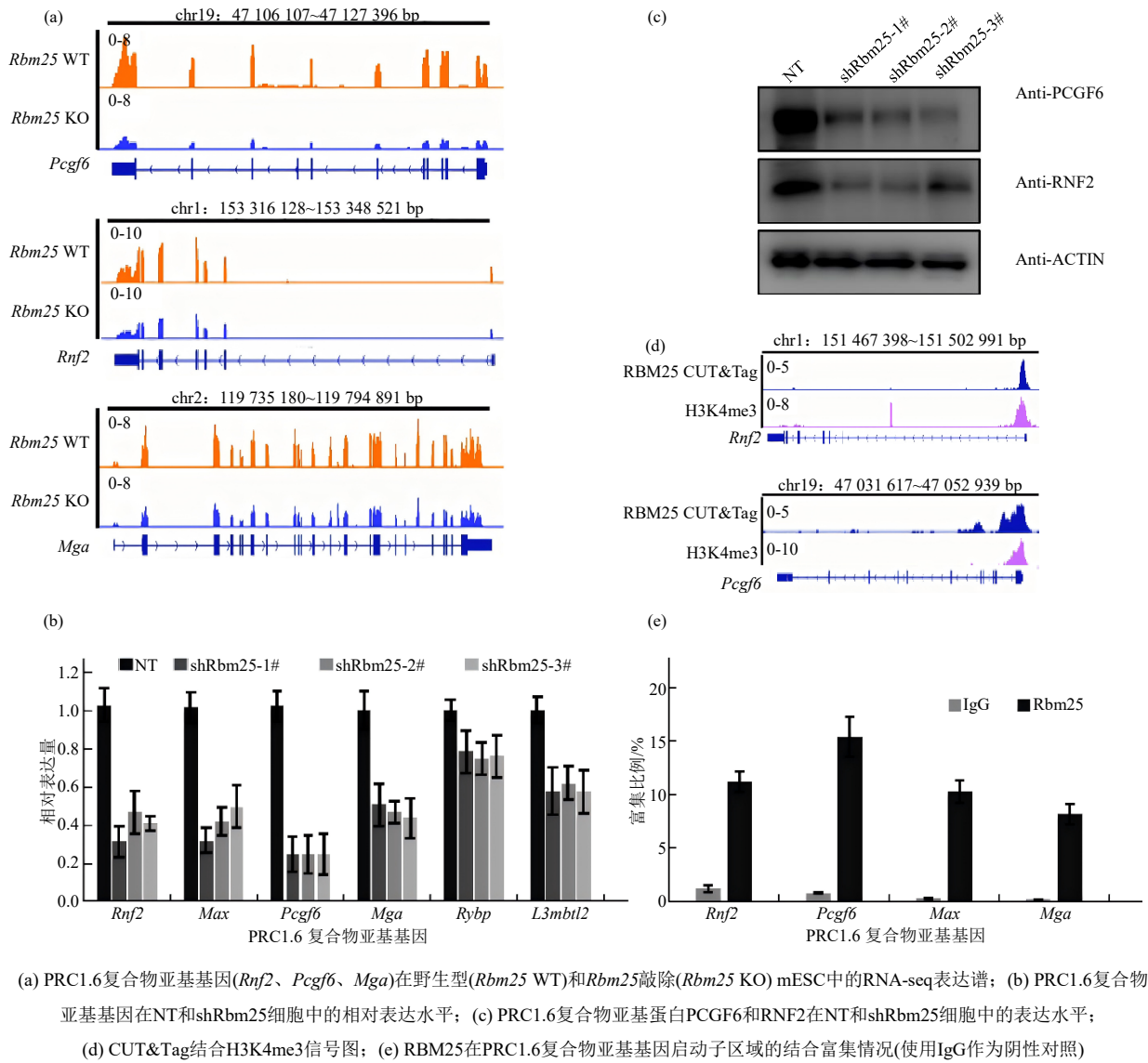
2.4 *Rbm25*敲低导致PRC1.6复合物重要亚基的低表达

为了解*Rbm25*沉默促进mESCs转换为2C-like细胞的分子机制,对*Rbm25*缺失后的RNA-seq进行分析,发现PRC1.6复合物亚基基因*Rnf2*、*Max*、*Pcgf6*和*Mga*的表达在*Rbm25*缺失后显著下调(图4(a)和图4(b))。Western blot结果显示,*Rbm25*敲低显著降低PRC1.6复合物核心亚基PCGF6和RNF2的水平(图4(c))。CUT&Tag分析结果表明,RBM25直接结合在*Rnf2*和*Pcgf6*基因启动子区域(图4(d))。Cut&Tag-qPCR试验结果显示,RBM25在*Rnf2*、*Pcgf6*、*Max*和*Mga*等基因启动子处富集(图4(e))。以

上结果表明,RBM25通过直接结合PRC1.6复合物亚基基因的启动子区域,促进其表达,从而维持PRC1.6复合物的功能。

2.5 *Rbm25*激活PRC1.6复合物的表达

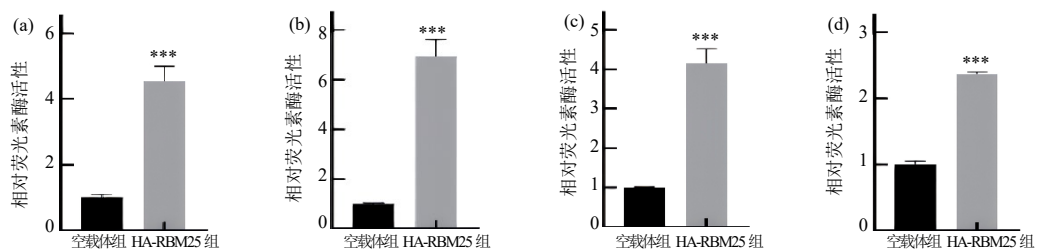
从图5可知,共转染HA-RBM25表达载体显著增强了这些启动子驱动的荧光素酶活性,相比空载体对照,启动子活性提高了2~3倍以上。这些结果表明,RBM25能够直接激活PRC1.6复合物亚基基因启动子活性,从而促进它们的表达,这也揭示了*Rbm25*在调控PRC1.6复合物亚基基因表达中的重要作用。



(a) PRC1.6复合物亚基基因(*Rnf2*、*Pcgf6*、*Mga*)在野生型(*Rbm25* WT)和*Rbm25*敲除(*Rbm25* KO) mESC中的RNA-seq表达谱; (b) PRC1.6复合物亚基基因在NT和sh*Rbm25*细胞中的相对表达水平; (c) PRC1.6复合物亚基蛋白PCGF6和RNF2在NT和sh*Rbm25*细胞中的表达水平; (d) CUT&Tag结合H3K4me3信号图; (e) RBM25在PRC1.6复合物亚基基因启动子区域的结合富集情况(使用IgG作为阴性对照)

