

復旦大學

本科毕业论文



论文题目：探究细胞衰老过程中 FUS 蛋白对下游基因选择性多聚
腺苷酸化的调控

姓 名：李昱昶 学 号：17307110186

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学

指导教师：倪挺 职 称：教授

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期： 2021 年 5 月 26 日

探究细胞衰老过程中 FUS 蛋白对下游基因选择性多聚腺苷酸化的调控

完成人

李昱昶

指导小组成员

倪挺 教授

魏刚 讲师

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	II
一、引言.....	1
1.1 细胞衰老.....	1
1.2 选择性多聚腺苷酸化.....	2
1.3 核不均一核糖核蛋白.....	4
1.4 FUS 蛋白	5
二、材料与方法.....	7
2.1 实验材料.....	7
2.1.1 实验用仪器与设备.....	7
2.1.2 实验用试剂与试剂盒.....	8
2.1.3 实验用引物信息.....	9
2.1.4 实验用细胞.....	11
2.2 实验方法.....	11
2.2.1 细胞复苏、传代和冻存.....	11
2.2.2 构建敲低载体.....	12
2.2.3 构建过表达载体.....	13
2.2.4 构建双荧光素酶载体.....	14
2.2.5 质粒抽提.....	15
2.2.6 细胞转染和慢病毒包装构建稳定细胞系.....	15

2.2.7 细胞中 RNA 的提取	16
2.2.8 RNA 的反转录和实时荧光定量 PCR.....	16
2.2.9 cDNA 3'末端快速扩增 (3' RACE)	17
2.2.10 双荧光素酶报告基因检测实验.....	18
2.2.11 细胞衰老相关表型检测.....	18
三、实验结果.....	20
3.1 敲低 FUS 可以诱导细胞衰老	20
3.2 筛选 FUS 的下游基因	22
3.3 下游基因的 APA 受 FUS 调控.....	24
3.4 敲低 CCNA2 可以诱导细胞衰老	25
3.5 敲低 AAGAB 可以诱导细胞衰老	26
四、总结.....	28
4.1 CCNA2 的 APA 变化趋势与表达水平变化趋势之间的不一致性.....	28
4.2 AAGAB 与细胞衰老相关通路的关系.....	29
4.3 敲低 AAGAB 除了影响细胞生长状态还可能会影响细胞的形态	30
参考文献.....	31
致谢.....	34

摘 要

细胞衰老被视为是个体衰老的原因之一和一种重要的抑癌方式。FUS 是一种参与基因转录后水平调控特别是选择性多聚腺苷酸化的 RNA 结合蛋白，随着细胞衰老 *FUS* 的表达水平会显著降低。但是 *FUS* 与细胞衰老之间的关系尚不明确。我们发现敲低 *FUS* 能诱导细胞衰老，并且通过对敲低 FUS 细胞的 RNA-seq 数据进行分析，筛选出两个下游基因 *CCNA2* 和 *AAGAB*。FUS 可以调控它们的选择性多聚腺苷酸化过程，而且敲低这两个基因可以诱导细胞衰老。由此提示，FUS 可能通过调控 *CCNA2* 和 *AAGAB* 的选择性多聚腺苷酸化来影响细胞衰老。

关键词：细胞衰老，选择性多聚腺苷酸化，FUS，*CCNA2*，*AAGAB*，RNA-seq

Abstract

Cellular senescence has been regarded as one of inducers of individual aging and a mechanism to repress tumors. FUS is an RNA binding protein that participates in the post-transcriptional modulation especially alternative polyadenylation of genes. Expression of *FUS* decreases as cell aging. However, it's still unclear how *FUS* relates to cell senescence. We found that cell senescence can be induced after knocking down *FUS*. Two downstream genes, *CCNA2* and *AAGAB*, have been screened through analysis of RNA-seq data from cells with FUS knocked down. FUS regulates the alternative polyadenylation of *CCNA2* and *AAGAB*. Moreover, knocking down these two genes can both induce cell senescence. Our results suppose that FUS may influence cell senescence by regulating alternative polyadenylation of *CCNA2* and *AAGAB*.

Key words: cellular senescence, alternative polyadenylation, FUS, *CCNA2*, *AAGAB*, RNA-seq

一、引言

1.1 细胞衰老

细胞衰老是一种常见的细胞程序,可以被定义为伴随着一些表型变化的不可逆的细胞周期阻滞^[1]。自从 1961 年 Hayflick 在人类成纤维细胞中发现此现象以来^[2],人们对细胞衰老的机制在不断地探究,目前已经发现的主要机制包括端粒变短、DNA 损伤和 *INK4/ARF* 位点的去抑制等(图 1)^[3, 4]。细胞衰老存在着许多特征,比如细胞衰老相关的 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -Gal)表达、细胞周期阻滞、细胞生长减慢、细胞核异染色质积累等^[5]。

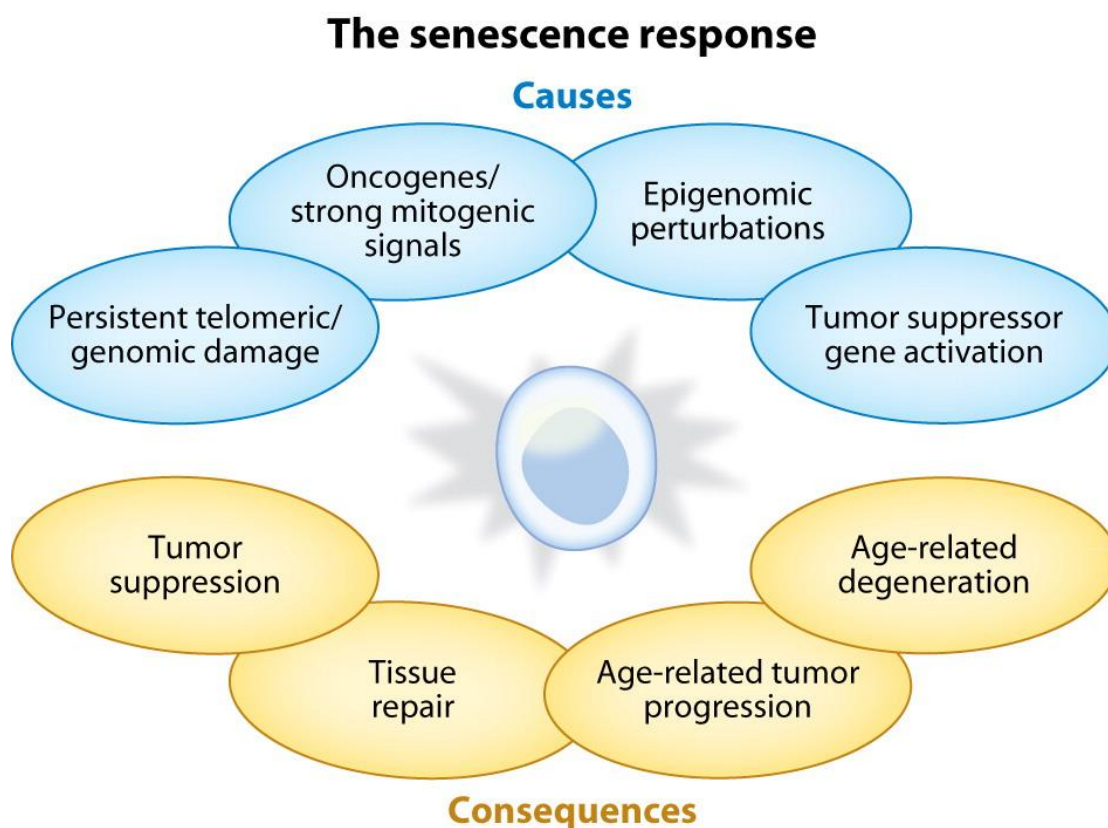


图 1 细胞衰老的常见诱因和结果

细胞衰老是对潜在致癌性刺激的反应。这些刺激包括 DNA 损伤、强烈的促分裂信号、表观损伤和抑癌基因激活等。细胞衰老的后果是多种多样的:基本不可逆的细胞周期停滞可以抑制肿瘤发生;衰老细胞被清除后可以促进机体的组织修复;但是某些情况下衰老细胞的表型也可以助长癌症的发展;细胞衰老也可能会导致衰老相关的退化性疾病。本图引自 Campisi 等人的文章^[4]

衰老的细胞不断积累往往会导致个体的衰老和功能障碍,不利于个体的生存(图 1)^[4]。衰老细胞会产生一些分泌表型,通过影响体内微环境而导致组织功能阻碍^[6];同时细胞衰老与一些衰老相关疾病有关,比如纤维化疾病、II 型糖尿病、肥胖症等^[7-9]。但是细胞衰老也会对机体产生有益的影响(图 1),细胞衰老过程中高表达的细胞周期抑制分子会使得细胞脱离癌变进程,进入衰老状态,从而阻止癌前细胞的增殖^[10];已有研究表明,在小鼠衰老个体中移除积聚的衰老细胞可以减缓动脉粥样硬化和肝脏、心脏等组织器官的动能衰退,从而延长个体健康寿命^[11-13]。细胞衰老与个体的健康和衰老有密切关系,所以研究细胞衰老的发生机制和寻找关键作用因子对多种疾病预防和人类健康具有重要意义。

1.2 选择性多聚腺苷酸化

RNA 作为中心法则中的关键一环,完成了从 DNA 向蛋白质的遗传信息传递。RNA 在生物体中承担重要作用除了与其本身的分子结构和性质有关之外,还与它可以受到多层次的调控密不可分。其中基因的选择性腺苷酸化(alternative polyadenylation, APA)就是一种重要的转录后水平调控方式。真核生物的 mRNA 在加工成熟时需要在 3'端加上一段多聚腺苷酸(polyadenylation, polyA)尾巴来保证其稳定性^[14],对于同一个基因,由于剪接加尾位置的不同,会产生带有不同长度或序列的转录本,这种现象即为 APA^[15]。

APA 根据 pA 位点的位置分为两大类型:位于编码区域的 APA(coding region-APA, CR-APA),即选择性的 pA 位点在基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)内部,这会导致同一个基因可以产生多种蛋白亚型(图 2);位于 3' 非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)的 APA(untranslated region-APA, UTR-APA),即选择性的 pA 位点在基因的 3'UTR 上,这会导致基因产生 3'UTR 长度不一样的转录本,但翻译出来的蛋白亚型是一样的(图 2)^[16]。

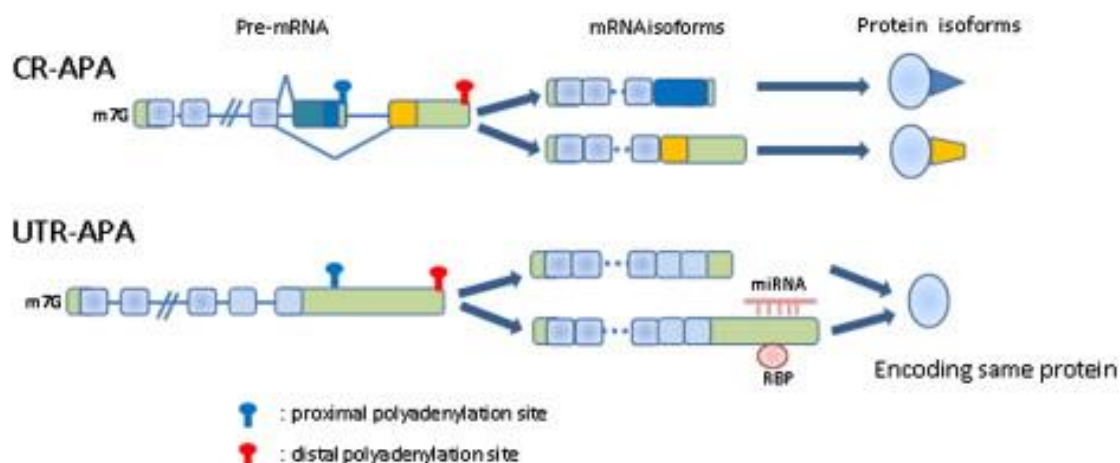


图 2 APA 的两种类型

APA 根据选择性 pA 位点在基因上分布的位置分成了 CR-APA 和 UTR-APA 两种类型。本图引自 Giammartino 等人的文章^[16]

