



核因子I-X通过相分离调控颌面发育相关分子通路的研究*

王佳仪^{ID}, 樊怡, 徐若诗, 靖军军, 周学东^{ID}[△]

口腔疾病防治全国重点实验室 国家口腔医学中心 口腔疾病国家临床医学研究中心 四川大学华西口腔医院(成都 610041)

【摘要】 目的 探究核因子I-X(nuclear factor I-X, NFIX)是否具有相分离能力及通过相分离调控颌面发育相关生物学功能的机制。方法 将带有EGFP标签的NFIX全长蛋白重组质粒转染至U2OS细胞系中,使用共聚焦荧光显微镜观察其在细胞中的存在形式。使用蛋白分析工具PONDR分析NFIX蛋白结构,主要分析NFIX蛋白结构中形成生物凝聚体所需弱相互作用力相关的固有无序区(internal disordered region, IDR)。构建截短IDR的NFIX-EGFP质粒,观察其在细胞中存在形式的变化。使用免疫沉淀-质谱联用(immunoprecipitation-mass spectrometry, IP-MS)技术分析全长与截短蛋白与下游因子的互作差异。结果 全长EGFP-NFIX蛋白可以在细胞核内形成类似于无膜细胞器的凝聚体。PONDR的分析结果证实NFIX蛋白结构域中包含与生物凝聚体形成密切相关的IDR(aa245-494)(IDR2),将IDR2截短后,蛋白在细胞核中呈现弥散状态。IP-MS分析二者互作蛋白的差异,有多种蛋白表现出IDR2区段的依赖性,并在与颌面发育相关的MAPK等通路中显著富集。结论 NFIX不仅通过经典转录调控机制,还通过IDR介导的相分离机制调控骨发育稳态。这种生物分子凝聚体形成机制为解析NFIX相关颌面畸形综合征的发病机制提供了新视角。

【关键词】 核因子I-X 生物大分子凝聚体 颌面异常

Nuclear Factor I-X Regulates Molecular Pathways Related to Craniofacial Development Through Phase Separation

WANG Jiayi^{ID}, FAN Yi, XU Ruoshi, JING Junjun, ZHOU Xuedong^{ID}[△]. State Key Laboratory of Oral Diseases & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: zhouxu@scu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate whether nuclear factor I-X (NFIX) possesses phase separation capability and to elucidate its mechanism in regulating biological functions related to craniofacial development through phase separation. **Methods** An enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged full-length NFIX recombinant plasmid was transfected into U2OS cells, and its subcellular localization was observed using confocal fluorescence microscopy. The protein structure of NFIX was analyzed using the Predictor of Natural Disordered Regions (PONDR), a protein analysis instrument, with a focus on identifying intrinsically disordered regions (IDRs) associated with weak interactions required for biomolecular condensate formation. A truncated NFIX-EGFP plasmid lacking the IDR was constructed, and changes in its intracellular localization were observed. Immunoprecipitation-mass spectrometry (IP-MS) was utilized to analyze differences in protein interactions with downstream factors between full-length and truncated NFIX. **Results** In the nucleus, full-length EGFP-NFIX formed biomolecular condensates resembling membraneless organelles. PONDR analysis confirmed that NFIX contains an IDR (aa245-494) (IDR2), which is critical for biomolecular condensate formation. Truncation of IDR2 resulted in a diffuse protein distribution in the nucleus. IP-MS revealed that multiple proteins exhibited IDR2-dependent binding specificity and were significantly enriched in pathways related to craniofacial development, such as the MAPK pathway. **Conclusion** NFIX regulates bone developmental homeostasis not only through canonical transcriptional mechanisms but also through IDR-mediated phase separation. This biomolecular condensate formation mechanism provides new insights into the pathogenesis of NFIX-related craniofacial dysmorphogenesis syndromes.

[Key words] Nuclear factor I-X Biomolecular condensates Craniofacial abnormalities

核因子I(nuclear factor I, NFI)家族由四种经典转录

因子(NFIA、NFIB、NFIC、NFIX)组成。它们依靠保守的N端DNA结合/二聚化结构域和可变的C端转录调控区域调节下游基因表达,从而参与多种生物学活动^[1],同时是细胞互作网络的重要节点^[2-3],但其参与蛋白互作的驱动

* 国家自然科学基金(No. 82370945)资助

△ 通信作者, E-mail: zhouxu@scu.edu.cn

出版日期: 2025-11-20

机制与功能尚不清晰。

作为家族成员之一,核因子I-X(nuclear factor I-X, NFIX)在多种组织中表达,参与骨骼肌形成和修复^[4-5]、肿瘤抑制^[6]、神经发育^[7]等关键过程。NFIX基因变异会导致颌面发育异常,如以颌面过度发育为特征的Malan综合征和以骨龄超前、小颌畸形为特征的Marshall-Smith综合征^[8]。现有研究表明,NFIX蛋白N端结构域突变可导致单倍体蛋白剂量不足,影响DNA结合,引发Malan综合征;而C端转录调控区域突变可能通过显性负效应扰乱NFIX下游通路,导致Marshall-Smith综合征^[9-13]。然而,两类综合征背后与NFIX相关的分子调控网络仍未完全阐明。

相分离是生物大分子通过弱相互作用形成生物凝聚体的过程,受蛋白结构与pH及盐浓度等环境条件调控,为细胞活动划分无膜的空间分隔^[14-15]。蛋白质的固有无序区(internal disordered region, IDR)是一段缺乏稳定三维结构的序列,可以通过疏水作用、 π - π 堆积、电荷作用等弱相互作用促进凝聚体形成,介导复杂的分子互作网络^[16]。研究表明,相分离在颌颌面和神经发育调控中作用显著,如PPP2R5D-PP2A通过去磷酸化调控Liprin- α 1相分离,其致病突变会破坏该过程引发Houge-Janssens综合征^[17];POSH通过相分离与SHANK2/3形成共凝聚体,维持突触结构和树突棘发育^[18]。

基于此,本研究推测NFIX可能通过相分离发挥其调控发育的重要作用。为了验证这一假说,本研究探究了

NFIX是否具有形成相分离的能力,进而揭示NFIX通过相分离调控下游基因转录和细胞行为的新机制,为颌颌面畸形综合征发病机制研究和靶向治疗技术研发提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

本研究采用的U2OS及293T细胞来源于ATCC,购自Immocell平台,经过短串联重复序列(STR)鉴定正确,U2OS细胞使用含10%胎牛血清(Zeta)的McCoy's 5A培养基(Gibco),293T细胞使用含10%胎牛血清(Zeta)的DMEM培养基(Gibco),在湿润的体积分数为5%CO₂、37 °C培养箱中培养。

1.2 蛋白质结构分析

为了分析NFIX蛋白结构的无序性,使用PONDR(Predictor of Natural Disordered Regions)平台(<https://pondr.com>)的VSL2模型。本模型基于前馈神经网络,通过分析蛋白质序列局部窗口(9~21个氨基酸)的特征(如亲水性、各类氨基酸组成等)进行预测,界定有序/无序残基的阈值为0.5。

1.3 质粒构建与转染

本研究使用武汉金开瑞生物工程有限公司合成构建的质粒,载体均为pcDNA3.1-EGFP,带有flag标签。质粒通过氨苄青霉素抗性筛选后由金开瑞公司进行测序验证。构建质粒的命名、编码蛋白序列及用途见表1。

表 1 质粒构建命名及用途

Table 1 Plasmid designation and application

Plasmid	Insert coding sequence	Application
EGFP	None	U2OS cell-Control
EGFP-NFIX	NFIX full-length (NM_001365902.3)	U2OS cell-Condensate assay; IP-MS 293T cell-Protein purification
EGFP-NFIX Δ IDR1	NFIX Δ aa39-85	U2OS cell-Mapping condensate forming region
EGFP-NFIX Δ IDR2	NFIX Δ aa245-494	U2OS cell-Mapping condensate forming region; IP-MS 293T cell-Protein purification
EGFP-NFIX-IDR2	NFIX aa245-494	293T cell-Protein purification

EGFP: enhanced green fluorescent protein; NFIX: nuclear factor I-X; IDR: intrinsically disordered region; aa: amino acid; IP-MS: immunoprecipitation-mass spectrometry.

质粒转染使用Lipofectamine 3000(Lipo3000, Thermo Fisher)转染套装,按比例混合无血清培养基中的Lipo3000与DNA+P3000,孵育10 min后加入贴壁的U2OS或293T细胞培养,6 h后换液,24 h后观察或收样。

1.4 显微荧光成像

待观察的质粒转染后的U2OS细胞使用体积分数为4%多聚甲醛室温固定15 min,随后使用0.25% TritonX-

100溶液通透细胞膜10 min,使用DNA结合染料DAPI(索莱宝)避光孵育细胞10 min以标记细胞核。显微荧光成像与采集通过奥林巴斯的高分辨转盘共聚焦显微镜(SpinSR)进行,主要使用60 \times 平场复消色差油浸物镜。

1.5 活细胞观察与光漂白荧光恢复技术(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)

本研究使用奥林巴斯活细胞工作站进行细胞内凝聚

体的融合及光漂白荧光恢复技术 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 实验的观察, 在观察过程中为细胞提供湿润的体积分数为5%CO₂+37 °C培养环境, 以确保采集图像时细胞及胞内分子处于生理状态下。为了观察凝聚体状态及凝聚体融合情况, 在观察过程中持续采集图像(间隔100 s)。

FRAP是观察荧光标记蛋白内部扩散效率的方法, 使激光对荧光蛋白凝聚体内某一部分的蛋白进行光漂白, 随后观察其恢复速率^[19], 如漂白后该部分荧光可以恢复, 则证明凝聚体内部具有流动性^[20]。图片采集使用SpinSR显微镜, 恢复速率的矫正及归一化计算使用EasyFRAP软件(<https://easyfrap.vimnet.upatras.gr/>)。

1.6 体外蛋白纯化与观察

本研究将3种带有flag-EGFP标记的蛋白重组质粒(EGFP-NFIX、EGFP-NFIXΔIDR2、EGFP-NFIX-IDR2, 武汉金开瑞生物工程有限公司构建)转染至293T细胞中, 将细胞经预冷RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂, 碧云天)冰上裂解30min后离心取上清, 加入Anti-DYKDDDDK G1 Affinity Resin(GenScript)4 °C孵育过夜, 采用flag多肽(碧云天)竞争性洗脱靶蛋白。获取的纯化蛋白使用BCA试剂盒(碧云天)测定浓度, 使用NaCl溶液及PEG 8000溶液混合(配置为含150mmol/L NaCl和5% PEG-8000的pH为7.4的缓冲体系, 下称“缓冲体系”)稀释蛋白, 配得3.2、1.6、0.8、0.4、0.2 μmol/L的纯化蛋白。将不同浓度的纯化蛋白滴至玻片上, 在奥林巴斯的高分辨转盘共聚焦显微镜(SpinSR)下观察。

为验证蛋白凝聚体内部的驱动力^[21], 在3.2 μmol/L的纯化EGFP-NFIX蛋白中加入5% 1,6-己二醇(粉末购自索莱宝科技有限公司, 使用上述缓冲体系配置溶液), 观察蛋白凝聚体的形态变化。

1.7 免疫沉淀-质谱联用 (immunoprecipitation-mass spectrometry, IP-MS)

在U2OS细胞中按1.3所述步骤转染flag标记的EGFP空载、NFIX全长(flag-NFIX)及IDR2截短突变体(flag-NFIXΔIDR2)表达质粒, 使用flag标签蛋白免疫沉淀试剂盒(磁珠法, 碧云天)分别获得EGFP空载、flag-NFIX和flag-NFIXΔIDR2及其结合的蛋白复合物, 经SDS-PAGE初步验证后切胶酶解, 将脱盐处理后的多肽进行液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)分析, 通过阴性对照(EGFP空载体样本)排除背景蛋白, 获得差异化的相互作用分子。

对鉴定出的差异化蛋白基于EggNOG数据库(v5.0.2, <http://eggnog5.embl.de/#/app/home>)提取每个蛋白质的GO ID, 然后按照细胞组分、分子功能和生物过程对蛋白

进行GO分析。并基于WikiPathways数据库对这些蛋白的富集情况进行分析, 以进行数据可视化和相关生物学通路模型的整合^[22]。

1.8 统计学方法

本研究统计的所有数据均来自至少3次独立重复实验, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用GraphPad Prism10进行数据分析及结果图绘制。多组间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 若存在显著性差异, 则进一步使用Dunnett's事后检验法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。在组学分析中, 使用Fisher's精确检验对差异表达蛋白进行富集显著性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NFIX可以在细胞内形成生物凝聚体

在U2OS细胞中, EGFP-NFIX全长蛋白通过液-液相分离在细胞核内形成动态凝聚体, 而单独EGFP标签蛋白在细胞核中表现为弥散状态(图1A、1B)。这些凝聚体表现出典型液态特性: 共聚焦显微镜下可见EGFP荧光标记的NFIX蛋白凝聚体相互碰撞融合(图1C), 表明其表面张力驱动的液态行为; FRAP实验使用405 nm固态激光器以30%强度的激光对NFIX凝聚体进行光漂白, 针对直径为1 μm的漂白区域(ROI)预采集5帧图像, 漂白后以1 s为间隔持续采集, 总采集时长为100 s。定量分析显示, 荧光信号在15 s内恢复至最大值的60%左右, 证实NFIX凝聚体内部蛋白分子与核质存在快速动态交换(图1D)。这种高流动性提示凝聚体形成依赖于多价弱相互作用(如IDR间的疏水/电荷作用), 而非固态聚集。

2.2 截短关键IDR区的NFIX蛋白失去形成生物凝聚体的能力

通过PONDR工具对NFIX蛋白进行无序性预测分析(使用VLXT算法, 阈值> 0.5), 结果显示在aa39-85及aa245-494呈现连续的高紊乱分数区段, 将其标记为典型的IDR, 分别命名为IDR1和IDR2(图2A)。为验证IDR区段对NFIX蛋白相分离能力的影响, 通过PCR介导的基因编辑技术构建了IDR截短突变体NFIXΔIDR1及NFIXΔIDR2(图2B), 将其克隆至pcDNA3.1-EGFP载体, 并转染U2OS细胞。共聚焦显微镜观察结果显示, NFIXΔIDR1在核内仍可形成凝聚体, 且凝聚体形态及大小与NFIX全长蛋白相比无显著改变。相比之下, NFIXΔIDR2在核内呈现弥散分布, 无法检测到任何凝聚结构(图2C、2D)。这说明IDR2节段对NFIX蛋白的相分离功能具有重要影响。

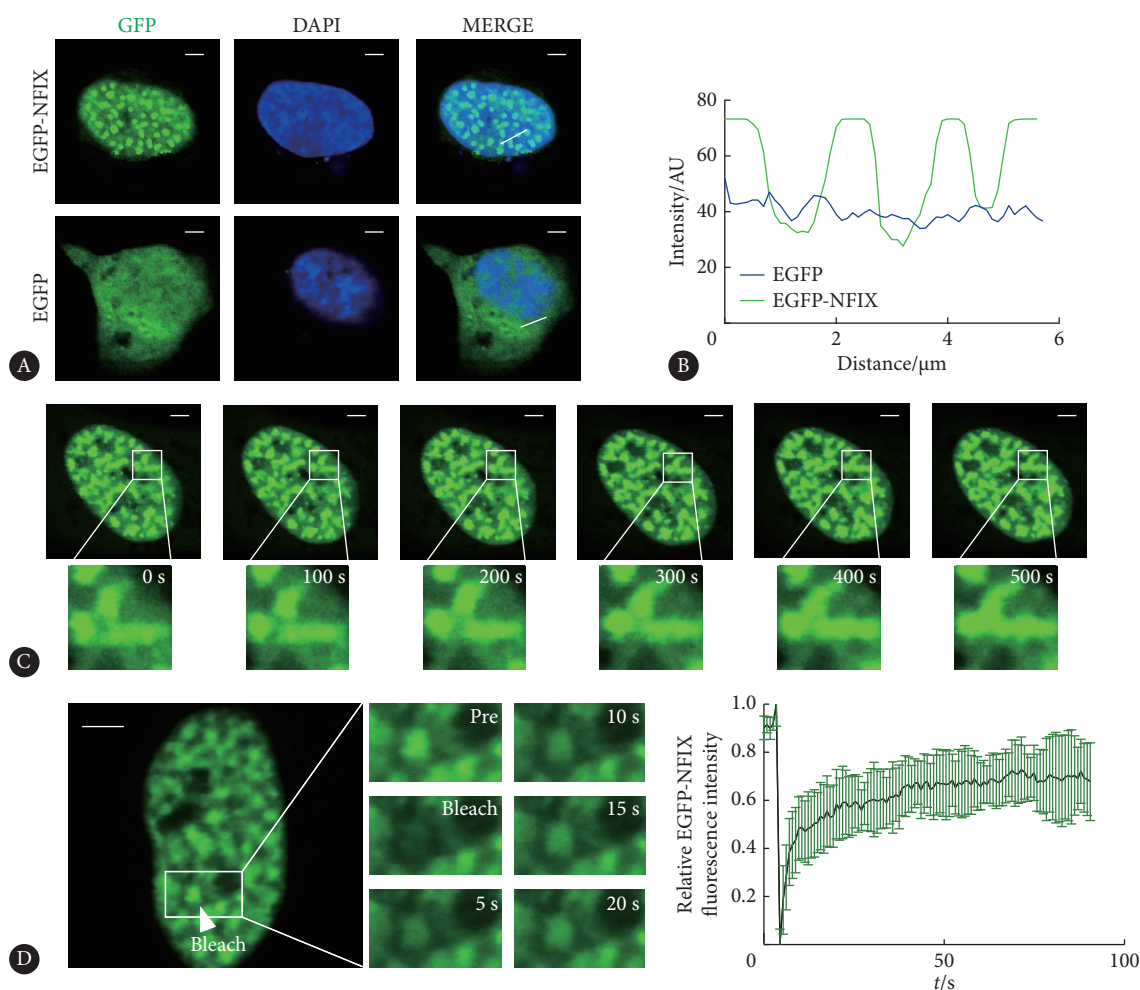


图 1 NFIX在U2OS细胞核内形成动态液态凝聚体

Fig 1 NFIX forms dynamic liquid condensates in U2OS cell nuclei

A, Confocal images of U2OS cells expressing EGFP-NFIX or EGFP. B, Fluorescence intensity profiles (ImageJ) across nuclei. C, EGFP-NFIX droplets fuse over time. D, FRAP assay ($n = 6$). Scale bar = 5 μm .

2.3 NFIX可以在体外环境形成生物凝聚体

在细胞外使用纯化的NFIX相关蛋白在生理缓冲条件下观察其聚集特性,可以更加直观地表现NFIX蛋白及其各突变体形成凝聚体的能力。通过共聚焦显微镜观察,在含150 mmol/L NaCl和5% PEG-8000的pH为7.4的缓冲体系中,纯化的野生型全长NFIX蛋白(NFIX-WT)可自发形成球形凝聚体。其相变具有浓度依赖性,临界饱和浓度(C_{sat})约为0.4 $\mu\text{mol/L}$,即当蛋白浓度低于 C_{sat} 时无法形成凝聚体,而超过 C_{sat} 后凝聚体数量及尺寸随浓度升高显著增加。值得注意的是,截除IDR2区域的NFIX ΔIDR2 突变体蛋白在相同条件下无法形成任何凝聚结构,整体表现为类似絮状的不规则形态且荧光强度明显降低,而单独表达IDR2片段(aa245-494)则表现出更强的相分离倾向,其凝聚体形成的 C_{sat} 低于0.4 $\mu\text{mol/L}$,表明IDR是驱动相分离的核心功能模块(图3A)。进一步通过

1,6-己二醇干预实验发现,添加5% 1,6-己二醇可迅速破坏NFIX-WT凝聚体(图3B)。此现象与1,6-己二醇通过干扰多价弱相互作用(如疏水作用、 π - π 堆积)破坏相分离的机制一致。

2.4 IDR介导NFIX互作蛋白的差异富集

为了进一步研究IDR2对NFIX蛋白生理功能的影响,在U2OS细胞中分别转染flag标记的NFIX全长(flag-NFIX)及IDR2截短突变体(flag-NFIX ΔIDR2)表达质粒,使用anti-flag磁珠进行免疫沉淀,将共免疫沉淀的蛋白质在SDS-PAGE凝胶中分离,将含有蛋白质条带的区域切下,胶内消化为6~20个氨基酸长度的肽段,然后进行质谱(MS)蛋白质鉴定(图4A)。结果显示,两组间存在1328个共同结合的蛋白,flag-NFIX ΔIDR2 组特异性结合45个蛋白,FLAG-NFIX组则特异性结合121个蛋白(图4B)。

对FLAG-NFIX组特异性结合的121个蛋白进行GO分析

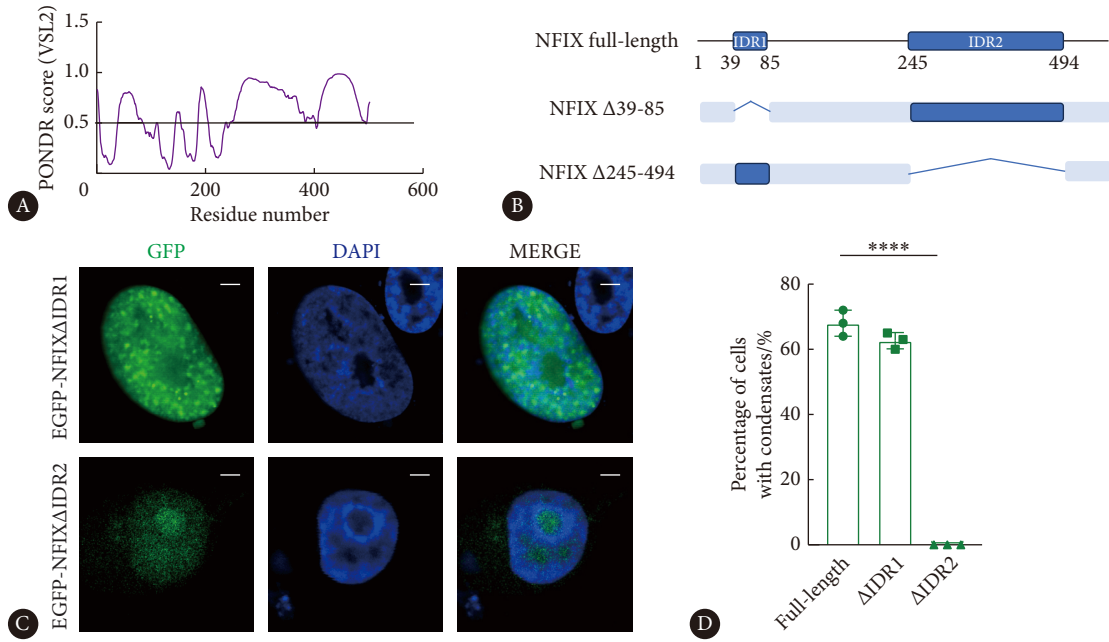


图 2 NFIX关键固有无序区决定凝聚体形成

Fig 2 Key disordered region of NFIX govern condensate formation

A, POND (VSL2) analysis of NFIX. The peaks indicate predicted disordered regions (IDR1: 39-85; IDR2: 245-494). B, Schematic of NFIX constructs: full-length (residues 1-494), ΔIDR1 (Δ39-85), and ΔIDR2 (Δ245-494). C, Confocal images of U2OS cells expressing EGFP-tagged NFIX variants (scale bar = 5 μm). D, Quantification of cells with condensates. Full-length and ΔIDR1 retain condensate-forming capacity; ΔIDR2 is defective (**** $P < 0.0001$, $n = 3$).

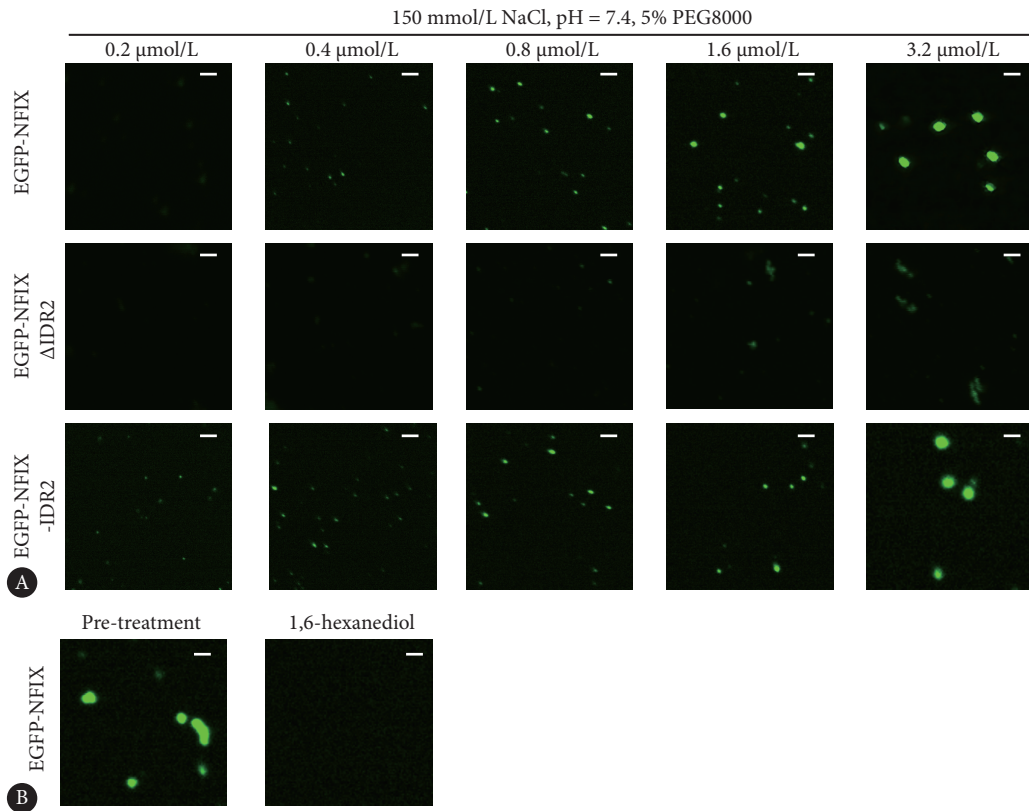


图 3 体外纯化NFIX蛋白凝聚体的形成依赖IDR2区

Fig 3 IDR2 drives NFIX condensate formation *in vitro*

A, Fluorescence microscopy of purified EGFP-NFIX (full-length), EGFP-NFIXΔIDR2, and EGFP-NFIX-IDR2 under physiological buffer (150 mmol/L NaCl, pH = 7.4, 5% PEG8000) with concentration range (0.2-3.2 μmol/L). B, 1,6-Hexanediol treatment dissolves preformed NFIX condensates. Scale bar = 4 μm.

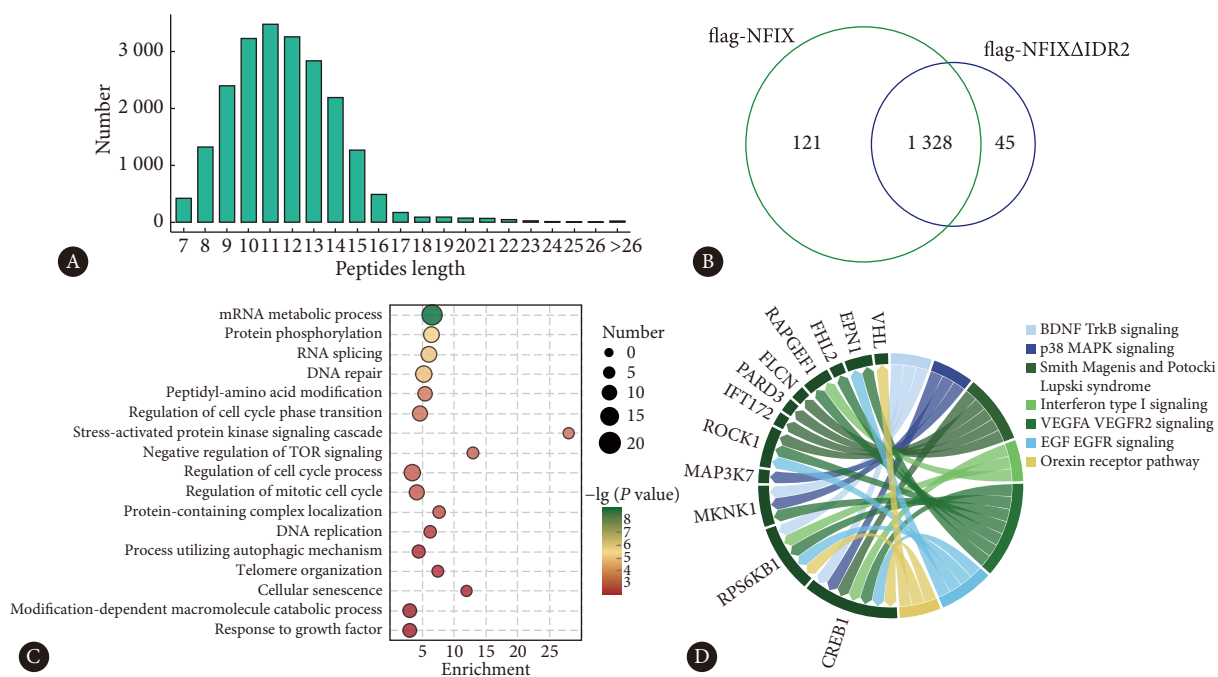


图 4 IDR2依赖性结合蛋白富集于发育相关通路

Fig 4 IDR2-dependent interactomes are enriched in developmental pathways

TOR: target of rapamycin; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; TrkB: tropomyosin receptor kinase B; MAPK: mitogen-activated protein kinase; VEGFA: vascular endothelial growth factor A; VEGFR2: vascular endothelial growth factor receptor 2; EGF: epidermal growth factor; EGFR: epidermal growth factor receptor; VHL: von Hippel-Lindau tumor suppressor; EPN1: epsin 1; RAPGEF1: Rap guanine nucleotide exchange factor 1; FLCN: folliculin; PARD3: partitioning defective 3 homolog; IFT172: intraflagellar transport protein 172; ROCK1: Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1; MAP3K7: mitogen-activated protein kinase kinase 7; MKNK1: MAPK interacting serine/threonine-protein kinase 1; RPS6KB1: ribosomal protein S6 kinase beta-1; CREB1: cAMP-responsive element-binding protein 1. A, Peptide length distribution from IP-MS gel-digested samples for validating data quality. B, Venn diagram of proteins co-immunoprecipitated with flag-NFIX versus flag-NFIXΔIDR2. C, GO analysis of IDR2-dependent interactors. D, WikiPathways pie chart of IDR2-dependent interactors.