图4 *Rbm25*敲低组PRC1.6复合物亚基基因表达情况

Fig. 4 The expression of genes for the subunits of the PRC1.6 complex in the *Rbm25* knockdown group



图柱上***表示HA-RBM25表达载体与空载体的相对荧光素酶活性间的差异有统计学意义($P < 0.001$)。

(a) *Rnf2* 启动子活性; (b) *Mga* 启动子活性; (c) *Max* 启动子活性; (d) *Pcgf6* 启动子活性

图5 RBM25关联PRC1.6复合物亚基基因的启动子活性

Fig. 5 *Rbm25* activates the promoter activity of the PRC1.6 complex subunit genes

3 结论与讨论

RBM25是一个高度保守的剪接因子,广泛存在于真核生物中。RBM25通过可变剪切,调节基因*Bcl2l1*的促凋亡转录本Bcl-xS和抗凋亡转录本Bcl-xL的平衡,促进HeLa细胞的凋亡^[31];在Jurkat细胞和人胚胎干细胞来源的心肌细胞中,RBM25可介导SCN5A mRNA的截断,使其发生异常剪接,导致Na⁺通道电流降低,从而引发心衰^[32-33]。现有报道多将RBM25界定为RNA可变剪切调控因子,通过调控下游靶基因的可变剪切,影响基因的表达。但在本研究中,没有观察到干细胞多能性核心基因*Oct4*、*Sox2*和*Nanog*的剪接异常,据此推测RBM25并非通过可变剪切功能影响ESCs,而是直接参与转录调控。研究发现,多种RNA结合蛋白在转录中起直接作用,例如典型的剪接调节因子SRSF2和NONO^[34-35]。本研究结果表明,RBM25在胚胎干细胞中也具有重要的转录调控功能。