APA 与生理和病理状态有着密切关系，APA 可以通过调控基因的表达情况来影响生物体的正常生理活动或者疾病发生。许多最近的组学数据表明在机体的各种生理过程中发生了多聚腺苷酸化位点 (polyadenylation site, pA site) 的变化，比如在 CD4 T 细胞活化的过程中，更多的基因倾向于使用近端 pA 位点，导致 mRNA 整体变短^[17]；在大脑和生殖器官等细胞增殖旺盛的组织器官中，基因也更倾向于使用近端 pA 位点^[18]。除此之外，APA 在疾病发生中的作用也逐渐被发现。癌细胞系中的原癌基因往往在 DNA 层面没有改变但是蛋白表达量升高，组学研究表明这一现象的原因可能是癌细胞中的许多基因倾向于使用近端 pA 位点，表达 3' UTR 更短的 mRNA，而更短的 mRNA 通常更稳定，翻译效率更高^[19]。同样的研究也在衰老细胞中进行，但是结果相反，在复制性衰老的小鼠胚胎成纤维细胞中收集到的转录组数据显示衰老细胞中的大部分基因倾向于使用远端的 pA 位点，导致了 mRNA 的 3' UTR 更长，基因表达量下降^[20]。细胞癌变和衰老往往被视为互相拮抗的两种过程，而在这两种相反的生理过程中 pA 位点的选择也呈现相反的趋势，这提示我们 APA 可能在其中有非常重要的作用。

APA 受到多种因素的调控，包括顺式作用的 3'端加尾信号的强弱程度和反式作用因子的结合强度^[21]。其中各种 RNA 结合蛋白尤其是组成 3'端加工复合物的 RNA 结合蛋白对 pA 位点的选择影响更为直接和关键 (图 3)^[22]。

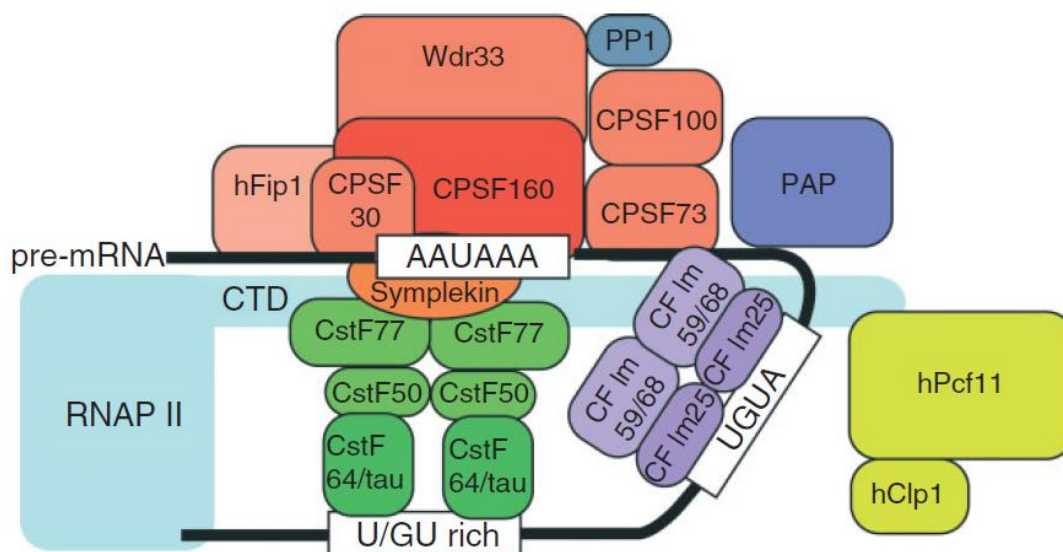


图3 前体 mRNA 的 3'端加工复合物示意图

参与前体 mRNA 的 3'端加工的 RNA 结合蛋白主要包括会结合到 A(A/U)UAAA 序列上的 CPSF、会结合到 U/GU 富集区域的 CstF、会结合到 UGUA 序列上的 CF Im 等反式作用因子。本图引自 Chan 等人的文章^[22]

一个典型例子就是在 B 细胞活化过程中，剪接激活因子（cleavage stimulation factor, CstF）的浓度升高会导致 IgM 的一个位于内含子中弱势的加尾信号被激活，从而产生分泌型 IgM；而当 B 细胞休眠时，CstF 的浓度降低，位于 3' UTR 的强势加尾信号被优先使用，导致细胞生产膜结合型 IgM^[16]。另一种切割因子 Im（cleavage factor Im, CFIm）则对 pA 位点的选择有着与 CstF 相反的影响，研究表明，敲低细胞中 25KDa 的 CFIm 亚基会导致基因倾向于使用位于 3' UTR 的远端 pA 位点^[23]。此外还有一种常见的 RNA 结合蛋白 HuR（human antigen R）对 pA 位点的选择有调控作用，其可以结合在 mRNA 的 AU 碱基富集区，而加尾信号往往就是 AU 富集序列，因此 HuR 可能会和切割与多聚腺苷酸化特异性因子（cleavage and polyadenylation specificity factor, CPSF）对加尾信号的结合有竞争，从而影响 APA 过程^[24]。由此可见，对 APA 机制的研究往往要聚焦于 RNA 结合蛋白的类型和功能。

1.3 核不均一核糖核蛋白

核不均一核糖核蛋白（heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP）是一类重要的 RNA 结合蛋白，也是一个包括 20 多个成员的大蛋白家族^[25]，对于 mRNA 相关各种细胞内生理过程都有很重要的作用，参与了前体 mRNA 的可变

剪接、维持 mRNA 的稳定、调控 mRNA 的转录和翻译等反应^[26]。现有研究表明,许多 hnRNP 在疾病发生尤其是肿瘤发生过程中出现了表达水平改变,这说明它们在肿瘤发生中可能有作用。hnRNP A1 已经被证明在胃腺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤等肿瘤细胞中呈高表达,而且敲低其表达量后可以引起明显的癌细胞凋亡^[27];在非小细胞肺癌细胞中, hnRNP A2/B1 被证明同样可以促进细胞增殖和抑制细胞凋亡^[28]。hnRNP 影响细胞增殖乃至癌化的机制逐渐被揭示,人表皮生长因子受体-2 (human epithelial growth factor receptor 2, HER2) 在接近 30% 的乳腺癌病例中表达有升高,而与之相关的就是 hnRNP H1 对其可变剪接的影响,敲低 hnRNP H1 可以使得 *HER2* 产生跳过第 16 个外显子的 mRNA,从而影响其蛋白表达效率^[29]。此外, hnRNP 还被发现在包括阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD)、肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等在内的多种神经退行性疾病中发挥作用^[30]。

1.4 FUS 蛋白

FUS 蛋白 (fused in sarcoma/translocated in liposarcoma, FUS/TLS) 是一种重要的 hnRNP, 又名 hnRNP P2^[31]。目前针对它的研究主要关注它在 ALS 中的作用,主要的机制可能是 FUS 的无义或缺失突变会影响其蛋白 C 端的核定位序列,导致突变的 FUS 蛋白在细胞质的异常积聚及正常蛋白在细胞核的减少,进而引起 ALS 发生^[32]。

FUS 同时被认为是剪接和加尾复合物中的组分,可以通过调控前体 mRNA 的可变剪接或者 APA 控制蛋白的表达量^[33]。已有研究证明, FUS 的 RNA 结合结构域 (RNA binding domain, RBD) 可以识别并结合靶 mRNA 的 3' UTR 区域的特定序列^[34]。通过组学数据分析发现, FUS 与 mRNA 结合的位置往往会影响 RNA 聚合酶 II 的作用,导致基因的转录效率降低^[35]; FUS 敲低后会影响到细胞中很多基因的可变剪接及 APA,从而影响这些基因的表达量,进而影响细胞的功能和生长^[36]。事实上,尽管目前具体机制仍不清楚, FUS 还被证明了与 mRNA 的 5'端加帽和运输等过程有关^[37, 38],可以说 FUS 参与了 mRNA 的所有代谢过程。

FUS 在调节细胞增殖、细胞周期中的作用也逐渐被人发现。在人神经母细胞瘤中,通过 RNA 干扰敲低 FUS 可以抑制癌细胞的增殖和迁移,使其出现细胞周期阻滞现象等^[39]。此外, FUS 也参与到 DNA 损伤修复等其他生物学过程中。在

DNA 双链断裂 (DNA double-strand breaks, DSBs) 位点处, FUS 可以直接与聚 ADP 核糖多聚酶 (polyADP-ribose polymerase, PARP) 及组蛋白脱乙酰酶 (histone deacetylase 2, HDAC2) 互作, 参与 DNA 损伤修复, 而突变后的 FUS 无法与两种蛋白互作而失去了参与 DNA 修复的能力^[40]。

二、材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验用仪器与设备

仪器与设备名称	生产公司
移液枪	Eppendorf
普通离心机	Eppendorf
4℃低温离心机	Eppendorf
-80℃超低温冰箱	Thermo Fisher
PCR 仪	Bio-Rad
qRT-PCR 仪	Bio-Rad
金属浴	Eppendorf
水浴锅	华利达
核酸电泳仪	天能
凝胶成像分析系统	天能
显影仪	天能
蛋白质电泳仪	Bio-Rad
Nanodrop 2000	Thermo Fisher
Qubit 荧光定量仪	Invitrogen
酶标仪	Bio-Rad
磁力架	Beck-man
紫外交联仪	UVP
菌类培养箱	精宏
菌类摇床	天呈
超净工作台	华利达
37℃恒温细胞培养箱	Thermo Fisher
普通倒置显微镜	尼康
荧光显微镜	奥林巴斯

仪器与设备名称	生产公司
血球计数板	Marientfeld

2.1.2 实验用试剂与试剂盒

试剂名称	生产公司
DEPC 水	生工生物公司
无水乙醇	生工生物公司
质粒小提试剂盒	天根
DNA Clean & Concentrato kit	ZYMO
DNA gel Recovery Kit	ZYMO
T-A 连接试剂盒	NEB
2 × SYBR mix	Vazyme
ClonExpress 同源重组酶	Vazyme
TRIZol Reagent	Sigma
三氯甲烷	Sigma
异丙醇	Sigma
cDNA 第一链合成试剂盒	天根
限制性内切酶	NEB
KOD FX	TOYOBO
Q5 2 × Master Mix	NEB
RNase inhibitor	Promega
GlycoBlue 核酸共沉淀物	Life
T4 DNA polymerase	NEB
T4 DNA Ligase	NEB
DMEM 培养基	Life
Opti-MEM 培养基	Life
含 0.25% EDTA 的胰酶	Life
胎牛血清 (FBS)	Gibco
无血清细胞冻存液	新赛美
1 × PBS	Life

试剂名称	生产公司
Lipofectamine 2000	Life
Triton X-100	Sigma
碘化丙啶 (PI)	生工生物公司
Cell Counting Kit-8	Dojindo
SA- β -Gal 试剂盒	Sigma
Luciferase 试剂盒	Sigma

2.1.3 实验用引物信息

引物名称	引物序列 (5'-3')
L001-Apol9a-Q-F	ACACGGAAGAAGCCAGTTAAGAGAAG
L002-Apol9a-Q-R	GGACAATGACATGCCTGAGGATGG
L003-Btg2-Q-F	ATGTAGCAGATCGTGTAATGTGTAGAGAAG
L004-Btg2-Q-R	GCAATGGAAGCAACCTCGTCACA
L005-Cd55-Q-F	GGAGATGAAGGCAAGAAGATCAGAAGTT
L006-Cd55-Q-R	TTGTTTGTACTACAGAGTCTCAGGTATCC
L007-Chkb-Q-F	CCAATCTCGGTTCCAGTTCTACTTCC
L008-Chkb-Q-R	AGGTCGGCTATTTCAACAACAGTCTC
L009-Fam124a-Q-F	AACCAGGCGAAGGCGGAAGT
L010-Fam124a-Q-R	GCAAGGCAGGTAGGGTATGAAGC
L011-N4bp2l2-Q-F	GAATGAAGCCGCAGACTGTGGAA
L012-N4bp2l2-Q-R	CTTGATGATGAGAGGCAGGTGGTAC
L013-Oaz2-Q-F	AACCTCACATCGTCCACTTCCAGTA
L014-Oaz2-Q-R	CACTTTCATCTTCTCCTCAGCAAACCTCTA
L015-MCM6-3'RACE-L-F	ACTTGCCTTGATGTCTGAGC
L016-MCM6-3'RACE-S-F	AACACAGGCTTCAGCACTTCC
L017-RPL22L1-3'RACE-L-F	TGATTCTTGGATGACTGAACTTCCT
L018-Axl-CE-F	ATCTACCCGCTCACCCACTG
L019-Axl-CE-R	AGTCTCCTTCTTCCTCCGATGG
L020-Axl-ES-F	CCAGACAACCTACGGAGCTAGAG
L021-Axl-ES-R	CACAGCGACCTTGAGGATGGA
L022-Bad-NE-F	TGAGCCGAGTGAGCAGGAAG

引物名称	引物序列 (5'-3')
L023-Bad-NE-R	CGCTTTGTCGCATCTGTGTTG
L024-P4ha1-NE-F	ACAAGCCTCGCATCATTCGTT
L025-P4ha1-NE-R	G TTCATACTGTCCTCCAACTCCATAA
L026-SLCO4A1-qPCR-T-F	GCGGGCACTCAGCATTTTCCT
L027-SLCO4A1-qPCR-T-R	ACAGGAGGTCACAGCCGACTT
L028-SLCO4A1-qPCR-L-F	ATCGTGTGTGGTGTGCGTGAG
L029-SLCO4A1-qPCR-L-R	TTTAACTGAGGACACACAAGCCTTCC
L030-SERPINE1-qPCR-T-F	TCCAGTCACATTGCCATCACTCTTG
L031-SERPINE1-qPCR-T-R	GGACATTCACTCTGCCACCTGC
L032-SERPINE1-qPCR-L-F	CAGGCAGCTCGGATTCAACTACC
L033-SERPINE1-qPCR-L-R	GTATGTTGCCCAGGCTGGTCTTG
L034-SEZ6L2-qPCR-T-F	GCGGGAGTATGAAGTTTCCATCTGAA
L035-SEZ6L2-qPCR-T-R	GAGACTATTTACACAGCCAGGGAGGA
L036-SEZ6L2-qPCR-L-F	AGGAGGGTCAGAAGAAGGACAAAGG
L037-SEZ6L2-qPCR-L-R	AATTCAGAAGCAAAGGTGGAGAGACTG
L038-SH3D19-qPCR-T-F	GAGCATATCAGCCTTATTACCAGAGCAA
L039-SH3D19-qPCR-T-R	CCTTCAAATCCTTAGACAAATGGGAATCAC
L040-SH3D19-qPCR-L-F	GGAAGGATATGGAATGGAACATGAGGTAT
L041-SH3D19-qPCR-L-R	CAACTATTGCACTTATCATTCTGCTGACAG
L042-TRAPPC11-qPCR-T-F	AGAGCTATGCAGGTGTTTCATTGTGA
L043-TRAPPC11-qPCR-T-R	GAGTTCCTCTGAATAGTTGGTATAACATCC
L044-TRAPPC11-qPCR-L-F	TCAAATAGGTTTCAGCTTGCTGCCAAA
L045-TRAPPC11-qPCR-L-R	GCCTGACTCAGACCCTGCATCTT
L046-ZDHHC2-qPCR-T-F	AAGTATCAATGCTGTAGATGGATGGAAGA G
L047-ZDHHC2-qPCR-T-R	GCAATGGCTTGGAGAGAACTAATCAATTC
L048-ZDHHC2-qPCR-L-F	GGCTTGTTTCAAAGAGACTCCTGTGA
L049-ZDHHC2-qPCR-L-R	GCGGTGTTGGTGATTGAGCTATTAGA
L050-psiCHECK-2-S-F	GAAGTTCCTAACACCGAGTTC
L051-psiCHECK-2-S-R	ACAAACCCTAACCACCGCTTA
L052-LUC-AAGAB-S/L-F	CAGTAATTCTAGGCGATCGTAGCTGTCTCT GAGATACCTCT

引物名称	引物序列 (5'-3')
L053-LUC-AAGAB-S-R	GCCAGCGGCCGCTCTAGGTTTGCTTATCAG TTCCTCTGG
L054-LUC-AAGAB-L-R	GCCAGCGGCCGCTCTAGGTTCTAACCAGA TGGCCTAGTAT
L055-AAGAB-Q-F	CTTGATAGTGTCTCCTCATGGCTTCC
L056-AAGAB-Q-R	CCTCAGGCAACTCCTCTGGACTAA
L057-CCNA2-Q-F	CCAAGAGGACCAGGAGAATATCAACC
L058-CCNA2-Q-R	GGAGGAACGGTGACATGCTCATC
L059-CCNA2-cDNA-F	GACCTCCATAGAAGATTCTAGGCTGCATCT CTGGGCGTCTTTG
L060-CCNA2-cDNA-R	GATCGCAGATCCTTGCGGCCCAACACTTAT AGAGGTTTGCTCTCTGGTT
L061-pCDH-S-F	TCGTTTAGTGAACCGTCAGATC
L062-pCDH-S-R	GGAGCCAGTACACGACATCA
Oligo dT	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTVN; V = A, G, C; N = A, T, G, C
S-PCR	ACTCTGCGTTGATACCACTGCTT

2.1.4 实验用细胞

本实验所用细胞均为人源细胞，包括 293T（人肾上皮细胞系）、HFF（原代人包皮成纤维细胞）、A549（人非小细胞肺癌细胞系）、H1299（人非小细胞肺癌细胞系）以及 HUVEC（人脐静脉内皮细胞系）。

2.2 实验方法

2.2.1 细胞复苏、传代和冻存

(1) 细胞复苏

从-80℃冰箱中取出冻存的细胞，37℃下完全解冻后放入离心机，1000 rpm 离心 3 分钟后取出。小心去除上清，尽量吸弃干净，然后加入 1 mL 的含 10% FBS 的 DMEM 培养基，轻轻吹打混匀，将细胞转移到 T25 培养瓶中，再加入 2 mL 培养基，最后将培养瓶放置于含 5% CO₂ 的 37℃恒温培养箱中培养，第二天

观察细胞状态。

(2) 细胞传代

吸除培养瓶中的培养基，加入 PBS 轻轻晃动清洗细胞，吸除 PBS 后加入适量的含 0.25% EDTA 的胰酶，放在培养箱中消化 1-2 分钟。待细胞基本消化下来后，再加入等体积的培养基以终止消化，然后将细胞收集到离心管中进行离心，1000 rpm 离心 3 分钟得到细胞沉淀，吸弃管中培养基，加入 1 mL 新鲜培养基重悬细胞，将细胞转移到 T25 培养瓶中，再加入 2 mL 培养基，最后将培养瓶放置于含 5% CO₂ 的 37 °C 恒温培养箱中培养。

(3) 细胞冻存

与 2.2.1 (2) 中相同方法消化并离心细胞得到细胞沉淀，加入 1 mL 的无血清细胞冻存液，吹打混匀细胞，然后装到做好标记的冻存管中，直接放入 -80 °C 冰箱中保存。

2.2.2 构建敲低载体

(1) shRNA 序列选择和退火

在 Sigma 网站中对相应基因选择已验证的敲低效率最高的两条小发卡 RNA (small hairpin RNA, shRNA)，将序列信息送到生物公司进行合成。拿到两条单链的 shRNA 引物后，按照以下体系进行退火反应：

试剂	体积
shRNA oligo Forward (100 μM)	5 μL
shRNA oligo Reverse (100 μM)	5 μL
10 × NEB buffer 2	5 μL
H ₂ O	35 μL

PCR 仪程序设置为 95 °C 4 分钟，72 °C 10 分钟，然后以每秒 0.2 °C 的速度缓慢降温至 25 °C，得到的反应产物为退火后的双链片段，两端带有粘性末端，可以直接用于后续的连接反应。

(2) 质粒的双酶切

敲低载体使用 pLKO.1 载体，双酶切位点选择 *EcoRI* 和 *AgeI*，双酶切体系配比如下：

试剂	体积
10× CutSmart	5 μL

试剂	体积
EcoR I	1 μ L
Age I	1 μ L
pLKO.1 质粒	- (1 ug)
ddH ₂ O	to 50 μ L

金属浴中 37 °C 酶切反应 40 分钟，将反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，将观察到的一条 7000 bp 左右的条带切下来，用 DNA gel Recovery Kit 回收 DNA。首先向凝胶中加入与凝胶质量相对应的溶胶液，放在金属浴中 55 °C 震荡融化 10 分钟，将溶解液加到收集管中的吸附柱里，16000 rcf 离心 1 分钟后倒掉废液，再用 600 μ L 的洗液洗两次，最后将吸附柱放在新的 EP 管中，向吸附柱中加 20 μ L 水洗脱 DNA。测量酶切产物的浓度，然后保存在 -20 °C 备用。

(3) 敲低载体的连接

将酶切后的 pLKO.1 载体和退火后的 shRNA 片段进行连接，连接酶使用 T4 DNA 连接酶，载体取 15 ng 即可，连接体系如下：

试剂	体积
10 $\times$ T4 DNA ligase buffer	1 μ L
pLKO.1	- (15 ng)
T4 DNA ligase	1 μ L
shRNA oligos	to 10 μ L

置于室温连接反应 1 小时。

(4) 载体的转化

从 -80 °C 冰箱中取出 DH5 α 感受态细胞，置于冰上待其自然解冻。取至少 50 μ L 解冻好的感受态细胞加在连接产物中，在冰上放置 10-12 分钟，然后放在金属浴中 42 °C 热激 1 分钟，迅速拿出放回冰上降温 2 分钟。将感受态细胞均匀涂抹在带有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上，做好标记后倒置放在 37 °C 细菌培养箱中过夜培养。挑取若干个单克隆，在新的固体培养基上划线留样并放入 LB 液体培养基中，进行送测，挑取测序结果正确的菌落进行摇菌培养，然后进行后续的质粒抽提。

2.2.3 构建过表达载体

(1) 载体的双酶切

过表达载体使用 PCDH 质粒，酶切位点选择 *EcoRI* 和 *BamHI*，酶切和回收方法同 2.2.2 (2)。

(2) 插入片段的获取

首先在 NCBI 网站中获取基因的全长 CDS 序列，设计针对 pCDH 酶切位点两端同源臂的引物，以正常人源细胞 cDNA 为模板对目的基因进行 PCR 扩增。片段扩增反应使用 KOD 酶，PCR 体系如下：

试剂	体积
2 × buffer	10 μL
dNTP	4 μL
Forward primer	0.6 μL
Reverse primer	0.6 μL
cDNA	1 μL
KOD FX	0.4 μL
H ₂ O	3.4 μL

PCR 仪程序设定为 94 °C 2 分钟；32 个循环：94 °C 10 秒，55-58 °C 20 秒，68 °C (1 kb/分钟)；68 °C 5 分钟。

得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，跑胶后切下正确大小的条带，用 DNA gel Recovery Kit 回收，并测量回收后的片段浓度，放于 -20 °C 保存备用。

(3) 同源重组连接

使用 ClonExpressTM 试剂盒进行同源重组连接，载体使用量为 (0.02 × 载体碱基对数) ng，片段使用量为 (0.04 × 片段碱基对数) ng，然后加入 5 μL 的 2 × ClonExpress Mix，最后补水到 10 μL。将体系轻轻混匀后放入金属浴中，50 °C 反应 5 分钟，然后立即放置于冰上冷却。得到的连接产物即可进行转化，转化步骤同 2.2.2 (4)。

2.2.4 构建双荧光素酶载体

双荧光素酶载体使用 psiCHECK2 质粒，酶切位点选择 *Pme I* 和 *Xho I*。从 NCBI 网站上获取基因的 3' UTR 序列，设计针对 pCDH 酶切位点两端同源臂的引物，以正常人源细胞 cDNA 为模板对目的基因进行 PCR 扩增。扩增过程同 2.2.3 (2)，将扩增出的 3' UTR 片段连接到载体上的海肾荧光素酶末端，连接方法同 2.2.3 (3)，然后进行转化测序，转化步骤同 2.2.2 (4)。

2.2.5 质粒抽提

1) 提前一天挑取菌落接种到 3 mL 左右含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 °C 摇床中培养 12-16 小时。第二天将装有菌液的摇菌管放在离心机中 6000 rpm 离心 5 分钟, 吸弃上清。

2) 向菌块中加入 250 μ L P1 缓冲液, 吹打裂解菌块并转移到 EP 管中; 加入 250 μ L P2 缓冲液, 轻柔地上下颠倒混匀 6-8 次; 加入 350 μ L P3 缓冲液, 轻柔地上下颠倒, 出现均匀的白色絮状物, 16000 rcf 离心 10 分钟。

3) 将吸附柱装在收集管中, 向吸附柱中加入 500 μ L 的 BL 平衡液, 16000 rcf 离心 30 秒后倒掉废液。

4) 小心吸取上一步离心好的上清加到已平衡的吸附柱中, 16000 rcf 离心 30 秒, 倒掉废液。

5) 再向吸附柱中加入 600 μ L 的漂洗液 PW, 16000 rcf 离心 30 秒, 倒掉废液, 重复两遍。倒掉废液后再 16000 rcf 离心 2 分钟。

6) 把吸附柱放进新的 EP 管中, 打开盖子在通风橱中干燥 2-3 分钟, 向吸附柱里滴加 50 μ L 的水用来洗脱质粒, 静置 2 分钟后 16000 rcf 离心 1 分钟, 即可得到质粒溶液。测量质粒浓度后做好记录, 将质粒保存在 -20 °C 冰箱备用。

2.2.6 细胞转染和慢病毒包装构建稳定细胞系

(1) 细胞瞬时转染

提前一天将要转染的细胞均匀地种在六孔板中, 待细胞长至 60% 左右的密度后进行转染。先将 5 μ L 的 Lipofectamine 2000 加到 250 μ L 的 Opti-MEM 试剂中混匀, 室温放置 5 分钟; 取 1 μ g 质粒与 250 μ L 的 Opti-MEM 混匀, 5 分钟后将两者混匀, 室温再孵育 20 分钟。向六孔板中换上新鲜的培养液, 把孵育好的转染液滴加到液面中, 轻轻晃动混匀。把细胞放回培养箱中培养 4-6 小时, 然后更换新鲜的培养液继续培养, 24 小时后即可收细胞做后续实验。

(2) 慢病毒的包装和转导

慢病毒包装是将目的质粒和包装质粒共同转染到 293T 细胞中, 利用 293T 生产出慢病毒。提前一天将 293T 均匀铺在六孔板中, 密度在 70% 左右。第二天进行转染, 转染的质粒一共有三种, 包括目的质粒、编码 gag/pol 和 VSVG 的两种包装质粒, 三者比例为 4:3:1, 质粒总量为 2 μ g, 转染步骤与 2.2.6 (1) 中

相同。与此同时，将要感染的细胞种在六孔板中。

细胞转染 24 小时以后即可收取上清病毒液，将孔径为 0.45 μm 的过滤器装在注射器前端，把吸取的病毒液加入到注射器中，然后缓慢将病毒液过滤到 EP 管中。取出要感染的细胞，吸掉培养液，把过滤好的病毒液加到每孔细胞中，再补充适量的新鲜培养液以保证营养。病毒液感染 24-36 小时后，换成带有嘌呤霉素（终浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ ）的培养液进行细胞筛选，筛选 24 小时以上，将剩下的阳性细胞继续扩大培养或进行后续其他实验。

2.2.7 细胞中 RNA 的提取

将细胞消化下来离心收集细胞沉淀，加入适量 TRIzol，吹打细胞至完全裂解。然后加入 1/5 体积的三氯甲烷，剧烈震动混匀，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中 16000 rcf 离心 20 分钟。小心吸取上层透明液体到新的 RNase-free 的 EP 管中，加入等体积的异丙醇混匀，再加入 1 μL GlycoBlue 核酸共沉淀物，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中 16000 rcf 离心 30-60 分钟以沉淀 RNA。吸弃上清，用 80% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀，短暂离心后吸掉乙醇，尽量吸干净，然后开盖放在超净台中通风干燥 5 分钟左右，观察到 RNA 沉淀周围没有乙醇残留后，即可用 RNase-free 的水溶解 RNA 沉淀。最后测定 RNA 的浓度并记录，将 RNA 保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2.8 RNA 的反转录和实时荧光定量 PCR

(1) RNA 的反转录

由于本课题研究 mRNA 的加尾情况，需要获取成熟的加尾的 mRNA 进行后续实验验证，所以在反转录时要使用 Oligo dT 作为引物。首先配制去除基因组 DNA 的体系：

试剂	体积
5 $\times$ gDNA Buffer	2 μL
Total RNA	- (500 ng)
RNase-Free ddH ₂ O	to 10 μL

混匀上述体系，42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 分钟，然后立即置于冰上。继续配制反转录混合液，体系如下：

试剂	体积
10 $\times$ King RT Buffer	2 μL

试剂	体积
FastKing RT Enzyme Mix	1 μL
Oligo dT	2 μL
RNase-Free ddH ₂ O	5 μL

将反转录混合液加入到上一步去除 gDNA 的反应液中, 50 °C 孵育 60 分钟, 95 °C 孵育 3 分钟之后置于冰上, 得到的 cDNA 可用于后续的 PCR 或 qRT-PCR 实验。

(2) 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR 使用 SYBR-Green 进行反应, 反转录得到的 cDNA 稀释 5-6 倍后可作为模板使用, 具体反应体系如下 (12 μL):

试剂	体积
2 $\times$ SYBR Green mix	6 μL
5 μM forward primer	0.25 μL
5 μM reverse primer	0.25 μL
cDNA	0.5 μL
H ₂ O	5 μL

本实验在 Bio-rad CFX 仪器上进行, 程序设定为 95 °C 3 分钟, 40 个循环: 95 °C 10 秒, 60 °C 30 秒; 溶解曲线的设定为, 从 65 °C 以每次 0.5 °C 的速度逐渐升至 95 °C, 每个温度下反应 5 秒读取数据。

2.2.9 cDNA 3'末端快速扩增 (3' RACE)

3' RACE 技术所用的 cDNA 获取方式同 2.2.8 (1), 以 S-PCR 为后引物, 根据目的基因 3' UTR 上的特异序列设计前引物, 扩增感兴趣的含有 poly(A) 尾的 3' 末端片段。PCR 的具体反应体系如下:

试剂	体积
2 $\times$ Q5 Master Mix	12.5 μL
10 μM forward primer	1.25 μL
10 μM reverse primer	1.25 μL
cDNA	2 μL
H ₂ O	10 μL

PCR 仪程序: 98 °C 30 秒, 27 个循环: 98 °C 10 秒, 60-72 °C 20 秒, 72 °C (1

kb/30 秒); 72 °C 5 分钟。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 观察条带大小是否符合预期。

2.2.10 双荧光素酶报告基因检测实验

将 3' UTR 片段插入在 psiCHECK2 载体的海肾荧光素酶末端。提前一天将 293T 细胞种在 24 孔板中, 待细胞长至 60%左右的密度后进行转染, 转染步骤同 2.2.6 (1), 每种质粒转染 4 个复孔。24 小时后取出培养板, 用 PBS 清洗细胞, 然后每孔加入 100 μ L 的裂解缓冲液, 摇床上缓慢摇晃 15 分钟。轻轻吹打细胞裂解液, 收集到 EP 管中, 6000 rpm 离心 2 分钟, 吸取 25 μ L 上清液至白色 96 孔板中, 向每孔中再加入 25 μ L 的 LAR II 反应液, 用酶标仪检测萤火虫荧光素酶的荧光信号。再向孔中加入 25 μ L 的 Stop & Glo 反应液, 立即检测海肾荧光素酶的信号。用海肾信号值除以萤火虫信号值, 就可以得到最终的结果。

2.2.11 细胞衰老相关表型检测

(1) 衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色

提前一天将要染色的细胞种在 12 孔板中, 待细胞生长至密度为 70%左右后进行染色。将 X-Gal 溶液 37°C 预热 1 小时, 吸掉 12 孔板中的培养液, 用 PBS 清洗 3 次, 然后将 10 $\times$ 固定液稀释成 1 $\times$ 固定液, 每孔加入 600 μ L 的固定液, 固定 7 分钟。配制染色液, 配比如下:

试剂	体积
10 $\times$ Staining buffer	40 μ L
试剂 B	5 μ L
试剂 C	5 μ L
X-Gal 溶液	10 μ L
H ₂ O	340 μ L

细胞固定好后, 用 PBS 清洗 3 次, 然后加入使用 0.2 μ m 的滤膜过滤好的染色液。用封口膜缠好培养板四周, 放在 37 °C 水浴锅的水面上过夜孵育。第二天吸掉染色液, 加入 PBS, 在普通光学显微镜下观察细胞, 细胞染色后变蓝说明细胞衰老。

(2) 细胞增殖活力检测

将细胞消化下来离心, 用培养基重悬细胞, 然后用血球计数板进行细胞计数,

配制成浓度为 1×10^4 /mL 的细胞悬液。将细胞悬液加到 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 设置 4 个时间点, 每个时间点 4 个复孔, 每个样品需要种 16 个孔。24 小时后, 向第一个时间点的孔中加入 100 μ L 含 10 μ L CCK-8 试剂的培养液, 37 $^{\circ}$ C 孵育两个小时, 然后在酶标仪中检测 450 nm 和 630 nm 处的吸光值。随后分别在 48 小时、72 小时和 96 小时检测各时间点的吸光值。

(3) 细胞周期检测

提前一天将待测细胞种在六孔板中, 待细胞密度 50% 左右时把细胞消化下来, 用 PBS 清洗细胞沉淀一次, 用 PBS 配制含碘化丙啶 (终浓度为 50 μ g/mL) 和 Triton X-100 (终浓度为 0.03%) 的混合液, 向细胞中加入 500 μ L 混合液充分吹散混匀细胞, 室温避光放置 10 分钟即可上流式细胞仪检测细胞周期, 通过配套的软件分析每个样品中细胞分别处于 G1、S、G2/M 期的比例, 以此来判断细胞是否发生周期阻滞。

三、实验结果

引言中提到 FUS 蛋白作为一种 RNA 结合蛋白，在神经细胞中对基因表达的调控有重要影响，而且它对于细胞周期的调控也逐渐被揭示。在 5 种复制性衰老模型的公共 RNA-seq 数据中分析 *FUS* 表达量，发现细胞复制性衰老后 *FUS* 均出现了显著的下调（图 3），因此我决定对它在细胞衰老过程中的作用进行探究。

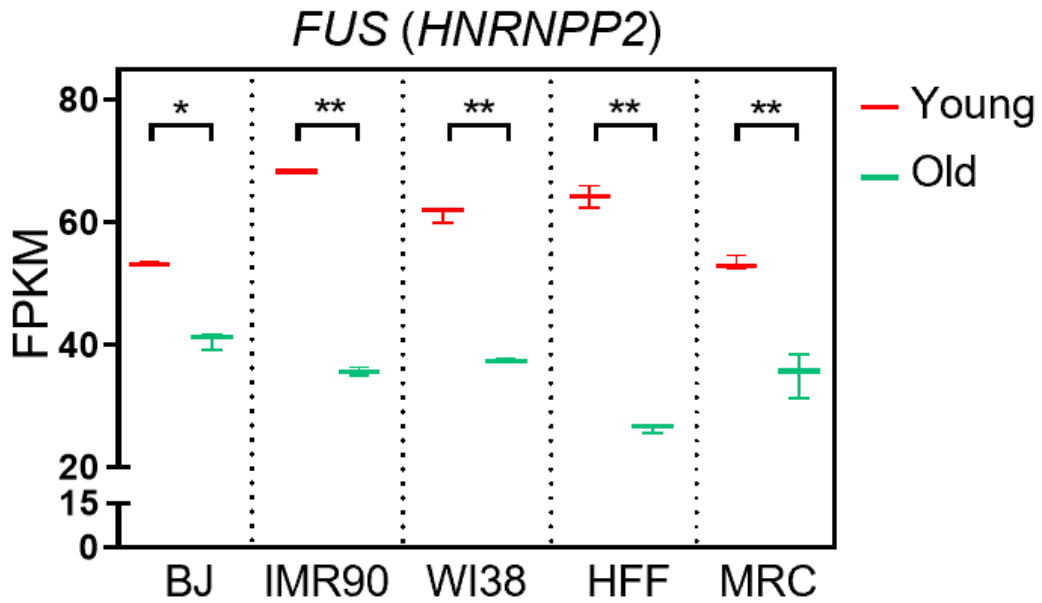


图 3 *FUS* 在复制性衰老细胞中表达下降

图中展示出 *FUS* 在 5 种复制性衰老体系（BJ、IMR90、WI38、HFF、MRC）中的表达量（以 FPKM 值表示）。红色为年轻时间的细胞，绿色为衰老时间点的细胞，每个时间点三个生物学重复，*代表 $p < 0.05$ ，**代表 $p < 0.01$ (t -test)

3.1 敲低 *FUS* 可以诱导细胞衰老

为了验证 *FUS* 对细胞衰老的调控作用，我们分别使用两条不同的小发夹 RNA（small hairpin RNA, shRNA）对 A549 细胞中的 *FUS* 进行了敲低并验证了多种细胞衰老表型（图 4）。敲低 *FUS* 之后，qRT-PCR 检测敲低效率分别达到了 80%和 85%（图 4A），Western Blot（WB）检测蛋白水平也显著下降（图 4B），说明两条 shRNA 均很好地降低了 A549 细胞中 *FUS* 蛋白表达水平。与对照组相比，敲低 *FUS* 后 CCK8 检测细胞增殖速率显著减缓（图 4C），处于 G1 期的细胞比例明显升高（图 4D），SA- β -Gal 染色后变蓝细胞明显增多（图 4E、F），这些结果都证明了敲低 *FUS* 可以明显地引起 A549 细胞衰老。

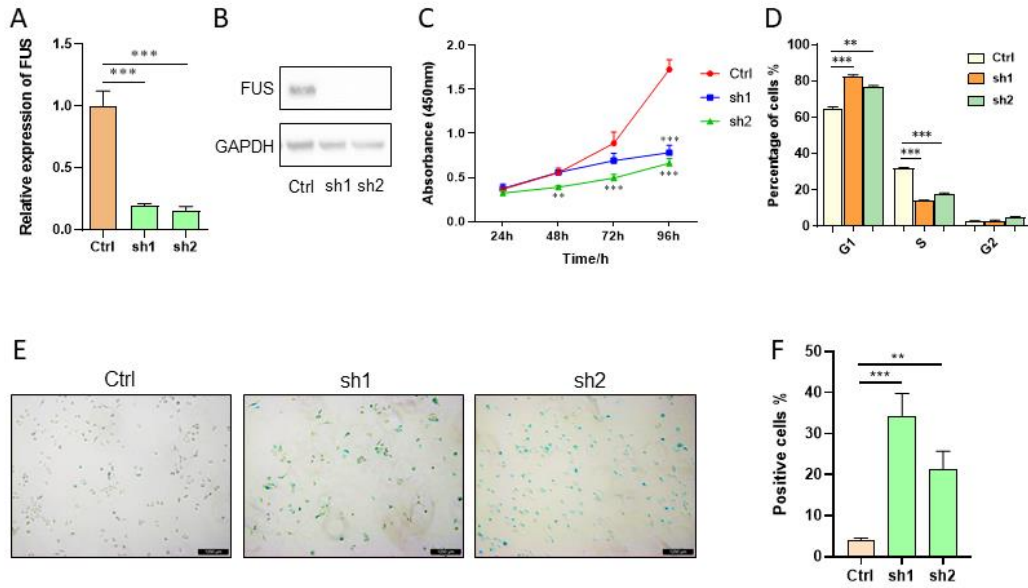


图 4 敲低 FUS 引起 A549 细胞出现衰老相关表型

A, qRT-PCR 检测 A549 中 FUS 的敲低效率; B, Western blot 检测敲低 FUS 前后 FUS 的蛋白表达水平, GAPDH 为内参; C, CCK-8 检测敲低 FUS 前后的细胞增殖活力; D, 流式细胞术检测敲低 FUS 前后的细胞周期变化, 使用碘化丙啶(propidium iodide, PI) 进行染色; E, A549 细胞中敲低 FUS 前后的 SA-β-Gal 染色结果; F, 定量统计 E 中的蓝色阳性细胞所占比例。Ctrl 代表对照组, sh1 和 sh2 代表两条靶向 FUS 的 shRNA, **代表 $p < 0.01$, ***代表 $p < 0.001$, 三次技术重复 (t -test)

同样地, 我们在 HUVEC 细胞中使用同样的两条 shRNA 重复了对 FUS 的敲低实验 (图 5)。qRT-PCR 检测两组敲低效率均超过了 75% (图 5A), WB 检测蛋白水平也显著下降 (图 5B), 说明两条 shRNA 也都可以很好地敲低 HUVEC 细胞中 FUS 蛋白表达水平。与对照组相比, 敲低 FUS 后 CCK8 检测细胞增殖速率显著减缓 (图 5C), 处于 G₁ 期的细胞比例明显升高 (图 5D), SA-β-Gal 染色后变蓝细胞明显增多 (图 5E、F), 这些结果也都证明了敲低 FUS 可以明显地引起 HUVEC 细胞衰老。

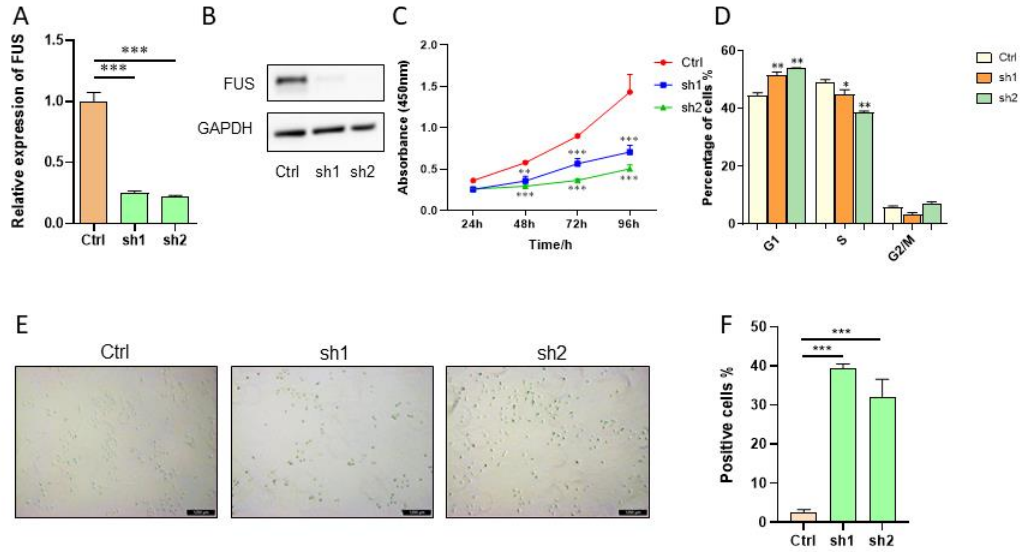


图 5 敲低 FUS 引起 HUVEC 细胞出现衰老相关表型

A, qRT-PCR 检测 HUVEC 中 FUS 的敲低效率; B, Western blot 检测敲低 FUS 前后 FUS 的蛋白表达水平, GAPDH 为内参; C, CCK-8 检测敲低 FUS 前后的细胞增殖活力; D, 流式细胞术检测敲低 FUS 前后的细胞周期变化, 使用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 进行染色; E, HUVEC 细胞中敲低 FUS 前后的 SA-β-Gal 染色结果; F, 定量统计 E 中的蓝色阳性细胞所占比例。Ctrl 代表对照组, sh1 和 sh2 代表两条靶向 FUS 的 shRNA, *代表 $p < 0.05$, **代表 $p < 0.01$, ***代表 $p < 0.001$, 三次技术重复 (t -test)

引言中提到, FUS 是 hnRNP 家族的重要一员, hnRNP 家族蛋白最常见的调控基因表达方式就是调控可变剪接和 APA, 而 FUS 在调控 APA 方面的功能尤其突出, 因此我们提出假设, 敲低 FUS 可以引起细胞衰老的原因是 FUS 可以通过控制某种或某几种基因的正常 APA 过程来保证细胞周期正常进行, 从而抑制细胞衰老。

3.2 筛选 FUS 的下游基因

为了进一步研究敲低 FUS 引发细胞衰老的深入机制, 实验室博士生丁冬师姐在敲低 FUS 后进行了 RNA-seq 文库的构建。由实验室博士生余鹏师兄通过得到的 RNA-seq 数据对细胞中 APA 事件进行了分析: 利用 DaPars 工具分析每个基因“远端 poly(A)位点的使用比例变化 (change in Percentage of Distal poly(A) site Usage Index, Δ PDUI)”, 以此为横坐标, 设置 $|\Delta$ PDUI = 0.1 的阈值, 以 P 值的对数为纵轴, 设置 $P = 0.05$ 的阈值, 画出火山图 (图 6A、B)。在 A549 中 (图 6A), 3' UTR 变长的基因, 即远端 pA 位点使用比例变多的基因有 408 个 (图中红色的点), 3' UTR 变短的基因有 750 个 (图中绿色的点); 在 HUVEC 中 (图

6B), 3' UTR 变长基因有 576 个 (图中红色的点), 3' UTR 变短的基因有 511 个 (图中绿色的点), 这说明在 A549 和 HUVEC 中敲低 FUS 都可以引起下游基因全局性 APA 的改变。通过对这些基因进行 KEGG 通路富集分析, 我和合作者发现在 A549 细胞中, 很多基因富集在了细胞周期和 p53 信号通路等细胞衰老相关通路 (图 6C); 在 HUVEC 细胞中, 很多基因富集在细胞凋亡和 ER 中蛋白合成等细胞衰老相关通路中 (图 6D)。这些结果提示我们 FUS 可以影响众多基因的 APA 过程, 而且这些基因可能参与调控细胞增殖、细胞衰老等生物学过程。

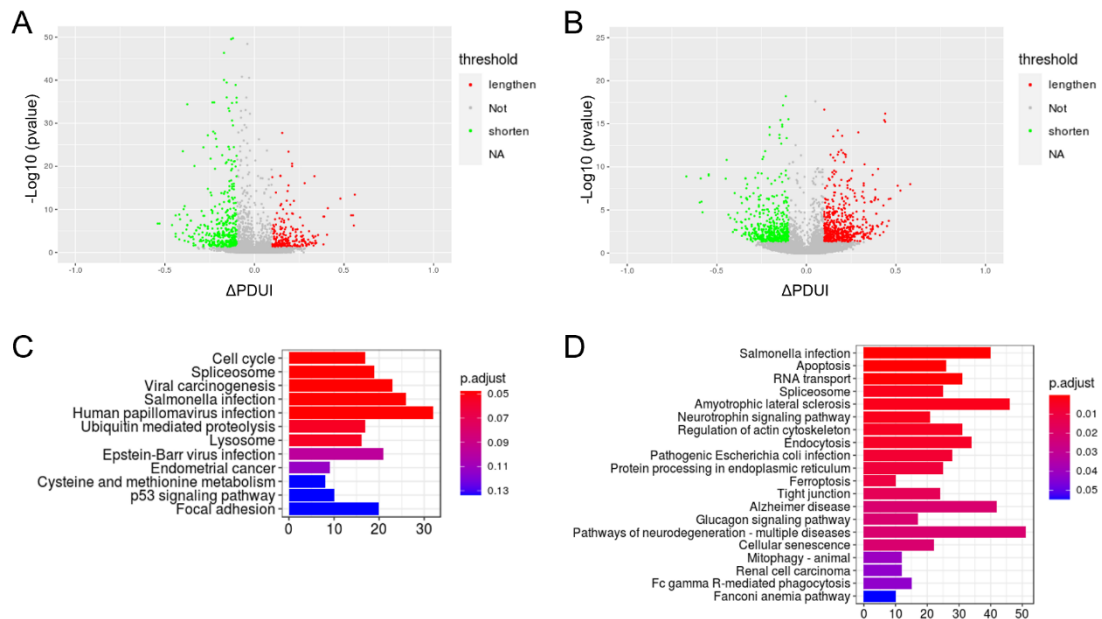


图 6 敲低 FUS 的 APA 和 KEGG 通路富集分析

A, 火山图展示敲低 FUS 后 A549 细胞中全局性 APA 的变化情况, 横坐标为 $\Delta PDUI$, 纵坐标为 p 值的对数, 绿色点代表 3' UTR 变短的基因, 红色点代表 3' UTR 变长的基因; B, 火山图展示敲低 FUS 后 HUVEC 细胞中全局性 APA 的变化情况; C, 对 A549 细胞中 APA 显著变化的基因进行 KEGG 的富集分析结果; D, 对 HUVEC 细胞中 APA 显著变化的基因进行 KEGG 的富集分析结果

