

参赛学生姓名： 杜若曦

中学： 成都外国语学校

省份： 四川

国家/地区： 中国/南部

指导老师姓名： 邹方东

指导老师单位： 四川大学

论文题目： 线粒体分裂失衡诱发的细胞衰老对涡虫再生的抑制作用

# 线粒体分裂失衡诱发的细胞衰老对涡虫再生的抑制作用

作者：杜若曦

## 摘要

线粒体是真核细胞中重要的细胞器，参与能量供给、细胞衰老、组织再生、细胞增殖等多种生理过程。为满足细胞的多种生理及病理状态，线粒体需要不断地进行分裂和融合，形成复杂的分枝管状结构网络，该过程中线粒体分裂蛋白（Drp1、Mff、Fis）起到了巨大的作用。研究表明，线粒体在细胞衰老和组织再生中发挥了重要的调控作用，但细胞衰老与个体再生之间的关系尚不清楚。涡虫是研究再生的重要模式生物。因此，本实验以东亚三角涡虫为研究对象，采用实时荧光 PCR、活性氧（ROS）荧光探针染色以及免疫荧光标记等多种技术手段，通过抑制线粒体分裂蛋白 Drp1，探究了线粒体分裂失衡诱发细胞衰老后，涡虫头尾再生、干细胞增殖以及神经系统发育变化情况。结果表明，抑制 Drp1 后，细胞内活性氧（ROS）含量升高，GPX 和 SOD 两种抗氧化酶表达降低，细胞衰老标志物 p53 和衰老相关分泌表型 TNF- $\alpha$  表达增加。同时，在个体水平上，涡虫摄食能力和应激反应能力均降低。该结果表明，抑制线粒体分裂后，涡虫在细胞水平和个体水平都表现出了明显的衰老特征。本研究进一步分析了涡虫衰老对其个体和神经细胞再生的影响，发现诱发的细胞衰老在个体水平使涡虫头尾再生受到明显抑制，同时在细胞水平上涡虫干细胞增殖以及神经系统发育也受到明显抑制。综上所述，线粒体分裂失衡诱发的细胞衰老对涡虫再生具有抑制作用。研究结果为理解细胞衰老在个体再生过程中的作用提供了新的发现。

**关键词：**涡虫，衰老，再生，线粒体

# 目录

摘要.....	2
1.前言.....	5
1.1 涡虫简介.....	5
1.1.1 涡虫再生的研究进展.....	5
1.1.2 涡虫衰老的研究进展.....	5
1.2 线粒体与再生的相关研究.....	6
1.3 线粒体与细胞衰老的相关研究.....	6
1.4 线粒体分裂在再生及衰老中的研究.....	7
1.5 本研究的意义及目的.....	7
2.实验材料与方法.....	9
2.1 实验材料.....	9
2.2 实验试剂.....	9
2.3 实验仪器设备.....	10
2.4 实验方法.....	10
(1) 涡虫饲养.....	10
(2) 抑制剂配置及处理.....	11
(3) 免疫荧光标记涡虫神经系统.....	11
(4) RT-qPCR 检测涡虫相关标记基因表达量.....	11
(5) 涡虫行为观察.....	14
(6) 涡虫体内 ROS 检测.....	14
3.实验结果.....	15
3.1 线粒体分裂蛋白 DRP1 的抑制剂浓度确定.....	15
3.2 抑制线粒体分裂，诱发涡虫衰老.....	16
(1) 抑制线粒体分裂，抗氧化酶降低和 ROS 水平升高，诱导涡虫衰老.....	16
(2) 抑制线粒体分裂，细胞衰老标志基因 p53 表达上调.....	17

(3) 抑制线粒体分裂, 衰老相关分泌表型 TNF- $\alpha$ 基因表达增加.....	17
(4) 抑制线粒体分裂, 涡虫个体摄食能力降低.....	18
(5) 抑制线粒体分裂, 涡虫个体应激反应减缓.....	18
3.3 诱导衰老后, 涡虫再生受到抑制.....	19
(1) 诱导衰老后, 涡虫头尾部再生受到抑制.....	19
(2) 诱导涡虫衰老后, 涡虫干细胞增殖受到抑制.....	22
(3) 诱导衰老后, 涡虫神经系统的发育受到抑制.....	22
4.讨论.....	23
5.结论与展望.....	26
参考文献.....	29
致谢.....	29

# 1. 前言

## 1.1 涡虫简介

东亚三角涡虫 (*Dugesia japonica*) 隶属于扁形动物门 (Platyhelminthes)、涡虫纲 (Turbellarin)、三肠目 (Tricladida), 是我国最常见的一种淡水涡虫。东亚三角涡虫体型很小, 体长约 3~10 mm, 具有三胚层, 形态上两侧对称, 有背腹、前后之分, 背面呈黑褐色并稍微凸起, 腹面则颜色较浅<sup>[1]</sup>。东亚三角涡虫可以分为头部、躯干、尾部三个部分, 头部形状接近三角形, 两侧分别有一耳突, 头部背面长有两个黑色的眼点, 躯干部分前端具有一个充当进食器官和排泄器官的咽。东亚三角涡虫的神经系统主要由一对头部神经节和两条贯穿全身的腹神经索组成。涡虫最显著的特点是具有极强的再生能力, 即使被切碎成许多微小的组织碎片, 最终仍能再生出完整的个体, 这使得涡虫成为细胞生物学实验中研究再生的常见模式生物<sup>[2,3]</sup>。

### 1.1.1 涡虫再生的研究进展

东亚三角涡虫惊人的再生能力与其体内非凡的干细胞系统有着密不可分的联系。“Neoblast”是涡虫体内唯一能分裂和分化的多能成体干细胞群, 在完整涡虫体内的数量保持相对恒定, 占涡虫体内细胞总数的 20%~30%左右<sup>[4]</sup>。与涡虫中其余种类的细胞相比, Neoblast 细胞具有“无限”的增殖和分化能力, 可以做到自我更新, 并能分化成涡虫所需的任何类型的细胞和器官。正常情况下, 涡虫中的 Neoblast 细胞保持着静止状态, 但当涡虫出现机体受损等应激的时候, Neoblast 细胞会被伤口处传达的信号分子激活, 重新开始表现出强大的增殖分化能力, 并迁移到伤口所在的地方。随后, 被吸引聚集在伤口处的 Neoblast 细胞开始增殖并产生大量的分化细胞, 形成了一种无色素的表皮/间质细胞芽的结构, 称为芽基 (regeneration blastema)。在接下来的几天内, 芽基会逐渐分化成缺失的组织结构, 最终重新再生出完整的、有着合适比例的涡虫。涡虫对缺失组织惊人的再生能力就是通过这种方式得以实现的<sup>[5]</sup>。

### 1.1.2 涡虫衰老的研究进展

大量研究表明, 组织及机体的衰老与干细胞之间有着密不可分的联系。干细胞在生物体中有着维持组织稳态、使细胞得到修复和再生的强大功能。如果干细胞无法进行组织稳态的维持、修复, 并无法再生相关的细胞时, 生物体内老化的细胞就无法进行更新, 衰老细胞的不断堆积则会使得生物体逐渐表现出一系列的

衰老特征。同时，对于大部分生物而言，随着年龄增长、外部环境因素的刺激等许多因素的干扰，干细胞自身也会逐渐衰老，其功能的逐渐丧失也会加剧衰老细胞的堆积并表现出衰老特征<sup>[5]</sup>。例如，研究人员发现在小鼠和人类的毛囊中，衰老会导致黑色素干细胞中 DNA 损伤的积累，导致黑色素干细胞库逐渐耗尽，最终使得老年小鼠和人类表现出毛发变白的衰老特征<sup>[6]</sup>。而在东亚三角涡虫中，因为其体内的 Neoblast 细胞持续不断增殖与更新，可以不断替换衰老的终末细胞以实现永生，被称为“长生不老”的生物，吸引了研究人员对涡虫衰老机制的探索。已经有一些研究表明，无性涡虫通过裂变进行再生和繁殖时，可以通过增强端粒维护机制的方法来恢复端粒长度，以确保其无尽的再生能力<sup>[7]</sup>。不过，关于涡虫衰老机制的研究目前仍然较少，还需进一步深入探讨其机制与意义。

## 1.2 线粒体与再生的相关研究

线粒体是细胞中氧化呼吸的主要场所。除了最广为人知的能量供给作用，线粒体还起到了调控组织再生的功能。研究表明，线粒体对组织再生的调控作用可以从活性氧调控、代谢调控、线粒体动力学等方面体现。在活性氧调控方面，有研究发现在秀丽隐杆线虫中，皮肤损伤会诱导线粒体分裂成较短的片段，并观察到线粒体活性氧 (mtROS) 的浓度增加。同时，人为增加 mtROS 的水平可以促进秀丽隐杆线虫的皮肤伤口修复。在涡虫中的研究则表明，使用 DPI 或者 APO 抑制 ROS 水平会导致涡虫的再生缺陷。在线粒体的代谢变化方面，已有研究证实在涡虫和墨菲罗斯大鼠 (Murphy Roths Large) 中，再生过程都伴随着糖酵解的增加。在线粒体形态动力学和活性的方面，研究人员观察到，在损伤组织中抑制线粒体分裂蛋白 Drp1 的表达后，骨骼肌卫星细胞则无法进行增殖，并导致肌肉无法再生<sup>[8]</sup>。

## 1.3 线粒体与细胞衰老的相关研究

细胞衰老是生物个体衰老的标志性事件之一，其主要特点包括不可逆的细胞周期停滞以及促炎表型。许多研究表明，线粒体作为一个常常被忽略的指标，在细胞衰老的过程中发挥着重要的作用。线粒体自噬已经被发现可以延缓细胞衰老，而线粒体自噬缺陷则可以对细胞衰老起到诱导作用。同时，在许多种类的衰老细胞中都观察到了线粒体含量的增加。除了线粒体动力学和含量方面，线粒体对细胞衰老的调控也可以通过线粒体 ROS 实现。线粒体是细胞中 ROS 的主要生产者之一。研究表明，衰老细胞中含有许多功能失调的线粒体，这些线粒体则会产生过量的 ROS。ROS 已经被证明可以导致 DNA 损伤，并以此加速由端粒诱导的细

胞衰老过程。同时,一些研究也表明 ROS 对衰老相关分泌表型 (SASP),如 IL-6、IL-8 等,有调节作用。除此之外,线粒体最广为人知的作用是产生 ATP 来为细胞提供能量。在衰老细胞中,研究人员发现 ATP 的产生效率相较于正常细胞有所降低,这种生物能量的失调已被证明能激活 AMPK 蛋白激酶,进一步导致 p53 磷酸化,最终使得细胞周期蛋白 A 等细胞增殖基因的下调,诱导细胞衰老<sup>[9]</sup>。

## 1.4 线粒体分裂在再生及衰老中的研究

在真核细胞中,为了满足细胞的多种生理及病理状态,线粒体需要不断地进行分裂和融合,形成复杂的分枝管状结构网络。在线粒体形态的维持和变化过程中,线粒体分裂蛋白起到了巨大的作用。动力相关蛋白 1 (Dynamin-related Protein, Drp1) 是线粒体分裂的关键蛋白。在这个过程中,Drp1 被激活并招募到线粒体外膜上的分裂位点上,进一步发生聚合并形成环状结构,使线粒体膜张力增加,最终导致线粒体膜断裂,完成线粒体的分裂<sup>[10]</sup>。大量研究表明,线粒体的动态变化,例如线粒体分裂和融合,可以起到调节细胞增殖和分化的作用。在再生的过程中,若对 Drp1 进行抑制,会破坏线粒体分裂过程,造成细胞增殖的减少,由此抑制多能干细胞集落的产生。同时,在衰老细胞中,研究人员观察到 Drp1 的表达相对于正常细胞显著下调,表明线粒体分裂受到抑制<sup>[11]</sup>。

在当今实验探究的过程中,小分子抑制剂得到了广泛的应用。其中,线粒体分裂抑制剂 (Mitochondrial Division Inhibitor, Mdivi-1) 是最常用的 Drp1 抑制剂之一。Mdivi-1 主要通过阻止 Drp1 自行装配成环状结构的方式,起到抑制线粒体分裂的效果,成为探究 Drp1 功能实验中的重要工具<sup>[10]</sup>。

## 1.5 本研究的意义及目的

目前,衰老是生物医学研究面临的一个巨大挑战,越来越多的人正在经受衰老相关疾病的影响,而一些简单的、具有强大再生能力的动物,如涡虫、水螅等,却几乎不会发生衰老。涡虫身体中的多能成体干细胞“Neoblast”有着几乎无限的增殖和分化能力,这使得涡虫成为研究再生和衰老的理想模型。同时,涡虫与人类及其他模式生物之间具有较高的同源性,因此以涡虫为模式生物进行再生和衰老相关机制的研究,对人类利用干细胞来修复受损组织以及延缓衰老的过程十分具有参考价值<sup>[7,12]</sup>。作为高度复杂的系统生物学过程,衰老和再生既相互对立,又环环相扣。然而,目前该方向并没有在系统水平上对衰老过程中再生能力变化规律进行探索的研究。

同时,大量研究表明,依赖于动力相关蛋白 Drp1 的线粒体分裂在再生和衰

老过程中都具有重要的作用，但在涡虫再生及衰老过程中，Drp1 的调控作用知之甚少。

基于以上研究背景，本研究选用东亚三角涡虫为材料，试图探究出线粒体分裂蛋白 Drp1 在涡虫衰老和再生过程中的调控功能，进一步阐述衰老与再生之间的联系，以期对涡虫中线粒体相关的衰老和再生机制提供一些基础性资料。

## 2. 实验材料与方法

### 2.1 实验材料

东亚三角涡虫 (*Dugesia japonica*) Pek-1 无性品种, 由清华大学吴畏教授友情赠予。

### 2.2 实验试剂

#### (1) 免疫组化相关试剂配制

2% HCl: 500  $\mu$ l 38%的 HCl 溶于 9 ml PBST 中;

75% 甲醇: 7.5 ml 甲醇与 2.5 ml PBST 混匀;

50% 甲醇: 5 ml 甲醇与 5 ml PBST 混匀;

25% 甲醇: 2.5 ml 甲醇与 7.5 ml PBST 混匀;

封闭液/抗体稀释液: 10 ml PBST 中加入 1 g 脱脂奶粉, 混匀后使用, 现配现用;

一抗反应液: 在上述抗体稀释液中加入相应量的抗体溶液, 使抗体终浓度为 15  $\mu$ g/ml, 现配现用;

二抗反应液: 500  $\mu$ l 抗体稀释液中加入 2.5  $\mu$ l 抗体溶液混匀, 现配现用, 注意避光。

#### (2) 抑制剂配制

Mdivi-1 (MCE) 粉末溶于 DMSO 配制为 10mM 的溶液, 存放于-80 $^{\circ}$ C, 后续根据实验需要稀释成不同浓度, 现配现用。

#### (3) 其他相关试剂及来源见表 1。

表 1 实验相关试剂名称及来源

试剂名称	来源
Mdivi-1	MCE (MedChemExpress)
3C11 (anti SYNORF1)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)
Fluorescein (FITC) AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG	正能
二甲亚砜 (DMSO)	Sigma-Aldrich
DCFH-DA 活性氧 ROS 荧光探针	Solarbio

RNAiso plus	TaKaRa
PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser	TaKaRa
SYBRGreen qPCR Mix	Innovagene
DEPC 处理水	生工
Green Taq Mix (with ddH <sub>2</sub> O)	诺唯赞

## 2.3 实验仪器设备

表 2 实验仪器

仪器名称	购买公司
小型常温离心机	Eppendorf
台式高速冷冻离心机	Thermo Fisher
体视显微镜	Leica
荧光定量 PCR 仪	Bio-rad
PCR 仪	Bio-Rad
电泳仪	Bio-Rad
凝胶成像系统	天能
灭菌锅	博科
制冰机	上海豫明
干式恒温金属浴	杭州佑宁
超低温冰箱	Thermo Fisher
移液枪	Eppendorf
分光光度计	Thermo Fisher
分光光度计	Thermo Fisher
数显恒温水浴锅	精宏

## 2.4 实验方法

### (1) 涡虫饲养

东亚三角涡虫养于实验室纯水仪制备的纯净水中，20 ~ 27℃内避光养殖，每

天给涡虫喂食一次新鲜猪肝。在实验之前，涡虫至少饥饿一周，然后选取相同体积大小、相同长度的涡虫用于之后的实验。

## (2) 抑制剂配置及处理

取饥饿一周处理、体型大小一致的涡虫数只，将涡虫头尾切割后放入干净的24孔板内，每个孔1只涡虫，实验组分别加入 $4\mu\text{M}$ 、 $8\mu\text{M}$ 、 $12\mu\text{M}$ 的Mdivi-1溶液，对照组分别加入含等量DMSO的溶液，如图1所示。在再生的第1d、3d、5d以及7d，用Leica M205FA体式荧光显微镜观察活体涡虫再生表型，尽量在涡虫自然伸展时拍照记录，并对以上表型进行统计分析。