本研究中,RBM25通过调控PRC1.6复合物的表达,显著影响mESCs向2C-like细胞的转换。敲低*Rbm25*导致mESCs多能性下降,干细胞多能性核心基因(如*Oct4*、*Sox2*、*Nanog*)表达水平降低,而分化相关基因表达显著上升。对RNA-seq数据的进一步分析发现,*Rbm25*敲除显著上调了2C阶段特异基因(如*Zscan4*、*Tcstv1*、*Tcstv3*)的表达,本研究通过在2C::tdTomato细胞中敲低*Rbm25*,验证这一结果。通过分析RNA-seq数据,发现PRC1.6复合物亚基基因*Rnf2*、*Max*、*Pcgf6*和*Mga*的表达在*Rbm25*缺失后显著下调,Cut&Tag-qPCR试验证实,RBM25直接结合PRC1.6复合物亚基基因的启动子区域,促进其表达,从而维持PRC1.6复合物的功能。通过克隆*Rnf2*、*Mga*、*Max*和*Pcgf6*基因启动子至载体pGL3,建立荧光素酶报告系统,结果表明,RBM25能够直接激活PRC1.6复合物亚基基因启动子活性,进而促进它们的表达。

综上所述,本研究结果揭示,RBM25作为重要的转录调控因子参与了ESCs向2C-like细胞转换的过程,未来研究可进一步探索RBM25介导的具体转录网络,以全面揭示其在胚胎干细胞命运决定中的作用机制。

参考文献:

- [1] RAVAIOLI E, BAUCHE J, DUMAS M, et al. First experimental demonstration of the ESC protection method[J]. *Superconductor Science and Technology*, 2025, 38(12): 125006.
- [2] LI Y Q. Master stem cell transcription factors and signaling regulation[J]. *Cellular Reprogramming*, 2010, 12(1): 3-13.
- [3] PAN G J, CHANG Z Y, SCHÖLER H R, et al. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4[J]. *Cell Research*, 2002, 12(5/6): 321-329.
- [4] CHEN X, VEGA V B, NG H H. Transcriptional regulatory networks in embryonic stem cells[J]. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2008, 73: 203-209.
- [5] MACFARLAN T S, GIFFORD W D, DRISCOLLS, et al. Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity[J]. *Nature*, 2012, 487: 57-63.
- [6] HALTER K, CHEN J Y, PRIKLOPIL T, et al. *Cdk8* and *Hira* mutations trigger X chromosome elimination in naive female hybrid mouse embryonic stem cells[J]. *Chromosome Research*, 2024, 32(4): 12.
- [7] CERNECKIS J, CAI H X, SHI Y H. Induced pluripotent stem cells(iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2024, 9(1): 112.
- [8] WANG X Y, CHENG R Q, WU C Y, et al. Trophectoderm-like cells from EPS cells enable generating EPS cell-derived post-implantation embryoids that complete gastrulation[J]. *Protein & Cell*, 2026, 17(2): 127-144.
- [9] LIN M Q, DU Z L, GUO D, et al. *Dux* cluster duplication ensures full activation of totipotent genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2025, 122(10): e2421594122.
- [10] FILIMONOW K, CHOŁONIEWSKA A, CHOŁONIEWSKI J, et al. Stage-sensitive potential of isolated rabbit ICM to differentiate into extraembryonic lineages[J]. *Biology of Reproduction*, 2025, 113(5): 1102-1120.
- [11] KONG X, JIANG N, CHEN S W, et al. OTX2 inhibits human pluripotent stem cell reprogramming toward 8-cell-like and morula-like states[J]. *Nature Communications*, 2026, 17(1): 1685.
- [12] WU J, IZPISUA BELMONTE J C. Dynamic pluripotent stem cell states and their applications[J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(5): 509-525.
- [13] HENDRICKSON P G, DORÁIS J A, GROWE J, et al. Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons[J]. *Nature Genetics*, 2017, 49(6): 925-934.