为了进一步探究 FUS 介导的 APA 与细胞衰老之间的关系, 我们需要寻找 FUS 下游可能调控的靶基因。我们希望找到发生 APA 的靶基因至少符合以下几个条件: 1) 该基因的 $\Delta PDUI$ 在 FUS 敲低后有变化; 2) 根据 POSTAR2 中的 CLIP 数据, FUS 应在发生 APA 的 3' UTR 上有结合位点。通过筛选我们找到了多个基因完全满足以上条件。将测序数据转化为可视化文件后, 我们在 IGV 中搜索相应基因观察感兴趣的 3' UTR 区域, 选出变化明显的基因作为候选。以下展示其中四个基因的可视化结果, 敲低 FUS 后, 位于远端和近端 pA 位点之间的序列表

达水平明显升高（图 7），这说明这些基因的 APA 很可能是受 FUS 调控的。值得注意的是，敲低 FUS 后，*CCNA2* 和 *AAGAB* 两个基因的 3'UTR 变化情况更加明显，所以首选这两个基因作为关键候选基因进行深入研究。

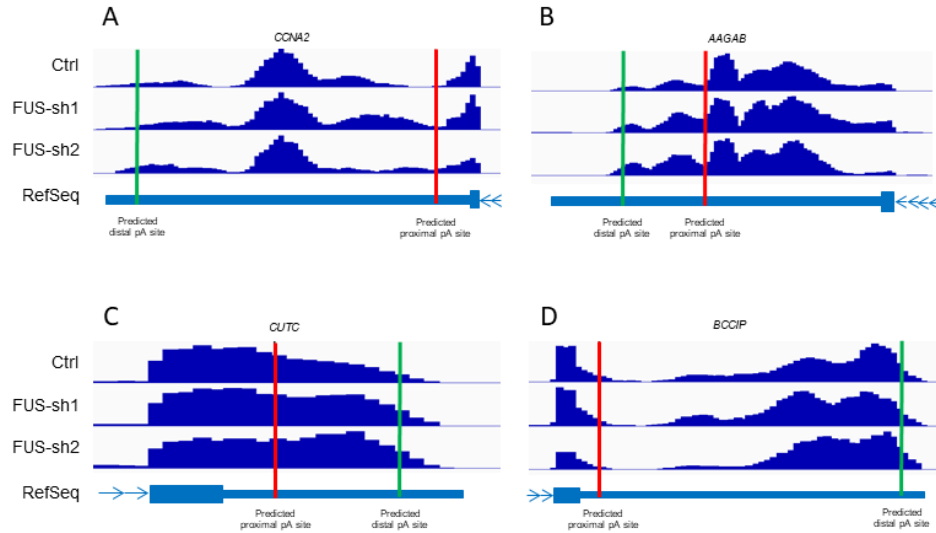


图 7 数据分析敲低 FUS 引起 *CCNA2* 和 *AAGAB* 的 APA 改变

A, 可视化图展示在 A549 细胞中敲低 FUS 前后 *CCNA2* 的 APA 情况；B, 可视化图展示在 A549 细胞中敲低 FUS 前后 *AAGAB* 的 APA 情况；C, 可视化图展示在 A549 细胞中敲低 FUS 前后 *CUTC* 的 APA 情况；D, 可视化图展示在 A549 细胞中敲低 FUS 前后 *BCCIP* 的 APA 情况；Ctrl 代表对照组，FUS-sh1 和 FUS-sh2 分别代表使用两条靶向 FUS 的 shRNA 的敲低组，RefSeq 为 Human hg19 参考基因组，红色直线指出预测的近端 pA 位点，绿色直线指出预测的远端 pA 位点

3.3 下游基因的 APA 受 FUS 调控

找到候选基因后，我们通过 3' RACE PCR 和 qRT-PCR 进一步实验验证了 FUS 可以调控它们的 APA 过程（图 8）。我们针对 *CCNA2* 和 *AAGAB* 在近端 pA 位点前面设计了不同的前引物来进行 3' RACE 实验（图 8A），与对照组相比，敲低 FUS 后 *CCNA2* 产生的带较长 3' UTR 的 mRNA 明显变多，而带较短 3' UTR 的 mRNA 明显变少（图 8B）。qRT-PCR 也检测出 *CCNA2* 同时拥有更长 3' UTR 的 mRNA 比例显著提高（图 8C）。同样的现象也发生在 *AAGAB* 基因上（图 8D、F）。这说明敲低 FUS 可以使 *CCNA2* 和 *AAGAB* 更倾向于使用远端 pA 位点。

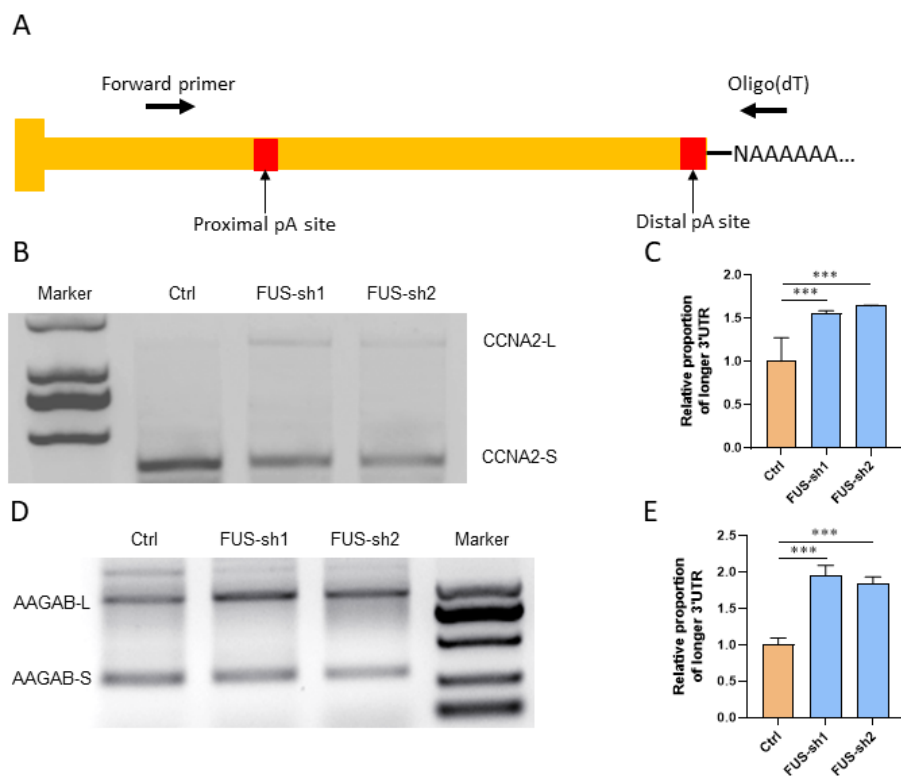


图 8 实验验证敲低 FUS 可以导致 CCNA2 和 AAGAB 的 APA 状态改变

A, 3' RACE PCR 的引物设计示意图, 根据不同基因设计不同的 Forward primer; B, 3' RACE PCR 检测敲低 FUS 前后 CCNA2 的 3' UTR 长度变化, CCNA2-L 代表 CCNA2 较长的 3' UTR 片段, CCNA2-S 代表 CCNA2 较短的 3' UTR 片段; C, qRT-PCR 检测敲低 FUS 前后 CCNA2 较长 3' UTR 的比例变化; D, 3' RACE PCR 检测敲低 FUS 前后 AAGAB 的 3' UTR 长度变化, AAGAB-L 代表 AAGAB 较长的 3' UTR 片段, AAGAB-S 代表 AAGAB 较短的 3' UTR 片段; E, qRT-PCR 检测敲低 FUS 前后 AAGAB 较长 3' UTR 的比例变化。Ctrl 代表对照组, sh1 和 sh2 代表两条靶向 FUS 的 shRNA, ***代表 $p < 0.001$, 三次技术重复 (t -test)

3.4 敲低 CCNA2 可以诱导细胞衰老

CCNA2 是一个经典的细胞周期蛋白, 此前已经被报道过与细胞衰老有关: 在小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中敲低 CCNA2 后可以诱导细胞衰老, 而回补外源的 CCNA2 基因可以明显延缓衰老^[41]。因此, 我们尝试在 A549 细胞中敲低 CCNA2 来检测是否能够发生衰老表型 (图 9)。qRT-PCR 检测两组敲低效率均超过了 60% (图 9A) 说明这两条 shRNA 可以较好地敲低 A549 细胞中 CCNA2 的表达水平。与对照组相比, 敲低 CCNA2 后 CCK8 检测细胞增殖速率显著减缓 (图 9B), SA- β -Gal 染色后变蓝细胞明显增多 (图 9C、D), 这些结果都证明了敲低 CCNA2 可以明显地引起 A549 细胞衰老。CCNA2 可能是 FUS 与细胞衰老之间的桥梁, FUS 通过调节 CCNA2 的 APA 来控制 CCNA2 的表达水平, 进而调

控细胞增殖正常进行。

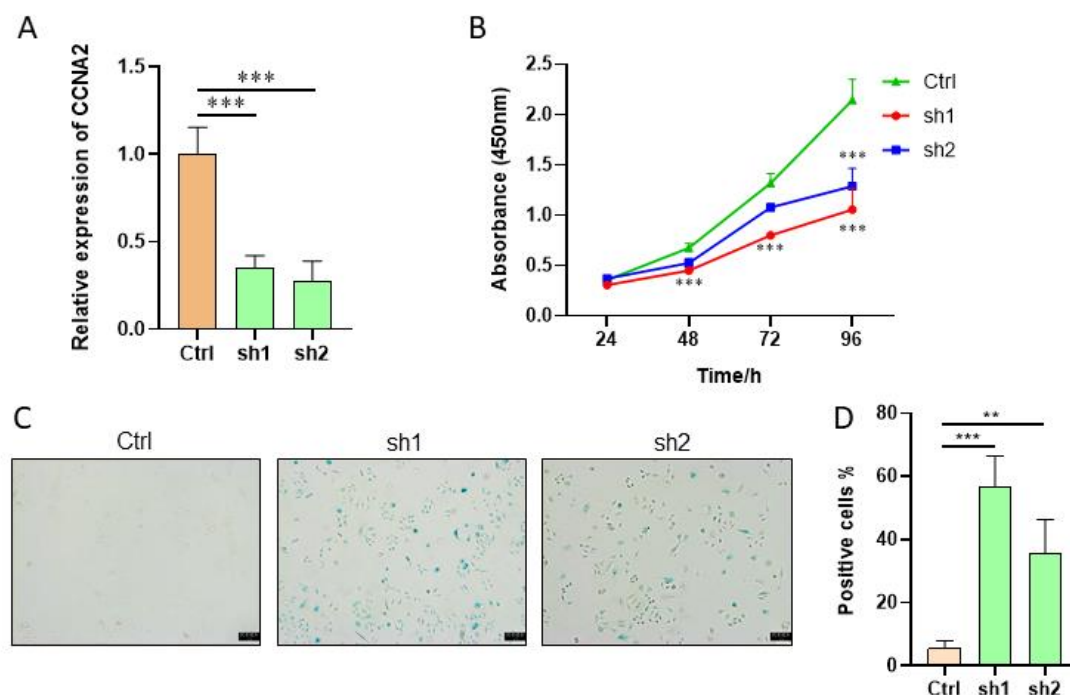


图 9 敲低 CCNA2 引起 A549 细胞出现衰老相关表型

A, qRT-PCR 检测 A549 中 CCNA2 的敲低效率; B, CCK-8 检测敲低 CCNA2 前后的细胞增殖活力; C, A549 细胞中敲低 CCNA2 前后的 SA-β-Gal 染色结果; D, 定量统计 C 中的蓝色阳性细胞所占比例。Ctrl 代表对照组, sh1 和 sh2 代表两条靶向 CCNA2 的 shRNA, **代表 $p < 0.01$, ***代表 $p < 0.001$, 三次技术重复 (t -test)

3.5 敲低 AAGAB 可以诱导细胞衰老

AAGAB 是参与到细胞内囊泡运输过程的一个辅助蛋白, 它与网格蛋白 (clathrin) 组装过程中接头蛋白 AP2 的活动相关, 在细胞内蛋白分泌、内吞等众多生理活动中发挥作用^[42]。目前对 AAGAB 的功能研究大多集中在点状掌跖角皮病 (Punctate Palmoplantar Keratoderma, PPK) 的疾病发生机制中, AAGAB 的缺失突变会导致家族性遗传病 PPK 的发生, 甚至可能引起癌症发生^[43]。尽管目前尚无明确证据证明 AAGAB 与细胞衰老有关, 但我们仍然进行了敲低实验检测部分衰老表型 (图 10)。我们在 A549 和 HUVEC 两个细胞系中都敲低了 AAGAB, 与对照组相比, 敲低 AAGAB 后 CCK8 检测细胞增殖速率显著减缓 (图 10A、B), SA-β-Gal 染色后变蓝细胞明显增多 (图 9C-F), 这些结果证明了敲低 AAGAB 可以引起 A549 和 HUVEC 两种细胞衰老。

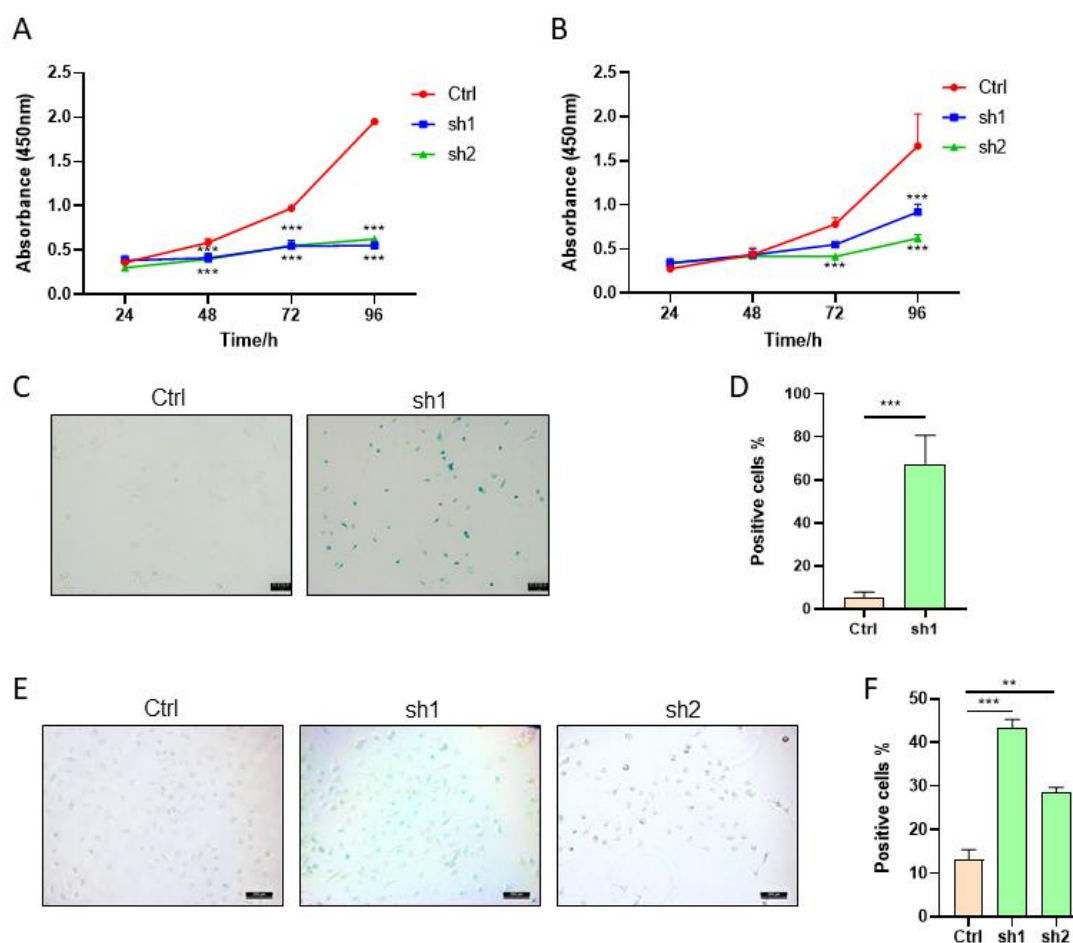


图 10 敲低 AAGAB 引起 A549 和 HUVEC 细胞均出现衰老相关表型

A, CCK-8 检测敲低 AAGAB 前后的 A549 细胞增殖活力; B, CCK-8 检测敲低 AAGAB 前后的 HUVEC 细胞增殖活力; C, A549 细胞中敲低 AAGAB 前后的 SA-β-Gal 染色结果; D, 定量统计 C 中的蓝色阳性细胞所占比例; E, HUVEC 细胞中敲低 AAGAB 前后的 SA-β-Gal 染色结果; F, 定量统计 E 中的蓝色阳性细胞所占比例。Ctrl 代表对照组, sh1 和 sh2 代表两条靶向 AAGAB 的 shRNA, **代表 $p < 0.01$, ***代表 $p < 0.001$, 三次技术重复 (t -test)

四、总结与讨论

在本课题中，我主要关注了 FUS 作为一种 RNA 结合蛋白对下游基因 APA 的调节和细胞衰老之间的关系。本课题从 FUS 在复制性衰老模型中均下调的公共数据出发，证明了敲低 FUS 可以导致明显的细胞衰老表型，并通过对敲低 FUS 前后细胞的 RNA-seq 数据进行 APA 分析筛选和实验验证的方式找到了两个关键的候选基因 *CCNA2* 和 *AAGAB*，发现它们的 APA 均受到 FUS 的调控，而且敲低它们也能引起细胞的衰老。遗憾受限于有限的实验时间，课题没有进展到更加细节的机制研究中，在此我提出几点关于课题结果的思考和未来可能可以继续进展的方向：

4.1 *CCNA2* 的 APA 变化趋势与表达水平变化趋势之间的不一致性

对于大部分基因通常而言，3' UTR 越长意味着有更多的 miRNA 的可能结合位点，往往会导致 mRNA 更不稳定^[44]。结果中提到，*CCNA2* 在 FUS 被敲低后会倾向于使用远端 pA 位点，转录具有更长的 3' UTR 的 mRNA，如果按照上述理论，*CCNA2* 的表达水平应该会在 FUS 被敲低后降低，但实际上在敲低 FUS 的细胞中进行的 qRT-PCR 显示 *CCNA2* 的表达水平有接近 3 倍的升高（图 11A）。为了解释这一矛盾，我们又在 293T 细胞中进行了双荧光素酶报告系统实验，发现插入长 3' UTR 的荧光素酶的荧光强度更高（图 11B），说明 *CCNA2* 更长的 3' UTR 会使 mRNA 翻译更多的蛋白，这也解释了为何 FUS 被敲低，*CCNA2* 的表达量反而上升。这一现象的可能原因是 *CCNA2* 的长 3' UTR 上并没有更多的 miRNA 结合位点，反而有更多的 RNA 结合蛋白的结合位点，这些蛋白可以帮助稳定 mRNA 的存在。

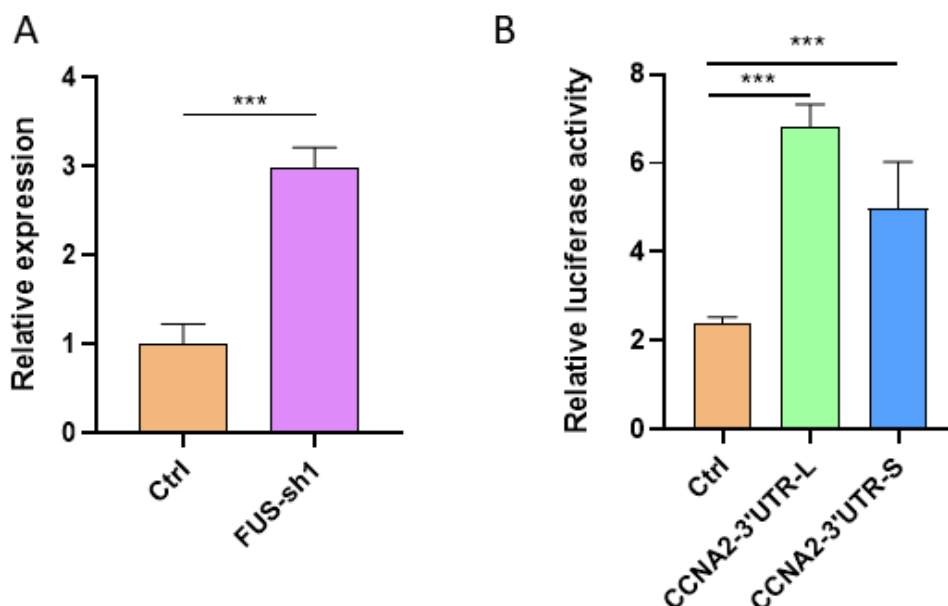


图 11 CCNA2 表达量异常变化的发现与解释

A, qRT-PCR 检测敲低 FUS 前后细胞中 CCNA2 表达量的变化; B, 双荧光素酶实验检测 CCNA2 长或短 3' UTR 对蛋白翻译的影响; CCNA2-3' UTR -L 代表在双荧光素酶报告质粒中插入较长的 3' UTR 序列, CCNA2-3' UTR -R 代表在双荧光素酶报告质粒中插入较短的 3' UTR 序列, ***代表 $p < 0.001$, 三次技术重复 (t -test)。

CCNA2 在 FUS 敲低的条件下表达量并不下降, 这提示我们可能在敲低 FUS 导致细胞衰老过程中的 CCNA2 是在高表达的状态下发挥作用的, 因此应该再进行过表达 CCNA2 后检测细胞衰老表型的实验, CCNA2 可能是表达量过低或过高都会影响细胞正常增殖的基因, 因此过表达 CCNA2 也应当预期可以看到细胞衰老的表型。

4.2 AAGAB 与细胞衰老相关通路的关系

AAGAB 是一个与细胞内囊泡运输相关的蛋白, 理论上与细胞衰老没有直接关系, 但是敲低 AAGAB 后细胞却出现了细胞衰老表型, 我在此给出一条推测的可能的通路, 即 AAGAB 下调可能会引发内质网胁迫(endoplasmic reticulum stress, ER stress), 内质网胁迫可以参与细胞衰老的调控, 它可以通过 p53 依赖的途径引起细胞衰老^[45]。AAGAB 参与分泌蛋白的胞吐过程, 因此当 AAGAB 低表达时, 分泌蛋白即便折叠好也无法被运输出去, 内质网中积聚大量蛋白, 影响了其正常功能, 进而出发细胞衰老乃至凋亡的相关通路。这也可以解释在实验过程中敲低了 AAGAB 的细胞很难培养, 培养基中有很多细胞碎片。由于很难收集到足够实验的细胞, 针对敲低 AAGAB 细胞只完成了 CCK8 和 SA- β -Gal 染色两种衰

老表型的检测（图 10）。

4.3 敲低 AAGAB 除了影响细胞生长状态还可能会影响细胞的形态

在 HUVEC 细胞中敲低了 AAGAB 之后，我们发现 HUVEC 细胞的形态发生了变化，主要体现在细胞平均体积变大，出现了更多的突出（图 12）。通常细胞体积变大意味着细胞将更多的能量用于生长而不是分裂，也就是说，细胞衰老可能可以通过抑制细胞增殖来使细胞形态发生这种变化。但是通过其他方式诱导衰老的 HUVEC 细胞没有如此明显的形态变化，因此 AAGAB 可能对细胞形态变化有其他尚不清楚的影响途径。

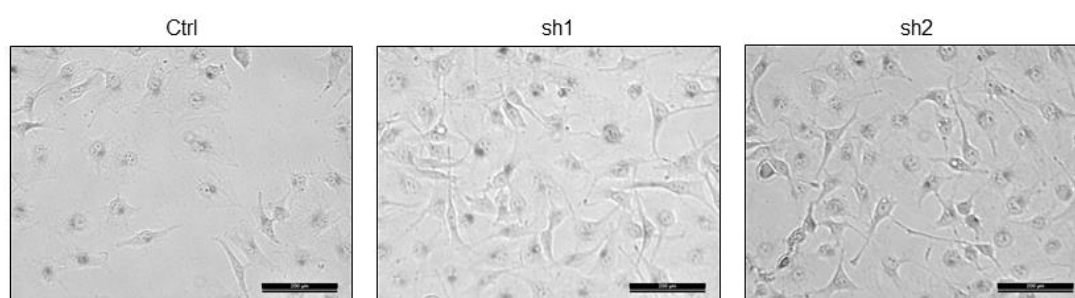


图 12 敲低 AAGAB 前后 HUVEC 细胞的形态

图中展示了敲低 AAGAB 前后 HUVEC 细胞的形态变化；Ctrl 代表对照组，sh1 和 sh2 代表使用两条靶向 AAGAB 的 shRNA 的敲低组

参考文献

1. Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. The hallmarks of aging[J]. *Cell*, 2013, 153(6), 1194-1217.
2. Hayflick, L., & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. *Experimental Cell Research*, 1961, 25(3), 585-621.
3. Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9), 729-740.
4. Campisi, J. Aging, cellular senescence, and cancer[J]. *Annu Rev Physiol*, 2013, 75, 685-705.
5. Munoz-Espin, D., & Serrano, M. Cellular senescence: from physiology to pathology[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(7), 482-496.
6. Kuilman, T., & Peeper, D. S. Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(2), 81-94.
7. Alder, J. K., et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(35), 13051-13056.
8. Minamino, T., et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance[J]. *Nat Med*, 2009, 15(9), 1082-1087.
9. Sone, H., & Kagawa, Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice[J]. *Diabetologia*, 2004, 48(1), 58-67.
10. Xue, W., et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas[J]. *Nature*, 2007, 445(7128), 656-660.
11. Baar, M. P., et al. Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging[J]. *Cell*, 2017, 169(1), 132-147 e116.
12. Baker, D. J., et al. Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan[J]. *Nature*, 2016, 530(7589), 184-189.
13. Ogrodnik, M., et al. Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis[J]. *Nat Commun*, 2017, 8, 15691.
14. Sachs, A. The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 1990, 2(6), 1092-1098.
15. Elkon, R., Ugalde, A. P., & Agami, R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function[J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(7), 496-506.
16. Di Giammartino, D. C., Nishida, K., & Manley, J. L. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation[J]. *Mol Cell*, 2011, 43(6), 853-866.
17. Sandberg, R., Neilson, J. R., Sarma, A., Sharp, P. A., & Burge, C. B. Proliferating Cells Express mRNAs with Shortened 3' Untranslated Regions and Fewer MicroRNA Target Sites[J]. *Science*, 2008, 320(5883), 1643.
18. Ni, T., et al. Distinct polyadenylation landscapes of diverse human tissues revealed

- by a modified PA-seq strategy[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14(1), 615.
19. Chen, M., et al. 3' UTR lengthening as a novel mechanism in regulating cellular senescence[J]. *Genome Res*, 2018.
20. Mayr, C., & Bartel, D. P. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells[J]. *Cell*, 2009, 138(4), 673-684.
21. Takagaki, Y., & Manley, J. L. Levels of Polyadenylation Factor CstF-64 Control IgM Heavy Chain mRNA Accumulation and Other Events Associated with B Cell Differentiation[J]. *Molecular Cell*, 1998, 2(6), 761-771.
22. Chan, S., Choi, E. A., & Shi, Y. Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2011, 2(3), 321-335.
23. Kubo, T., Wada, T., Yamaguchi, Y., Shimizu, A., & Handa, H. Knock-down of 25 kDa subunit of cleavage factor Im in Hela cells alters alternative polyadenylation within 3'-UTRs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(21), 6264-6271.
24. Zhu, H., Zhou, H. L., Hasman, R. A., & Lou, H. Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(4), 2203-2210.
25. Dreyfuss, G., Kim, V. N., & Kataoka, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(3), 195-205.
26. Geuens, T., Bouhy, D., & Timmerman, V. The hnRNP family: insights into their role in health and disease[J]. *Hum Genet*, 2016, 135(8), 851-867.
27. Patry, C., et al. Small Interfering RNA-Mediated Reduction in Heterogeneous Nuclear Ribonucleoparticle A1/A2 Proteins Induces Apoptosis in Human Cancer Cells but not in Normal Mortal Cell Lines[J]. *Cancer Research*, 2003, 63(22), 7679.
28. Qu, X. H., Liu, J. L., Zhong, X. W., Li, X. I., & Zhang, Q. G. Insights into the roles of hnRNP A2/B1 and AXL in non-small cell lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3), 1677-1685.
29. Gautrey, H., Jackson, C., Dittrich, A. L., Browell, D., Lennard, T., & Tyson-Capper, A. SRSF3 and hnRNP H1 regulate a splicing hotspot of HER2 in breast cancer cells[J]. *RNA Biol*, 2015, 12(10), 1139-1151.
30. Bekenstein, U., & Soreq, H. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 in health and neurodegenerative disease: from structural insights to post-transcriptional regulatory roles[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2013, 56, 436-446.
31. Calvio, C., Neubauer, G., Mann, M., & Lamond, A. I. Identification of hnRNP P2 as TLS/FUS using electrospray mass spectrometry[J]. *RNA*, 1995, 1(7), 724-733.
32. Kwiatkowski, T. J., Jr., et al. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Science*, 2009, 323(5918), 1205-1208.
33. Zhou, Z., Licklider, L. J., Gygi, S. P., & Reed, R. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome[J]. *Nature*, 2002, 419(6903), 182-185.
34. Imperatore, J. A., McAninch, D. S., Valdez-Sinon, A. N., Bassell, G. J., & Mihailescu, M. R. FUS Recognizes G Quadruplex Structures Within Neuronal mRNAs[J]. *Front Mol Biosci*, 2020, 7, 6.
35. Masuda, A., Takeda, J., & Ohno, K. FUS-mediated regulation of alternative RNA processing in neurons: insights from global transcriptome analysis[J]. *Wiley Interdiscip*

Rev RNA, 2016, 7(3), 330-340.

36. Ratti, A., & Buratti, E. Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins[J]. *J Neurochem*, 2016, 138 Suppl 1, 95-111.

37. Masuda, A., et al. Position-specific binding of FUS to nascent RNA regulates mRNA length[J]. *Genes & development*, 2015, 29(10), 1045-1057.

38. Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule[J]. *Neuron*, 2004, 43(4), 513-525.

39. Wang, Z., Lei, H., & Sun, Q. MicroRNA-141 and its associated gene FUS modulate proliferation, migration and cisplatin chemosensitivity in neuroblastoma cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5), 2943-2951.

40. Mastrocola, A. S., Kim, S. H., Trinh, A. T., Rodenkirch, L. A., & Tibbetts, R. S. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(34), 24731-24741.

41. Xu, S., et al. The p53/miRNAs/Ccna2 pathway serves as a novel regulator of cellular senescence: Complement of the canonical p53/p21 pathway[J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3), e12918.

42. Gulbranson, D. R., et al. AAGAB Controls AP2 Adaptor Assembly in Clathrin-Mediated Endocytosis[J]. *Dev Cell*, 2019, 50(4), 436-446 e435.

43. Elhaji, Y., et al. AAGAB Mutations in 18 Canadian Families With Punctate Palmoplantar Keratoderma and a Possible Link to Cancer[J]. *J Cutan Med Surg*, 2020, 24(1), 28-32.

44. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2), 215-233.

45. Kim, H. S., Kim, Y., Lim, M. J., Park, Y.-G., Park, S. I., & Sohn, J. The p38-activated ER stress-ATF6 α axis mediates cellular senescence[J]. *The FASEB Journal*, 2018, 33(2), 2422-2434.

致谢

四年时光如白驹过隙，2017 年那个踩着夏天最后一抹晚霞第一次来到上海的男孩仿佛就在昨天，成长就这样不期而至，如今即将穿上学士服的我又一次站在了人生的十字路口，虽然仍然不知道上一次选择来到复旦大学的决定是否正确，但是我万分感谢在复旦遇到的所有人，经历的所有事。

首先感谢写这篇毕业论文的指导老师，倪挺老师。第一次见到倪挺老师是在大一下学期的一门新生讨论课上，尽管我从刚进入大学时就确定想要分流进生命科学学院，这门课依然是我第一次系统地去研读生物科研论文。这门课上倪老师渊博的知识和开阔的视野都让我获益匪浅，因此当分流之后选择实验室实习时我第一时间想到了倪老师。现在回看，进入倪老师课题组开启了我本科阶段最值得铭记的一段回忆。倪老师不仅仅在科研方面给我指导，他的为人处世更加值得我学习。倪老师对待学生们温柔随和，总是保持谦逊的态度，面对问题不骄不躁，跟着倪老师做课题好像永远不会遇到解决不了的困难。

其次非常感谢丁冬师姐，从大二刚进 NiLab 开始就是她一直带着我做实验，让我从一个从来没接触过 RNA 实验的小白变成一个也可以独当一面的老手。即便是师姐在紧锣密鼓准备毕业事务时，当我课题进展上遇到什么困难，她也会第一时间帮我想办法。谨在此祝愿师姐毕业顺利，往后工作顺心，一切如意。

此外，非常感谢我的父母和家人，当我远在 800 公里之外的异乡求学时，他们一直是我坚实的后盾，总是无条件支持我做出的每一个选择。大学四年除了疫情学期之外再没有长时间留在家陪一陪家人总让我很遗憾，祝愿我的亲人身体健康，万事顺意。

感谢复旦生涯遇到的所有师长、同学和朋友们，与他们的相遇是我四年的幸运。尤其感谢我的三位室友和一位荣誉室友，陪我一起熬夜爆肝、一起吃喝玩乐、一起憧憬未来；感谢蔡亮老师和一起参加 iGEM 比赛的队友们，我们一起度过了实验室里最快乐最难忘的一段时光；感谢 NiLab 的所有师兄师姐，带我一起快乐实验，让我体会到了一个实验室所能拥有的最轻松最和谐的氛围；感谢大一刚入学时认识的山东同学们，我们一起在三教刷夜，一起为彼此庆祝生日，一起交流

各自的问题和快乐；感谢 17 级生科院的辅导员和各位同学，作为在生命科学科研道路上并肩而行的战友，你们让我不再迷茫；感谢 17 级自科六班的刘导和同学们，能够成为六班班长是我整个本科阶段一切努力的开始，是你们让我有了可以面对后面问题的信心；感谢复旦大学足球协会的朋友们，永远难忘和你们在这里踢球、执法比赛的日子；感谢复旦大学红十字会的同学们，你们不仅教会我急救技能，也让我之后的道路永远记得善良和感恩；感谢生科院团学联的老师、学长、学姐们，你们给我的鼓励和帮助让我不断勇敢前进；感谢一哥、艺哥、朱哥、超哥、赖狗、骚哥、苗姐、杜哥、胡哥、LC、梓曷、洪狗、罗执导、二张、卢学姐、晓康、郑队长、余鹏师兄、白云师姐、陈宇师姐、海静师姐、杨宇师兄……要感谢的人太多太多，有了你们，我的复旦生活值得一生回味，行将分别，愿我们都有光明的未来。

除了复旦校园里的同学朋友们，我还要感谢陪我一路成长的发小和高中同学。感谢发小们，或为我树立榜样，或与我互相鼓励，或鞭策我继续前进，愿我们友谊地久天长。感谢高中同学们，尽管我们散落全国各地，但是彼此间的联系总能让我充满亲切，特别感谢兜哥、炮哥和鸡爷，祝愿你们考研或工作或毕业顺利，永远充满对生活的热情，当你们一世朋友。

言尽于此，情不能申。以此文为我本科生涯划上句号，愿我永葆对科研的兴趣和热情，在这条路上坚定勇敢地走下去。