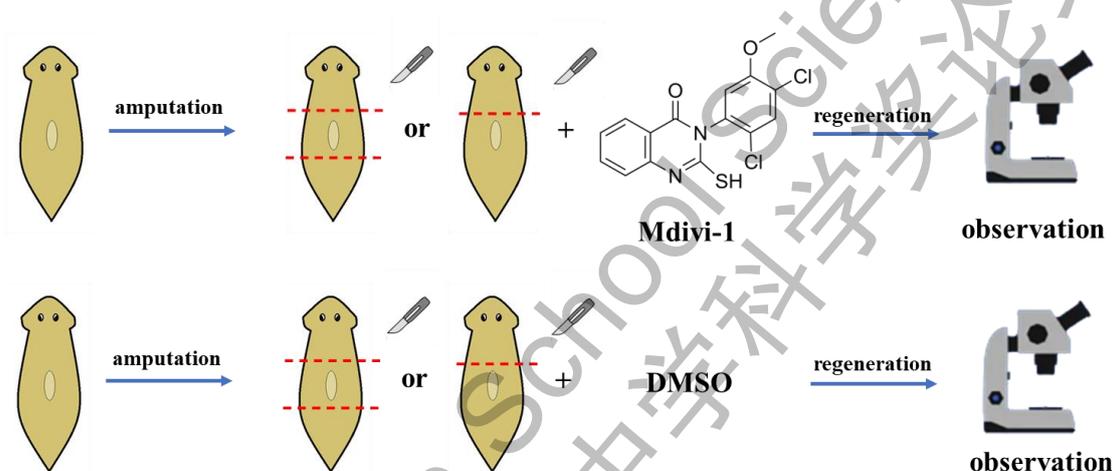


图1 抑制剂处理涡虫示意图

## (3) 免疫荧光标记涡虫神经系统

将涡虫置于干净的6孔板内，每组样本3只涡虫，先用ddH<sub>2</sub>O冲洗两遍，弃去多余液体；在涡虫处于自然伸展的状态时，加入2% HCl，室温(RT)下处理涡虫10 min；弃去HCl，1×PBS漂洗3次，每次5 min；用4%的多聚甲醛固定涡虫30 min，将涡虫转移至Ep管内；弃去多聚甲醛，1×PBS漂洗3次，每次5 min；1% SDS中通透20 min；1×PBS漂洗3次，每次5 min；25%，50%，75%甲醇依次处理10 min，置于摇床上轻摇；弃去多余液体，加入100%甲醇，-20℃处理60 min或更长时间；10%脱脂牛奶封闭1~2 h；配置3C11 (anti SYNORF1) 神经系统的抗反应液，现用现配，4℃摇床上轻摇过夜；1×PBS漂洗八次，每次5 min；配置绿色荧光二抗(鼠抗)，现用现配，注意避光，4℃摇床上轻摇过夜；1×PBS漂洗八次，每次5 min，注意避光；Leica M205FA体式荧光显微镜观察神经系统再生情况。

## (4) RT-qPCR 检测涡虫相关标记基因表达量

(a) RT-qPCR 样本处理方式

选取符合实验要求并饥饿处理 7 d 以上的涡虫数只，将涡虫在咽前进行切割，放入 24 孔板中，每个孔三只涡虫。切割后的涡虫分别加入清水和等量 DMSO、8  $\mu$ M Mdivi-1 溶液，在涡虫再生 6 h、48 h、72 h 以及 7 d 这四个时间点，收集涡虫实验组和对照组样品提取总 RNA。

(b) 涡虫总 RNA 提取

低温冷冻离心机提前进行 4  $^{\circ}$ C 预冷，75 %浓度的乙醇用 DEPC 处理水配制，准备浓度为 1 %的琼脂糖凝胶，便于对所提 RNA 质量进行电泳检测。

每个样品组 6 只涡虫，将涡虫吸取至 1.5 mL 标记好的 RNase-free EP 管中；弃去 RNase-free EP 管中多余液体，每管加入 500  $\mu$ L RNAiso plus，用移液枪吹打样品，使样品组织吹打破碎，充分裂解；向 RNase-free EP 管加入样品 1/5 体积的三氯甲烷，猛烈晃动 5 s，4  $^{\circ}$ C，12000 g 离心 15 min；离心后样品出现三层分层，吸取上清至全新预冷的 RNase-free EP 管中；将异丙醇加入 EP 管中，颠倒后沉淀 4~5 min；4  $^{\circ}$ C，12000 g 离心 15 min；此时在 EP 管底部可看见 RNA 沉淀，加入 800  $\mu$ L DEPC 水配置的 75%乙醇，4  $^{\circ}$ C，12000 g 离心 15min，洗去异丙醇；弃去液体，晾晒干管内乙醇；根据 RNA 沉淀的量加入适量 DEPC 水 (20~40  $\mu$ L) 溶解 RNA 沉淀；取 1  $\mu$ L RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳，判断所提取 RNA 质量；取 2  $\mu$ L RNA 样品进行浓度测定；随后可立即将 RNA 进行反转录反应或暂时保存于-80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱中。

(c) 反转录

反转录共分为两步：去除基因组 DNA 反应以及反转录反应。该实验加样操作在低温环境下进行。按照反转录试剂盒说明书配置反应混合液（配置过程应保证反应配置的准确性）并进行相应反应程序。

反应结束后，将获得的 cDNA 于-20  $^{\circ}$ C 或更低温度进行保存，或随即进行下一步实验。

(d) RT-qPCR 检测涡虫相关标记基因差异表达量

根据查阅的相关文献以及参照本实验室所拥有的涡虫转录组测序结果，利用软件 Primer Premier 5 设计 RT-qPCR 检测所需引物。引物序列如表 3 所示。

表 3 RT-qPCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5' - 3')
DjPCNA-F	AAGAAAGTGATGCCGTAA
DjPCNA-R	CAATAACTGCTGGAACA

Djsyt-F	GTGTTCGTACATCCTATGGCGATATAACAT
Djsyt-R	TAGACTAATCACAATGGCTATGACGAATGT
DjTH-F	CAATGTACACAATACACCAGGCATCAT
DjTH-R	ACATCGGAACATGGCCAAGTAAT
DjTBH-F	ACCACGATTGGAACAAAAGCATCACAT
DjTBH-R	CCCATTGGTTTGCTTTCTGCATTACAC
DjTPH-F	AATTGGCAACGATAACAAATGCAT
DjTPH-R	TTTTCTATATTGATTGATCGGCC
DjChAT-F	AGCAGCATCGATTCCAGCTTTGA
DjChAT-R	TGCCCCATAGCACATAAATGCGT
Djglutaminase-F	AATTGGTTTATGGTCTCCACCTCTT
Djglutaminase-R	ATTTCTGCACAAGTTCCATGCA
DjGPX-F	AAGCAAGAGCCACAAAC
DjGPX-R	GGATATTCGGATTGGTC
DjSOD-F	CAAGGGTCNGGNTGGGG
DjSOD-R	GCATGTTCCCAKACATCWAT
Djp53-F	GATCAACTA AGCCTTTCAGCCAT
Djp53-R	CAAAGCACAGACAGCAGAGTCAT
Djβ-actin-F	TGCTCCTGAAGAACATCC
Djβ-actin-R	CAGTTGTTTCGACCCGATG

以反转录合成的 cDNA 为模板，进行 RT-qPCR 检测涡虫相关基因表达量变化情况。

RT-qPCR 反应体系按照试剂盒说明书进行加样。完成加样后，将溶液混匀，离心至管底，按表 4 程序进行反应。反应结束后，按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算基因相对差异表达量，分析实验结果。

**表 4 RT-qPCR 反应程序**

程序步骤	时间
94 °C	3 min

程序步骤	时间	
94 °C	10 s	} 40 个循环
60 °C	60 s	

### (5) 涡虫行为观察

#### (a) 摄食能力

选取饥饿 7 d 的涡虫，喂食混合有红色色素的猪肝泥，在其进食 2~4h 后，由体式显微镜观察、拍照记录涡虫的体色变化情况，用未进食的涡虫作为阴性对照。

#### (b) 面对应激的转向能力

选取饥饿 7 d 的涡虫，用注射器针尖刺激它们的头部，观察它们的运动情况并记录它们完成一次转向所需的时间。

### (6) 涡虫体内 ROS 检测

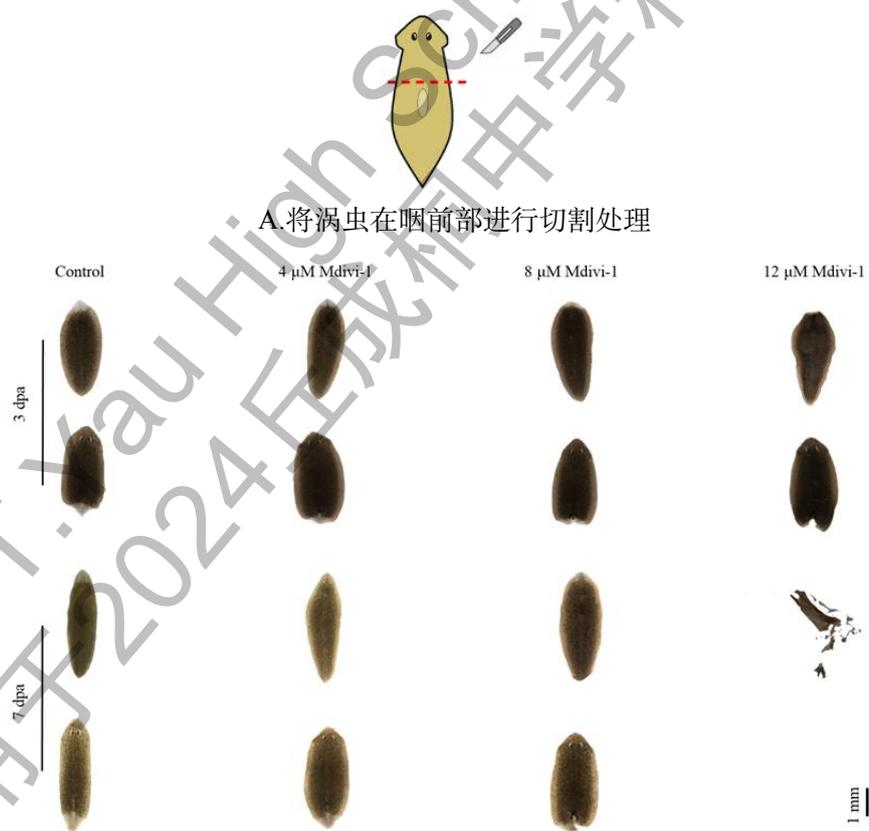
将经过实验处理的涡虫用蒸馏水冲洗 2~3 遍，随后吸取至干净的 1.5mL 的 EP 管中，吸取多余的水分。提前用 ddH<sub>2</sub>O 将 DCFH-DA 探针稀释 3000 倍，吸取 200 μL 的探针溶液加入 EP 管中，将 EP 管放进 37°C 培养箱中孵育 20min。上述操作完成后，将涡虫转移至干净的六孔板中，整个过程注意避光。最后利用一体化智能成像系统 APEXVIEW APX100 进行 ROS 的观察及拍照。由于整个实验过程中涡虫是处于存活状态，因此荧光拍摄时涡虫形态欠佳，有一定的模糊，但不影响最终的实验效果。

### 3.实验结果

#### 3.1 线粒体分裂蛋白 DRP1 的抑制剂浓度确定

为了研究线粒体分裂蛋白 DRP1 在涡虫个体上的最适处理浓度，本实验将饥饿一周以上的涡虫在咽前部进行切割处理 (图 2A 所示)，并分别浸泡在 4  $\mu\text{M}$ 、8  $\mu\text{M}$ 、12  $\mu\text{M}$  的特异性靶向线粒体分裂蛋白 DRP1 的抑制剂 Mdivi-1 溶液中，后续在切割后的第 3 d 和第 7 d 进行再生情况的观察。

结果发现，对照组涡虫在切割后第 7 d，头部和尾部完全实现再生；而用三种梯度浓度的抑制剂 Mdivi-1 处理后，涡虫头部和尾部再生受到显著抑制。进一步观察发现，随着抑制剂处理浓度的梯度增加，对涡虫再生的抑制作用也随之增强，即抑制剂 Mdivi-1 对涡虫再生的抑制作用呈现浓度依赖性。其中，12  $\mu\text{M}$  的 Mdivi-1 处理组涡虫受到的抑制现象最明显，甚至在再生第七天时出现了溶解现象，无法进行后续实验 (图 2B 所示)。结合以上预实验结果，为了后续实验的顺利进行，选择了对涡虫头尾再生具有显著抑制作用，同时又不引起涡虫溶解的 Mdivi-1 浓度为 8  $\mu\text{M}$ 。



B.不同浓度 Mdivi-1 处理的涡虫头尾部在不同时间点的再生情况

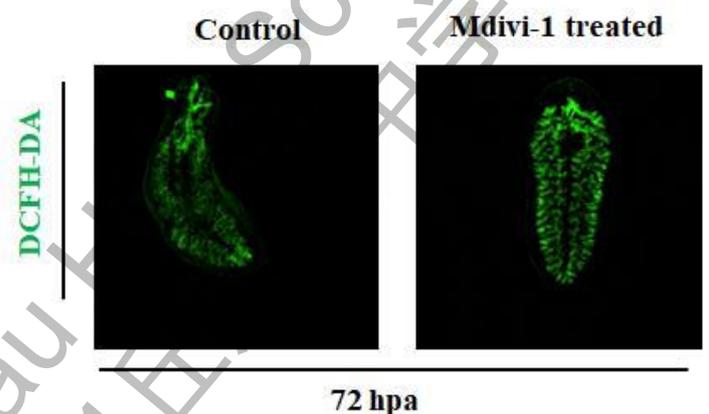
图 2 梯度浓度抑制剂 Mdivi-1 处理导致涡虫头尾再生缺陷

## 3.2 抑制线粒体分裂，诱发涡虫衰老

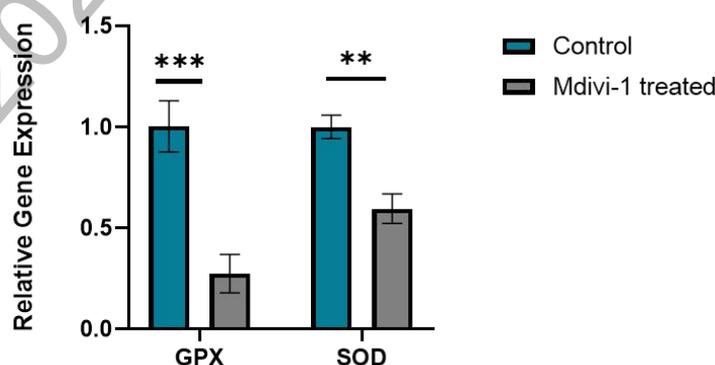
### (1) 抑制线粒体分裂，抗氧化酶降低和 ROS 水平升高，诱导涡虫衰老

线粒体作为细胞内产生活性氧 (ROS) 的主要细胞器，其稳态由线粒体生物合成、线粒体融合、分裂和线粒体自噬等共同参与维持。线粒体稳态失调可以提高胞内 ROS 水平，引起氧化应激的升高、线粒体抗氧化能力的降低，进一步破坏细胞生理信号转导，这可能会通过破坏细胞完整性和组织稳态而促进衰老<sup>[13]</sup>。

本实验为了探究涡虫中线粒体分裂蛋白 Drp1 对涡虫体内 ROS 的调控，在抑制剂 Mdivi-1 处理组涡虫再生第 3 d 时，使用绿色荧光探针 DCFH-DA 对其进行活性染色及定量分析。图 3A 结果显示，与对照组相比，Mdivi-1 处理后，涡虫再生头部的绿色荧光增强。由此说明，Mdivi-1 将涡虫中的线粒体分裂蛋白 Drp1 抑制后，其体内 ROS 含量升高。进一步，为了探究线粒体分裂是否参与涡虫抗氧化能力的调控，通过 RT-qPCR 检测抗氧化酶基因 GPX 以及 SOD 的表达情况。图 3B 表明，与对照组涡虫相比，Mdivi-1 抑制剂处理组涡虫的 GPX 以及 SOD 的表达受到显著抑制，即线粒体分裂蛋白 Drp1 通过促进 GPX、SOD 抗氧化酶基因的表达来调控涡虫体内的 ROS 水平。



A. 正常涡虫和 Mdivi-1 处理涡虫 ROS 含量情况



B. 正常涡虫和 Mdivi-1 处理涡虫抗氧化酶基因表达情况

图 3 线粒体分裂被抑制后的氧化能力相关指标

## (2) 抑制线粒体分裂，细胞衰老标志基因 p53 表达上调

细胞衰老的发生发展是多因素参与的、一系列基因协同调节的综合结果。近年来, 研究人员发现了多条细胞衰老相关信号通路, 包括经典的 p53/pRB、mTOR、AMPK 等信号通路。这些信号通路之间环环相扣、相互影响, 从而构成了复杂的细胞衰老调控网络。其中, p53 蛋白的突变、缺失和异常表达与肿瘤、衰老及衰老相关疾病的发生密切相关<sup>[14]</sup>。

本实验为了分析线粒体分裂失衡是否通过影响 p53 基因的表达从而诱导涡虫衰老, 进行了 RT-qPCR 以检测 p53 mRNA 表达水平。图 4 结果显示, 抑制剂处理组的 p53 mRNA 表达水平显著高于对照组, 说明线粒体分裂失衡导致 p53 的表达上调从而诱导涡虫衰老。

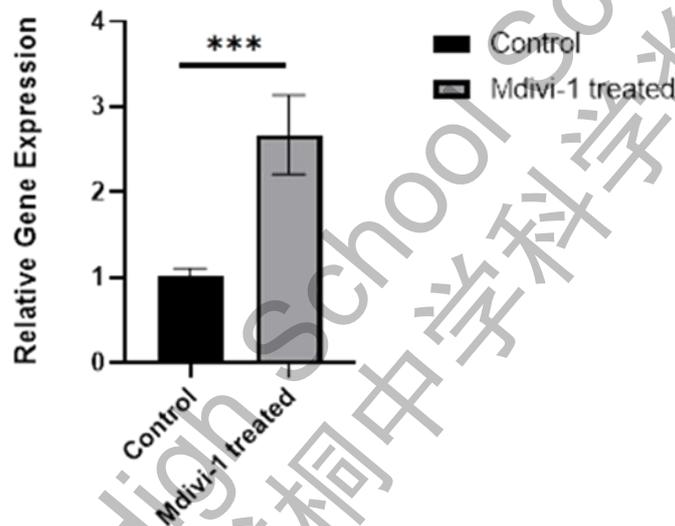


图 4 线粒体分裂被抑制后, 涡虫体内 p53 表达水平升高

## (3) 抑制线粒体分裂，衰老相关分泌表型 TNF- $\alpha$ 基因表达增加

衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) 作为蛋白酶、促炎因子、趋化因子等一系列细胞因子的总称, 是衰老细胞的关键特征之一。SASP 的一个特点是分泌促炎细胞因子, 如 IL-6、IL-17、IL-1 $\beta$ 、抑瘤素 M 和肿瘤坏死因子(tumornecrosisfactor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )。在多种衰老模型中, 如 D-半乳糖诱导的衰老大鼠和线虫、自然衰老的胎盘细胞等, 研究人员都观察到大量 SASP 因子的分泌<sup>[15]</sup>。

为了探究抑制涡虫线粒体分裂后是否会诱导 SASP 的大量分泌, 进行了 RT-qPCR 检测 TNF- $\alpha$  的表达水平, 结果如图 5 所示。与对照组相比, Mdivi-1 处理组的 TNF- $\alpha$  表达水平明显增加, 即抑制线粒体分裂后, 涡虫出现衰老相关分泌表型。

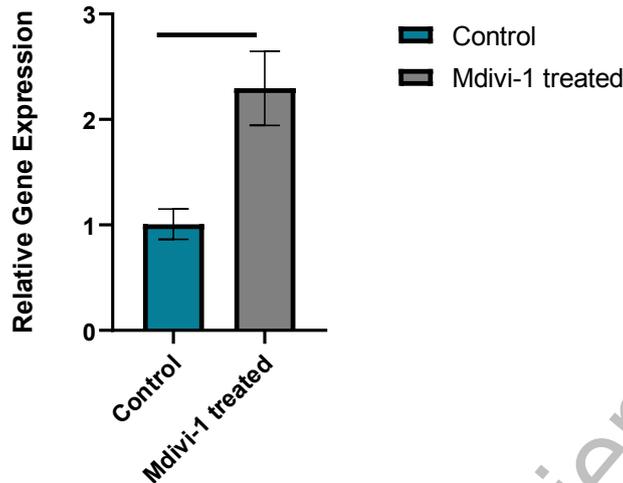


图 5 线粒体分裂被抑制后，涡虫体内 TNF- $\alpha$  表达升高

#### (4) 抑制线粒体分裂，涡虫个体摄食能力降低

广泛的研究表明，随着年龄的增加，衰老个体的摄食能力也会随之降低。为了检验线粒体分裂失衡诱导的衰老涡虫摄食能力的变化，本实验用混有红色色素的猪肝泥喂食涡虫，并通过涡虫体色的变化情况判断其进食程度。图 6 结果显示，对照组涡虫体色显著变红，说明其进食红色猪肝泥较多，进食能力正常；而 Mdivi-1 抑制剂处理组体色没有肉眼可见的红色，表明实验组涡虫进食减少。以上结果说明线粒体分裂失衡诱导涡虫衰老后，其摄食能力明显降低。

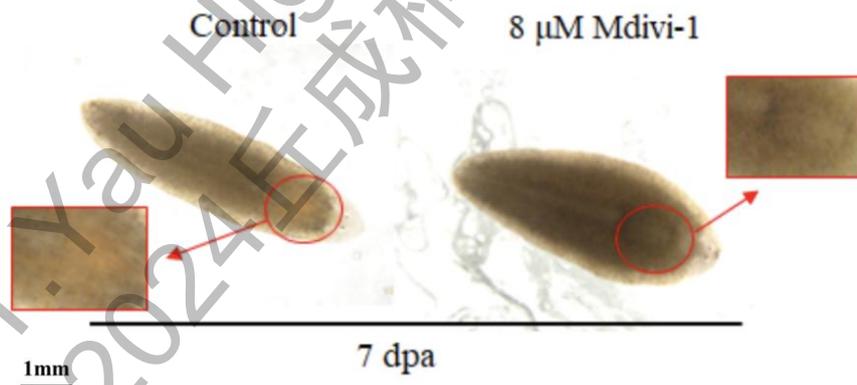
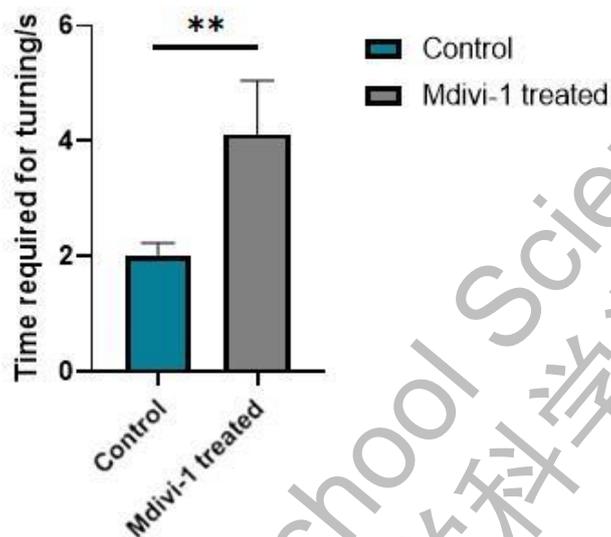


图 6 线粒体分裂被抑制后，涡虫摄食能力检测

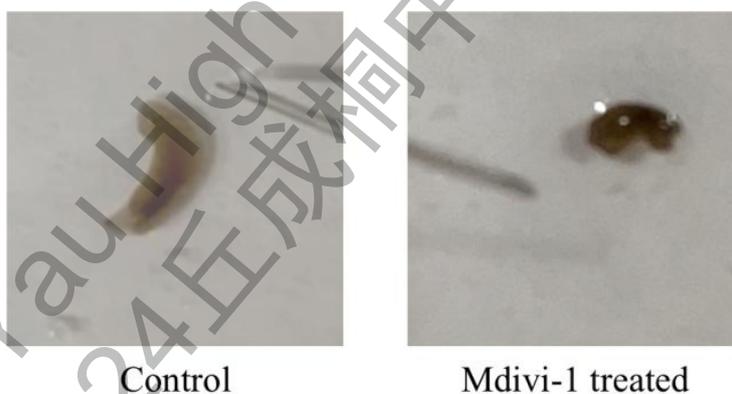
#### (5) 抑制线粒体分裂，涡虫个体应激反应减缓

运动能力的降低、面对应激的反应作为容易检测的衰老相关表型，已被广泛运用到基础研究中。研究表明，涡虫身体的不同部分受到细针等机械刺激会产生不同的反应，其中头部被细针等机械刺激后会发生转向、躯干会发生伸长、尾部

会发生收缩<sup>[16]</sup>。为了检测抑制线粒体分裂诱导的衰老涡虫对应激的反应，本实验用注射器针头刺激涡虫的头部，观察其运动情况并记录头部发生一次转向所需的时间。结果显示（视频 S1，图 7A），Mdivi-1 处理组涡虫完成一次转向的时间明显长于对照组，而且其受机械刺激后发生的运动类似于蜷缩而非转向（图 7B 所示），说明 Mdivi-1 抑制线粒体分裂诱导涡虫衰老后，个体应激反应减缓。



A.正常涡虫和 Mdivi-1 处理涡虫应激转向时间情况



B.正常涡虫和 Mdivi-1 处理涡虫应激动作形式

图 7 线粒体分裂被抑制后，涡虫面对应激的反应时间

### 3.3 诱导衰老后，涡虫再生受到抑制

#### (1) 诱导衰老后，涡虫头尾部再生受到抑制

抑制线粒体分裂后，涡虫出现了一系列衰老表型，如 ROS 水平升高、p53 表达增加等，而大量研究表明，这些表型又与组织损伤修复、再生有着密不可分的联系。为了进一步探究抑制剂 Mdivi-1 处理导致涡虫衰老后对涡虫再生的调控，

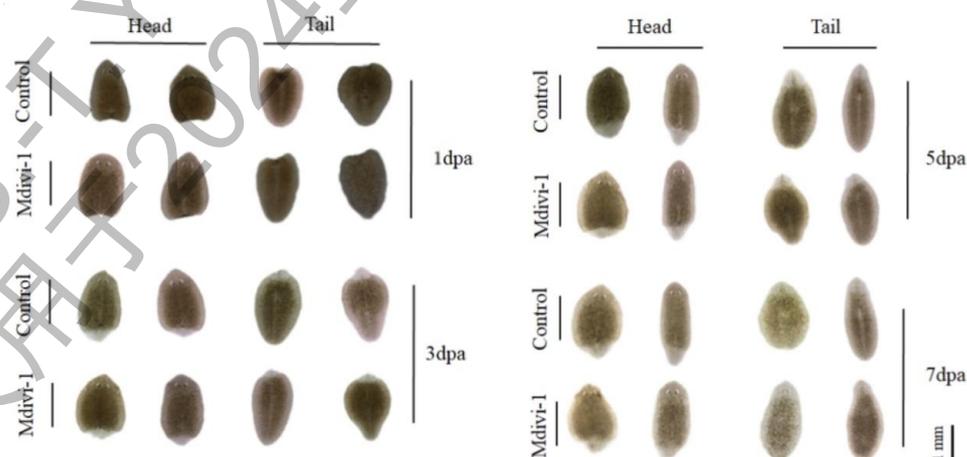
对饥饿一周以上的涡虫进行头部切割损伤处理和尾部切割损伤处理(图 8A 所示),并在切割处理后的第 1 d、第 3 d、第 5 d 以及第 7 d 三个不同的时间点对涡虫的再生情况进行拍照记录。

结果发现,与对照组相比,经 Mdivi-1 处理的涡虫在再生第 7 d 时,头部片段基本实现完全再生,而尾部片段再生受到了明显抑制。如图 8B 所示,对于涡虫的尾部片段,对照组在切割后第 1 d 长出了胚基,而抑制剂处理组没有出现可见的胚基,表明其头部再生被显著抑制;再生第 3 d 时,仍能明显观察到抑制剂处理组涡虫的头部再生受到抑制;而这种抑制效果随着再生时间的推进,在切割后第 5 d 以及第 7 d 抑制效果逐渐减弱,甚至和对照组相比没有明显区别。对于涡虫的头部片段,在整个再生的七天内,其再生尾部的能力都受到了显著抑制。对比头尾再生受到的抑制情况发现,抑制涡虫线粒体分裂蛋白 Dtp1 后,涡虫尾部再生的抑制效果比头部再生更严重。此外,为了对涡虫切割后的再生情况进行定量分析,本实验测量并计算了涡虫再生部位占再生后全长的相对比例。结果表明(图 8C 所示),在抑制剂处理组涡虫再生第 3 d 到第 5 d,无论是头部再生还是尾部再生都受到了显著抑制,并且尾部再生的抑制效果更明显、抑制时间持续到再生第 7 d。

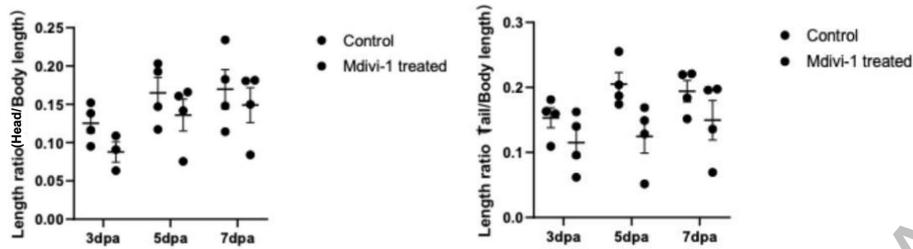
以上结果表明,抑制线粒体分裂诱导涡虫出现衰老后,涡虫的再生也受到显著抑制,其中对涡虫尾部再生的抑制更为明显。



A.对涡虫在咽前进行切割处理



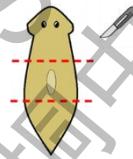
B.正常涡虫和 Mdivi-1 处理涡虫不同时间点头尾部再生情况



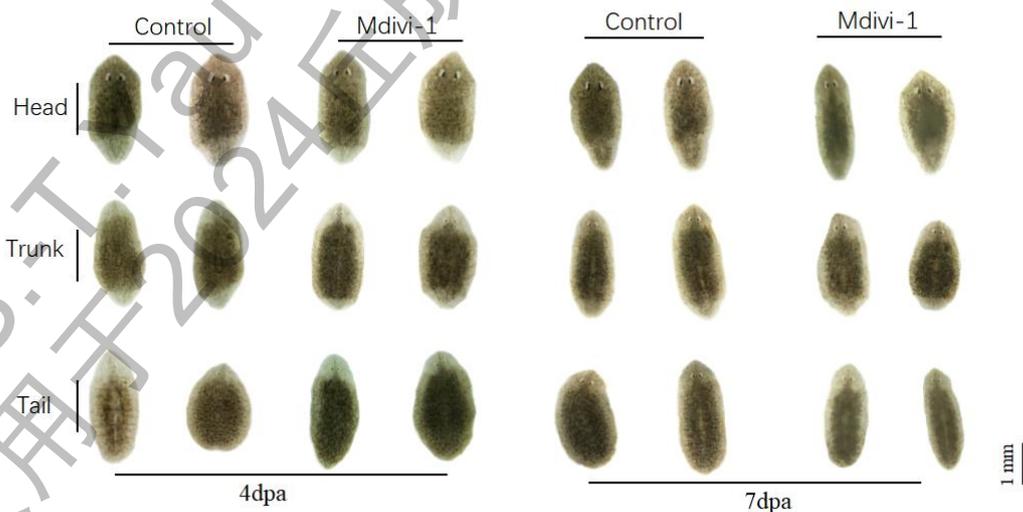
C.正常涡虫和 Mdivi-1 处理涡虫不同时间点再生头部、尾部占全长比例情况

图 8 诱导涡虫衰老后，涡虫头尾部再生情况

前述实验表明，Mdivi-1 处理对涡虫尾部再生的抑制作用明显，而对涡虫头部再生的抑制效果相对较弱。涡虫咽部具有摄食的功能，那么进一步猜想，咽部所在片段是否因为摄入更多的抑制剂溶液表现出更严重的再生缺陷呢？为了回答上述问题，在涡虫咽前、咽后分别进行切割（图 9A 所示），将其分为包含咽部的躯干部以及不包含咽部的头尾部，随后用  $8 \mu\text{M}$  Mdivi-1 溶液抑制 Drp1 活性，并在再生第 4 d 以及第 7 d 进行再生情况的观察记录。实验发现，Drp1 抑制剂对头尾再生的抑制效果不受咽部摄食的影响（图 9B 所示）。



A.对涡虫在咽前和咽后进行切割处理



B.正常涡虫和 Mdivi-1 处理涡虫头、躯干、尾部不同时间点再生情况

图 9 诱导涡虫衰老后，涡虫头、躯干、尾部再生情况

## (2) 诱导涡虫衰老后，涡虫干细胞增殖受到抑制

为了应对损伤所导致的组织缺失，涡虫的成体干细胞“Neoblast”需要大量增殖。大量研究表明，涡虫在组织损伤缺失后，会产生两个干细胞增殖高峰：第一个干细胞增殖高峰为全身范围内增殖，发生在组织损伤后大约 6 h；第二个干细胞增殖高峰发生在伤口增殖形成的胚基处，大约在组织损伤后 48~72 h。涡虫的细胞增殖仅发生在 Neoblast 中，因此可通过细胞增殖相关标记基因 PCNA 对 Neoblast 的两个增殖高峰进行分析<sup>[17]</sup>。RT-qPCR 实验结果显示，Mdivi-1 处理组 DjPCNA 的表达与对照组相比，在 6 h、48 h 和 72 h 三个干细胞增殖高峰期均受到显著抑制（图 10 所示），干细胞分裂速度下降。以上结果表明，通过抑制线粒体分裂诱导涡虫衰老后，涡虫再生过程中的干细胞增殖被显著抑制。

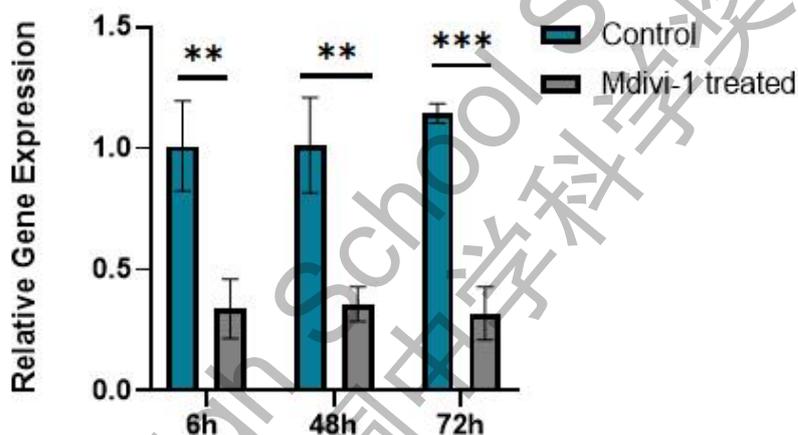


图 10 诱导涡虫衰老后，涡虫干细胞增殖受到抑制

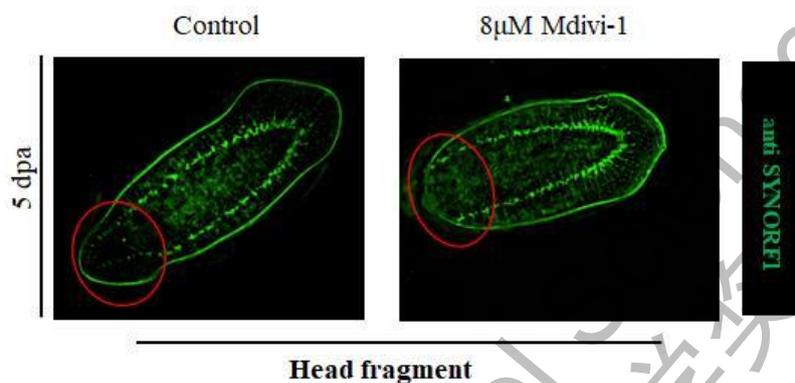
## (3) 诱导衰老后，涡虫神经系统的发育受到抑制

涡虫的梯状神经系统主要由中枢神经系统（CNS）和外周神经系统（PNS）两部分组成<sup>[18]</sup>。大量研究表明，涡虫切割后再生第 5~7 d 基本实现神经系统的再生。涡虫神经系统的完全再生已被广泛用作涡虫再生成功的标志。

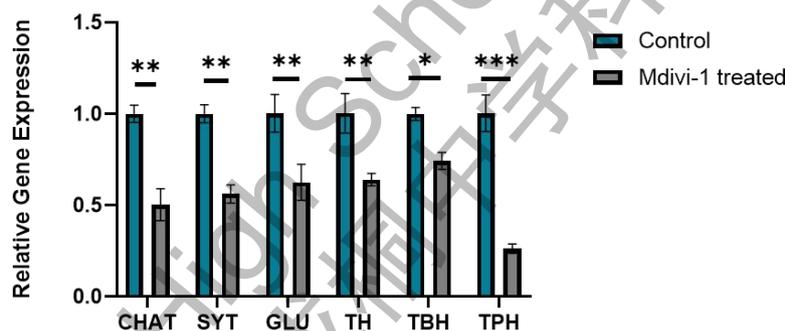
为了探究线粒体分裂被抑制后涡虫神经系统的再生，在再生第 5 d 使用 SYNORF1 抗体标记涡虫的神经系统，观察其神经发育情况。结果如图 11 所示，第 5 d 时，对照组涡虫已经基本再生出完整形态的神经系统，而抑制剂处理组涡虫表现出尾部神经系统未闭合的再生缺陷。

为了进一步说明线粒体分裂被抑制后，涡虫再生过程中不同神经系统的影响，通过 RT-qPCR 对不同神经标记物的表达进行检测，包括胆碱能神经元标志蛋白 DjCHAT、非特异性神经元标记蛋白 DjSYT、谷氨酸能神经元标记蛋白 DjGLU、多巴胺能神经元标记蛋白 DjTH、章鱼胺能神经元标记蛋白 DjTBH 以及羟色胺能

神经元标记蛋白 DjTPH。结果表明，抑制剂处理组以上六种基因的表达均显著下调（图 12 所示），说明线粒体分裂蛋白 Drp1 被抑制后，涡虫的非特异性神经元以及胆碱能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元、章鱼胺能神经元、羟色胺能神经元的发育会受到抑制，与免疫荧光结果相符。这部分结果表明，涡虫再生过程中，Drp1 对大脑的形态重建发挥着至关重要的作用。



A. 诱导衰老后，正常再生和 Mdivi-1 处理涡虫神经系统再生情况



B. 诱导衰老后，正常再生和 Mdivi-1 处理涡虫神经标记物表达情况

图 11 DRP1 调控涡虫神经系统再生

## 4. 讨论

线粒体是细胞进行有氧呼吸，氧化磷酸化合成 ATP 的重要场所，参与细胞增殖、分化、信号转导、固有免疫调控、细胞自噬等多种生理过程。为满足机体不同的生理和病理状态，真核细胞的线粒体不断地发生分裂和融合，该过程受到线粒体分裂蛋白 (Drp1、Mff、Fis) 和融合相关蛋白 (Mfn1、Mfn2、Opa1) 的调节<sup>[3,9]</sup>。研究表明，衰老细胞中的 Drp1 表达量显著降低，表明线粒体分裂参与细胞衰老的调控。同时，功能失调的线粒体已被证实可以诱导过量 ROS 的产生，导致 DNA 损伤，进一步加速由端粒诱导的细胞衰老。

作为高度复杂的系统生物学过程，衰老和再生既相互对立，又环环相扣。研究表明，衰老造成的永久性细胞周期停滞可造成细胞增殖的减少，进一步抑制多能干细胞集落的产生，并由此抑制再生过程<sup>[19]</sup>。同时，干细胞功能衰退的现象与组织功能和修复能力的下降有关<sup>[20]</sup>。然而，目前该方向的研究中并没有在系统水平上对衰老过程中再生能力变化规律进行探索的部分，且不同的组织器官具有异质性，其再生是否共同遵循某种一致的调控规律？是否能够通过探索未经发现的生物标志物以及关键调控基因，进一步开发调控再生、延缓衰老以及其相关疾病的新方法？基于以上实验背景，本研究以东亚三角涡虫为实验材料，通过特异性抑制剂 Mdivi-1 抑制涡虫的线粒体分裂，并检测涡虫的衰老、再生情况以及两者之间的联系。

本研究主要取得的结果如下：

(1) 涡虫线粒体分裂被抑制后，其体内 ROS 含量升高，抗氧化酶 GPX、SOD 的 mRNA 表达水平显著降低。说明线粒体分裂被抑制后，通过增加涡虫体内 ROS 水平、降低抗氧化能力，从而诱导涡虫衰老。

(2) p53 蛋白的突变、缺失和异常表达与肿瘤、衰老及衰老相关疾病的发生密切相关。Mdivi-1 抑制剂处理组的 p53 mRNA 表达水平显著高于对照组，说明线粒体分裂失调诱导的涡虫衰老与 p53 的表达上调有关。

(3) 涡虫的线粒体分裂被抑制后，出现衰老相关分泌表型 SASP，TNF- $\alpha$  表达水平明显增加，即线粒体分裂被抑制后诱导涡虫衰老。

(4) 涡虫的线粒体分裂被抑制后，出现应对机械刺激反应变缓、进食能力出现明显障碍等个体衰老相关表型。

(5) 对涡虫再生过程中干细胞增殖水平的检测发现，抑制线粒体分裂诱导涡虫衰老后，涡虫再生过程中的干细胞增殖受到显著抑制。因此，推测线粒体分裂失衡抑制多能干细胞集落产生是涡虫再生受到抑制的重要原因。

(6) 对涡虫再生过程中神经系统的再生发育情况研究发现，抑制线粒体分裂诱导涡虫衰老后，涡虫神经系统的再生发育出现明显缺陷，尾部神经系统未闭

合，并且胆碱能神经元、谷氨酸能神经元、多巴胺能神经元等多种神经元的发育受到抑制。

2024 S.-T. Yau High School Science Award  
仅用于2024丘成桐中学科学奖论文公示

## 5. 结论与展望

本研究初步确定了线粒体分裂蛋白 Drp1 参与涡虫的衰老及再生过程，并且线粒体分裂通过调控涡虫的衰老进一步调控其再生。首先，通过设置梯度浓度的 Mdivi-1 抑制剂处理涡虫并观察其再生能力，确定最佳处理浓度为 8  $\mu\text{M}$ ，并观察到抑制剂处理组的头尾再生受到显著抑制，说明 Drp1 参与涡虫的再生过程。进一步分析发现，抑制线粒体分裂后，会诱导涡虫出现衰老相关表型，并且这种诱导作用是通过增加 ROS 水平、p53 基因表达等实现的。此外，涡虫被诱导衰老后，其个体水平上面对应激的反应变缓、摄食能力受到抑制。衰老与再生是紧密联系的两个生物学过程。为了进一步探究涡虫衰老与再生之间的调控，本实验先通过抑制线粒体分裂诱导涡虫衰老，并检测衰老后的再生相关表型。结果表明，涡虫出现衰老后，其再生过程的干细胞增殖、神经系统发育过程均受到显著抑制。

综上所述，本实验初步确定了线粒体分裂通过 ROS 含量、p53 的表达实现对涡虫衰老的调控，而涡虫的衰老进一步抑制涡虫的再生。但是线粒体分裂被抑制后通过何种途径调控涡虫的干细胞增殖、神经系统发育？线粒体分裂被抑制后涡虫再生的失败是否也会反过来调控涡虫的衰老？以上问题都有待进一步深入探究。

## 参考文献

- [1] 刘红波. 铁死亡对涡虫头部再生的及其影响的初步研究[D]. 西北大学,2021.DOI:10.27405/d.cnki.gxbdu.2021.002458.
- [2] 孙靖怡. PFOS 与 PFOA 对涡虫 Wnt 信号及神经元的影响[D]. 山东理工大学,2023.DOI:10.27276/d.cnki.gsdgc.2023.000757.
- [3] 卢芳芳. 日本三角涡虫损伤后再生中线粒体功能研究[D]. 陕西师范大学,2019.DOI:10.27292/d.cnki.gsxfu.2019.001357.
- [4] 尹丹丹. 二甲双胍日本三角涡虫再生的机制研究[D]. 山东理工大学,2023.DOI:10.27276/d.cnki.gsdgc.2023.000736.
- [5] 徐振彪,宋林霞.三角涡虫:在体筛选再生及衰老相关药物的模型生物[J].中国细胞生物学学报,2016,38(06):744-749.
- [6] Liu, Ling, and Thomas A. Rando. "Manifestations and Mechanisms of Stem Cell Aging." *Journal of Cell Biology*, vol.193,no.2,18 Apr.2011, pp.257-266. DOI:10.1083/jcb.201010131.
- [7] Holtze, Susanne, et al. "Alternative Animal Models of Aging Research." *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 8, 2021, p. 660959. DOI:10.3389/fmolb.2021.660959.
- [8] Zhao, Yun, et al. "Emerging Roles of Mitochondria in Animal Regeneration." *Cell Regeneration*, vol. 12,no. 1,5 May 2023. DOI:10.1186/s13619-023-00158-7.
- [9] Martini, Hélène, and João F. Passos. "Cellular Senescence: All Roads Lead to Mitochondria." *The FEBS Journal*, 30 Jan. 2022. DOI:10.1111/febs.16361.
- [10] Liu, Xiaoqin, et al. "Mdivi-1: A Promising Drug and Its Underlying Mechanisms in the Treatment of Neurodegenerative Diseases." *Histology and Histopathology*, vol. 37, no.6,1 June 2022, pp. 505–512. DOI:10.14670/HH-18-443.
- [11] Vasileiou, Panagiotis V.S., et al. "Mitochondrial Homeostasis and Cellular Senescence." *Cells*, vol. 8, no.7, 6 July 2019, p. 686. DOI:10.3390/cells8070686.
- [12] Valenzano, Dario Riccardo, et al. "Non-Canonical Aging Model Systems and Why We Need Them." *The EMBO Journal*, vol.36, no.8, 20 Mar. 2017, pp. 959–963. DOI:10.15252/embj.201796837. Accessed 22 Nov. 2019.

- [13] 申屠路媚, 牟艳玲. 线粒体功能障碍机制及其相关疾病研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(01): 87-93. DOI: 10.13376/j.cbbs/2018012.
- [14] Xu S, Wu W, Huang H, Huang R, Xie L, Su A, Liu S, Zheng R, Yuan Y, Zheng HL, Sun X, Xiong XD, Liu X. The p53/miRNAs/Ccna2 pathway serves as a novel regulator of cellular senescence: Complement of the canonical p53/p21 pathway. *Aging Cell*. 2019 Jun;18(3):e12918.
- [15] 郑文鸽, 秦雪梅, 高丽, 等. 衰老相关分泌表型的作用机制及相关药物研究进展[J]. 药学学报, 2020, 55(01): 8-14. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0603.
- [16] 范强. 线虫衰老相关表型在恢复进食后的修复依赖于内质网未折叠蛋白响应的激活[D]. 北京协和医学院, 2024. DOI: 10.27648/d.cnki.gzxhu.2023.000382.
- [17] M. Almuedo-Castillo, X. Crespo-Yanez, F. Seebeck, et al., JNK controls the onset of mitosis in planarian stem cells and triggers apoptotic cell death required for regeneration and remodeling. *PLoS Genet*, 2014. 10(6): p. e1004400.
- [18] F.R. Buttarelli, C. Pellicano, and F.E. Pontieri, Neuropharmacology and behavior in planarians: translations to mammals. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2008. 147(4): p. 399-408.
- [19] Antelo-Iglesias, Lucía, et al. "The Role of Cellular Senescence in Tissue Repair and Regeneration." *Mechanisms of Ageing and Development*, vol. 198, Sept. 2021, p. 111528. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111528.
- [20] Brunet A, Goodell MA, Rando TA. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2023 Jan;24(1):45-62. doi: 10.1038/s41580-022-00510-w. Epub 2022 Jul 20. PMID: 35859206; PMCID: PMC9879573.

## 致谢

记得初三竞赛课上，我第一次在《普通动物学》里见到了“涡虫”这种神奇的动物，当时就觉得有着两个小眼点和三角形头部的涡虫十分可爱，同时也为其无比强大的再生能力而惊叹。2024年1月，我有幸通过选拔成为了一名四川省英才计划学员，在高一就得到了进入四川大学生命科学院实验室学习的机会，见到了我只在书上见过的涡虫和许多仪器。每个周末的实验室学习为我的高中生活添上了浓墨重彩的一笔，深深地吸引着我不断学习和探索。在这大半年的学习时光中，从刚进实验室手足无措的新手到后来能够初步了解科研的高中生，一路走来，要感谢所有在我科研的小小旅程中给予无偿的支持和帮助的人。

首先，特别感谢我的导师邹方东教授，是您一步步带我走进科研的大门。您不仅在选题时拨云见雾般为当时迷茫的我点出线粒体的方向，还在整个实验设计、数据分析以及论文撰写的过程中提供了十分关键的指导和建议。每当我在实验思路遇到瓶颈，您总是为我细致地理清思路；每当我产生各种各样不成熟的想法时，您也总是耐心地倾听我的想法、与我探讨，指出每一步的可行性，并鼓励我继续向前学习和探索。记得每当我在实验中遇到困难时，您总是耐心地帮助我解答各种疑问；后来论文修改的过程中，您无比细心严谨地为我指出论文中的各种错误表达；在平常的实验室生活中，您也对我关心细致入微、考虑周到。正是您的细心指导和持续鼓励，照亮了我前行的道路，激励着我不断学习与探索。

其次，向实验室的师兄师姐表达最诚挚的感谢。从一开始对实验室的一切迷茫无比，到站在师兄师姐旁一步步学习实验，最后自己亲手完成实验，这个过程中无比感谢每一位师兄师姐对我的指导、照顾与包容，让我感受到无比新鲜美好的“实验室生活”。在实验学习中，师兄师姐对我在实验方法、仪器试剂使用方面提供了宝贵的指导和帮助；在平时生活中，师兄师姐也在方方面面对我关怀备至，让我感到无比温暖与感动。特别要感谢的是赵丽师姐。您手把手教导了我各种实验，详细地为我讲解每一步实验原理，耐心示范实验操作和技巧，帮助我解答各种各样的问题，逻辑清晰而又细致入微的解答让我每次都收获颇丰。

最后，我要感谢我的父母。您们始终如一地支持我，给予我无条件的爱和鼓励。在我实验遇到困难、感到迷茫的时刻，父母的关心和支持让我重新找回信心；平常实验室路途遥远，暑假每天往返，您们总是亲自接送，在生活上对我无微不至。您们的关爱与付出是我不断追求梦想的动力。