(图4C), 结果显示NFIX-IDR2依赖性互作蛋白显著富集于mRNA代谢、蛋白磷酸化及RNA剪接等生物过程, 提示NFIX可能通过转录后调控网络及激酶信号级联(如MAP3K7、MKNK1等)协调基因表达与细胞功能。值得注意的是, 这些过程与颅颌面发育中细胞定向分化及细胞迁移密切相关。进一步对这些蛋白进行WikiPathways整合分析(图4D), 多种蛋白与发育相关通路(如BDNF TrkB signaling、VEGFA VEGFR2 signaling)形成多层次调控网络。提示NFIX-IDR2作为分子枢纽, 可能通过介导相分离而动态招募多种效应分子, 在与颅颌面发育相关的生理病理过程中发挥重要作用。

3 讨论

核因子NFIX作为重要的转录因子, 已经被证实广泛参与多种生理病理活动^[4-7]。在发育过程中, NFIX的作用是多样的, NFIX沉默可能挽救出生后肌肉营养不良症的病理表型; 在神经系统的发育中, NFIX作用复杂, 包括调控干细胞命运, 促进神经祖细胞分化, 维持神经干细胞稳态等^[23]; 在骨骼发育中, NFIX缺失会造成躯干骨骨化缺

陷^[24]。同时, 许多研究已表明NFIX蛋白异常与Malan综合征、Marshall-Smith综合征的密切关系^[8-13]。这说明NFIX对机体发育的影响是多维度、多器官、多时序的, 目前以传统转录调控的理论尚未完全阐释相应的机制。

相分离相关研究是近年来研究分子相互作用机制的热点。在发育相关领域, 相分离在生殖细胞分化^[25-26]、先天免疫的控制与激活^[27-28]、神经突触的发育和信号转导^[29]等多种发育事件中起到作用。蛋白可以在生物凝聚体中募集关键协同因子, 共同发挥调节作用; 同时凝聚体也可以作为生物区隔, 隔离抑制因子对复合体的逆向作用, 并通过凝聚体的解离和重聚动态调控这种作用, 以此解释细胞内复杂的反馈调节机制。

本研究发现了NFIX调控生物活动的新机制。细胞内过表达及氨基酸序列分析等实验及生物信息学证据均表明, NFIX蛋白具有相分离能力, 即可以在细胞内形成生物凝聚体, 并以此富集其他相互作用分子, 共同调控下游信号通路。在相分离行为的鉴定研究中, 区分蛋白凝聚体的固/液状态是一大要点。固态的蛋白复合体之间存在更强的相互作用和更稳定的结构, 液-液相分离则主

要以弱相互作用聚集,与周围环境具有更强的交互特性^[30]。NFIX蛋白形成的凝聚体具有相互融合及光漂白后荧光快速恢复的液态特性,这与胚胎发育过程中对细胞信号精确的时空控制需求高度契合^[31]。因此,NFIX介导的相分离凝聚体形成不仅为发育相关信号转导提供了静态的支架,更是一个动态的分子枢纽,其功能异常会影响颌面发育的时空精确性。

在对NFIX蛋白具体功能序列的探究中,以往以转录调控为主要切入点的NFIX相关研究主要聚焦该蛋白C末端的DNA结合区域与下游基因启动子的直接作用^[32-34],本研究发现NFIX序列C末端的关键IDR变异同样会导致其功能异常。IDR是不具有固定三级结构的蛋白质区段,以多价相互作用介导相分离,IDR的变异可以改变相分离的倾向和阈值、凝聚体的物理性质、凝聚体的组成和各组分比例等重要特性^[35]。本研究定义了NFIX蛋白的IDR2并证实了该区段截短将导致NFIX蛋白失去相分离能力。

为了进一步探究NFIX-IDR2变异对NFIX相关的蛋白复合体组成的影响,本研究使用IP-MS技术,对NFIX蛋白及NFIX Δ IDR2突变蛋白富集的相互作用因子进行分析。NFIX富集到的蛋白中,与NFIX Δ IDR2无法结合的蛋白被定义为IDR2依赖性结合的蛋白,笔者认为这些蛋白与NFIX的结合取决于IDR2关键区域,与IDR2介导的相分离现象密切相关。GO富集分析结果表明,这些蛋白显著富集于mRNA代谢、蛋白质磷酸化、TOR信号传导、细胞周期调控等多个发育相关的关键生物学事件^[36-38],与MAPK、VEGFA-VEGFR2等通路有关;MAPK信号级联已被证实可调控星形胶质细胞的迁移、增殖与功能^[39];而VEGF信号则是血管生成和骨重塑的核心调节者,对颌骨形态发生及脑膜功能发育至关重要^[40-41]。WikiPathways整合结果进一步表明CREB1、RPS6KB1等蛋白也具有IDR2依赖性,值得注意的是,这些蛋白与神经发育异常罕见病Smith-Magenis and Potocki-Lupski综合征也具有相关性,这说明IDR2区域及其介导的相分离在颌面发育中具有重要作用。

综上,本研究揭示了核因子NFIX通过相分离调控下游生物学功能的新机制,并初步探索了此机制在颌面发育领域的应用。但目前的研究结果仍停留在分子层面,尚未在与颌面发育相关的干细胞层面及机体层面得到充分证据,临床应用价值尚不清晰。在未来的研究中,可利用多种来源的干细胞进一步研究NFIX及其介导形成的生物凝聚体在各组织系统发育中的具体作用,并结合动物体内实验,评估干预凝聚体形成进而靶向治疗发育相关综合征的可行性及关键发育调控窗口,旨在将“相

分离”这一新机制转化为对颌面及神经发育相关遗传病进行诊断和治疗的理论依据与创新策略。

* * *

作者贡献声明 王佳仪负责论文构思、数据审编、正式分析、调查研究、初稿写作和审读与编辑写作,樊怡负责经费获取、项目管理与审读与编辑写作,徐若诗负责数据审编、项目管理和监督指导,靖军军负责研究方法和项目管理,周学东负责论文构思、项目管理、提供资源和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution WANG Jiayi is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, writing--original draft, and writing--review and editing. FAN Yi is responsible for funding acquisition, project administration, and writing--review and editing. XU Ruoshi is responsible for data curation, project administration, and supervision. JING Junjun is responsible for methodology and project administration. ZHOU Xuedong is responsible for conceptualization, project administration, resources, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 本文作者樊怡和靖军军是本刊编委会青年编委,周学东是本刊编委会编委。该文在编辑评审过程中所有流程严格按照期刊政策进行,且未经其本人经手处理。除此之外,所有作者声明不存在利益冲突。

Declaration of Conflicting Interests FAN Yi and JING Junjun are members of the Junior Editorial Board of the journal, ZHOU Xuedong is a member of the Editorial Board of the journal. All processes involved in the editing and reviewing of this article were carried out in strict compliance with the journal's policies and there was no inappropriate personal involvement by the authors. Other than this, both authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] GRONOSTAJSKI R M. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene*, 2000, 249(1): 31-45. doi: 10.1016/S0378-1119(00)00140-2.
- [2] GÖÖS H, KINNUNEN M, SALOKAS K, *et al.* Human transcription factor protein interaction networks. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 766. doi: 10.1038/s41467-022-28341-5.
- [3] MALAYMAR PINAR D, GÖÖS H, TAN Z, *et al.* Nuclear factor I family members are key transcription factors regulating gene expression. *Mol Cell Proteomics*, 2025, 24(1): 100890. doi: 10.1016/j.mcpro.2024.100890.
- [4] MESSINA G, BIRESSI S, MONTEVERDE S, *et al.* Nfix regulates fetal-specific transcription in developing skeletal muscle. *Cell*, 2010, 140(4): 554-566. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.027.
- [5] SACLIER M, LAPI M, BONFANTI C, *et al.* The transcription factor Nfix requires RhoA-ROCK1 dependent phagocytosis to mediate macrophage skewing during skeletal muscle regeneration. *Cells*, 2020, 9(3): 708. doi: 10.3390/cells9030708.
- [6] MA H Y, SUN R, TIAN T, *et al.* NFIX suppresses breast cancer cell proliferation by delaying mitosis through downregulation of CDK1 expression. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 77. doi: 10.1038/s41420-025-02361-8.
- [7] ZOU H, POORE B, BROWN E E, *et al.* A neurodevelopmental epigenetic programme mediated by SMARCD3-DAB1-Reelin signalling is hijacked to promote medulloblastoma metastasis. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(3): 493-507. doi: 10.1038/s41556-023-01093-0.
- [8] PRIOLO M, SCHANZE D, TATTON-BROWN K, *et al.* Further delineation of Malan syndrome. *Hum Mutat*, 2018, 39(9): 1226-1237. doi:

- 10.1002/humu.23563.
- [9] 林雪芹, 全昱霖, 贺海兰, 等. *NFIX*基因变异导致一对同卵双胞胎Marshall-Smith综合征并文献复习. 中国当代儿科杂志, 2024, 26(7): 750-756. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2401047.
- LIN X Q, QUAN Y L, HE H L, *et al.* *NFIX* gene mutation causes Marshall-Smith syndrome in a pair of identical twins and literature review. *Chin J Contemp Pediatr*, 2024, 26(7): 750-756. doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2401047.
- [10] 李思秀, 邓佳, 王燕娟, 等. *NFIX*基因变异致过度生长、巨头和智力障碍1例并文献复习. 中国儿童保健杂志, 2024, 32(5): 572-575. doi: 10.11852/zgetbjzz2023-0591.
- LI S X, DENG J, WANG Y J, *et al.* Case report and literature review on *NFIX* gene variation associated overgrowth, macrocephaly and intellectual disability. *Chin J Child Health Care*, 2024, 32(5): 572-575. doi: 10.11852/zgetbjzz2023-0591.
- [11] MULDER P A, Van BALKOM I D C, LANDLUST A M, *et al.* Development, behaviour and sensory processing in Marshall-Smith syndrome and Malan syndrome: phenotype comparison in two related syndromes. *J Intellect Disabil Res*, 2020, 64(12): 956-969. doi: 10.1111/jir.12787.
- [12] TABATA K, IIDA A, TAKESHITA E, *et al.* A novel pathogenic *NFIX* variant in a Malan syndrome patient associated with hindbrain overcrowding. *J Neuro Sci*, 2020, 412: 116758. doi: 10.1016/j.jns.2020.116758.
- [13] MACCHIAIOLO M, PANFILI F M, VECCHIO D, *et al.* A deep phenotyping experience: up to date in management and diagnosis of Malan syndrome in a single center surveillance report. *Orphanet J Rare Dis*, 2022, 17(1): 235. doi: 10.1186/s13023-022-02384-9.
- [14] WANG B, ZHANG L, DAI T, *et al.* Liquid-liquid phase separation in human health and diseases. *Signal Transduct Tar*, 2021, 6(1): 290. doi: 10.1038/s41392-021-00678-1.
- [15] 何世明, 王实, 齐易. 生物大分子相分离领域的研究进展回顾与展望. *科学通报*, 2024, 69(30): 4486-4499. doi: 10.1360/TB-2024-0362.
- HE S M, WANG S, LIN Y. Biomolecular phase separation research: milestones, insights, and future trajectories. *Kexue Tongbao*, 2024, 69(30): 4486-4499. doi: 10.1360/TB-2024-0362.
- [16] TEDESCHI G, MANGIAGALLI M, CHMIELEWSKA S, *et al.* Aggregation properties of a disordered protein are tunable by pH and depend on its net charge per residue. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861(11 Part A): 2543-2550. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.09.002.
- [17] MAYER A, DERUA R, SPAHN E, *et al.* The phosphatase activity of the PPP2R5D-PP2A holoenzyme modulates liprin- α 1 liquid-liquid phase separation. *J Biol Chem*, 2025, 301(7): 110349. doi: 10.1016/j.jbc.2025.110349.
- [18] YAO M, YUAN L, ZHENG Y, *et al.* POSH undergoes phase separation and co-condensation with SHANK2/3 to regulate spine development. *Protein Cell*, 2025: pwa066. doi: 10.1093/procel/pwa066.
- [19] 关苑君, 马显才. 光学显微成像技术在液-液相分离研究中的应用. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(3): 504-510. doi: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0319.
- GUAN Y J, MA X C. Application of optical microscopic imaging technology in liquid-liquid separation research. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(3): 504-510. doi: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0319.
- [20] GAO Y, LI X, LI P, *et al.* A brief guideline for studies of phase-separated biomolecular condensates. *Nat Chem Biol*, 2022, 18(12): 1307-1318. doi: 10.1038/s41589-022-01204-2.
- [21] ZHENG T, WAKE N, WENG S L, *et al.* Molecular insights into the effect of 1, 6-hexanediol on FUS phase separation. *EMBO J*, 2025, 44(10): 2725-2740. doi: 10.1038/s44318-025-00431-2.
- [22] AGRAWAL A, BALCI H, HANSPERS K, *et al.* WikiPathways 2024: next generation pathway database. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(D1): D679-D689. doi: 10.1093/nar/gkad960.
- [23] HARRIS L, ZALUCKI O, CLÉMENT O, *et al.* Neurogenic differentiation by hippocampal neural stem and progenitor cells is biased by *NFIX* expression. *Development*, 2018, 145(3): dev155689. doi: 10.1242/dev.155689.
- [24] DRILLER K, PAGENSTECHE A, UHL M, *et al.* Nuclear factor I X deficiency causes brain malformation and severe skeletal defects. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(10): 3855-3867. doi: 10.1128/MCB.02293-06.
- [25] DODSON A E, KENNEDY S. Phase separation in germ cells and development. *Dev Cell*, 2020, 55(1): 4-17. doi: 10.1016/j.devcel.2020.09.004.
- [26] 陈一龙, 凌晓茹, 于浩澎, 等. 液-液相分离在细胞命运转变和疾病中的作用. *四川大学学报(医学版)*, 2023, 54(5): 857-862. doi: 10.12182/20230960302.
- CHEN Y L, LING X R, YU H P, *et al.* Role of liquid-liquid phase separation in cell fate transition and diseases. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2023, 54(5): 857-862. doi: 10.12182/20230960302.
- [27] WANG L, ZHOU W. Phase separation as a new form of regulation in innate immunity. *Mol Cell*, 2024, 84(13): 2410-2422. doi: 10.1016/j.molcel.2024.06.004.
- [28] 李静怡, 周陈晨. 液-液相分离调节免疫细胞活化和关键信号传导的研究进展. *四川大学学报(医学版)*, 2024, 55(6): 1527-1532. doi: 10.12182/20241160302.
- LI J Y, ZHOU C C. Latest findings on the role of liquid-liquid phase separation in the regulation of immune cell activation and key signaling. *J Sichuan Univ (Med Sci)*, 2024, 55(6): 1527-1532. doi: 10.12182/20241160302.
- [29] CHEN X, WU X, WU H, *et al.* Phase separation at the synapse. *Nat Neurosci*, 2020, 23(3): 301-310. doi: 10.1038/s41593-019-0579-9.
- [30] LI Y, CHEN T, YOU K, *et al.* Sequence determinants and solution conditions underlying liquid to solid phase transition. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023, 324(2): C236-C246. doi: 10.1152/ajpcell.00280.2022.
- [31] 文禹婷, 申喜鹏, 李文思, 等. 转录因子SP1靶向发育基因调控小鼠胚胎发育. *重庆医科大学学报*, 2025. doi: 10.13406/j.cnki.cyx.003833.
- WEN Y T, SHEN X P, LI W S, *et al.* Transcription factor SP1 regulates mouse embryonic development by targeting developmental genes. *J Chongqing Med Univ*, 2025. doi: 10.13406/j.cnki.cyx.003833.
- [32] GURRIERI F, CAVALIERE M L, WISCHMEIJER A, *et al.* *NFIX* mutations affecting the DNA-binding domain cause a peculiar overgrowth syndrome (Malan syndrome): a new patients series. *Eur J Med Genet*, 2015, 58(9): 488-491. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.06.009.
- [33] KLAASSENS M, MORROGH D, ROSSER E M, *et al.* Malan syndrome: sotos-like overgrowth with de novo *NFIX* sequence variants and deletions in six new patients and a review of the literature. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(5): 610-615. doi: 10.1038/ejhg.2014.162.
- [34] GE R, WANG C, LIU J, *et al.* A novel tumor-promoting role for nuclear factor IX in glioblastoma is mediated through transcriptional activation of *GINS1*. *Mol Cancer Res*, 2023, 21(3): 189-198. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-22-0504.
- [35] TSANG B, PRITIŠANAC I, SCHERER S W, *et al.* Phase separation as a missing mechanism for interpretation of disease mutations. *Cell*, 2020, 183(7): 1742-1756. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.050.
- [36] PIÑA J O, RAJU R, MYO A C, *et al.* Leveraging spatial transcriptomics to decode craniofacial development. *Genes*, 2025, 16(5): 557. doi: 10.3390/genes16050557.
- [37] PANWAR V, SINGH A, BHATT M, *et al.* Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 375. doi: 10.1038/s41392-023-01608-z.
- [38] WEN J, ZHU Q, LIU Y, *et al.* RNA modifications: emerging players in the regulation of reproduction and development. *Acta Bioch Bioph Sin*, 2024, 57(1): 33-58. doi: 10.3724/abbs.2024201.
- [39] KANG M, CHOI J, HAN J, *et al.* Aberrant ERK signaling in astrocytes impairs learning and memory in RASopathy-associated BRAF mutant mouse models. *J Clin Invest*, 2025, 135(8): e176631. doi: 10.1172/JCI176631.
- [40] SONG S, ZHANG G, CHEN X, *et al.* HIF-1 α increases the osteogenic capacity of ADSCs by coupling angiogenesis and osteogenesis via the HIF-1 α /VEGF/AKT/mTOR signaling pathway. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 257. doi: 10.1186/s12951-023-02020-z.
- [41] MA L, CHANG Q, PEI F, *et al.* Skull progenitor cell-driven meningeal lymphatic restoration improves neurocognitive functions in craniosynostosis. *Cell Stem Cell*, 2023, 30(11): 1472-1485. e7. doi: 10.1016/j.stem.2023.09.012.

(2025-07-23收稿, 2025-10-29修回)

编辑 余琳



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用
4.0国际许可协议(CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

© 2025 《四川大学学报(医学版)》编辑部

Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Sciences)