- [14] ZALZMAN M, FALCO G, SHAROVA L V, et al. *Zscan4* regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells[J]. *Nature*, 2010, 464: 858–863.
- [15] ROWE H M, JAKOBSSON J, MESNARD D, et al. KAP1 controls endogenous retroviruses in embryonic stem cells[J]. *Nature*, 2010, 463: 237–240.
- [16] KARIMI M M, GOYAL P, MAKSAKOVA I A, et al. DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mESCs[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 8(6): 676–687.
- [17] STIELOW B, FINKERNAGEL F, STIEWE T, et al. MGA, L3MBTL2 and E2F6 determine genomic binding of the non-canonical polycomb repressive complex PRC1.6[J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(1): e1007193.
- [18] ENDO H M, ENDO T A, SHINGA J, et al. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes[J]. *eLife*, 2017, 6: e21064.
- [19] LI L, LIP S, CHEN J L, et al. Rif1 interacts with non-canonical polycomb repressive complex PRC1.6 to regulate mouse embryonic stem cells fate potential[J]. *Cell Regeneration*, 2022, 11(1): 25.
- [20] LIP S, WANG L, BENNETT B D, et al. Rif1 promotes a repressive chromatin state to safeguard against endogenous retrovirus activation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(22): 12723–12738.
- [21] 李露. Rif1与PRC1.6复合物调节胚胎干细胞命运潜能[D]. 长沙: 中南大学, 2022.
- [22] 张可意, 杨萍. RNA结合基序蛋白介导的可变剪接在心力衰竭中的作用机制进展[J]. *心血管病学进展*, 2025, 46(4): 327–331.
- [23] GE Y, SCHUSTER M B, PUNDIR S, et al. The splicing factor RBM25 controls MYC activity in acute myeloid leukemia[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 172.
- [24] GONG D S, YANG F, LI F D, et al. Crystal structure and functional characterization of the human RBM25 PWI domain and its flanking basic region[J]. *The Biochemical Journal*, 2013, 450(1): 85–94.
- [25] SZYMCZYNA B R, BOWMAN J, MCCRACKEN S, et al. Structure and function of the PWI motif: a novel nucleic acid-binding domain that facilitates pre-mRNA processing[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(4): 461–475.
- [26] ZHU Z W, PU J, LI Y N, et al. RBM25 regulates hypoxic cardiomyocyte apoptosis through CHOP-associated endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2023, 28(6): 861–876.
- [27] GAO G, DUDLEY S C. RBM25/LUC7L3 function in cardiac sodium channel splicing regulation of human heart failure[J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2013, 23(1): 5–8.
- [28] 刘述, 丁虹, 赵可心, 等. RNA结合基序蛋白家族介导的可变剪接在心肌疾病中的研究进展[J]. *基础医学与临床*, 2022, 42(8): 1274–1278.
- [29] ZHENG X F, HU G. Oct4GiP reporter assay to study genes that regulate mouse embryonic stem cell maintenance and self-renewal[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2012(63): e3987.
- [30] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884–i890.
- [31] ZHOU A Y, OU A C, CHO A, et al. Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(19): 5924–5936.
- [32] GAO G, XIE A, HUANG S C, et al. Role of RBM25/LUC7L3 in abnormal cardiac sodium channel splicing regulation in human heart failure[J]. *Circulation*, 2011, 124(10): 1124–1131.
- [33] 蒲杰. RBM25与心肌细胞凋亡的相关机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2022.
- [34] LI K, WANG Z Q. Splicing factor SRSF2-centric gene regulation[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2021, 17(7): 1708–1715.
- [35] XIE R H, CHEN X, CHENG L, et al. NONO inhibits lymphatic metastasis of bladder cancer via alternative splicing of SETMAR[J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29(1): 291–307.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳正