

復旦大學

本科毕业论文（设计）



论文题目：IRF4 调控线粒体功能的机制探究

姓 名：王佳蕾

学 号：21300700012

院 系：生命科学学院

专 业：生物科学（强基计划）

指导教师：李晋

职 称：研究员

单 位：复旦大学生命科学学院

完成日期：2025 年 5 月 12 日

IRF4 调控线粒体功能的机制探究

完成人

王佳蕾

指导小组成员

李晋 研究员

目 录

摘 要	I
Abstract	II
一、前 言	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 干扰素调节因子家族	1
1.1.2 干扰素调节因子 4 的结构和功能	1
1.1.3 线粒体的结构和功能	3
1.1.4 干扰素调节因子 4 调控线粒体功能	4
1.2 研究目的和意义	5
二、材料与方法	6
2.1 材料与试剂	6
2.1.1 主要实验试剂与抗体	6
2.1.2 引物序列汇总	8
2.2 仪器与软件	8
2.2.1 主要实验仪器	8
2.2.2 实验软件	9
2.3 实验方法	9
2.3.1 贴壁细胞培养	9
2.3.2 原代脂肪前体细胞的分离培养	9
2.3.3 原代脂肪前体细胞的诱导分化	10
2.3.4 免疫荧光实验	10

2.3.5 总蛋白提取	10
2.3.6 免疫印迹实验	10
2.3.7 总 RNA 提取.....	11
2.3.8 实时荧光定量逆转录 PCR.....	11
2.3.9 邻近连接实验	11
2.3.10 分子克隆	12
2.3.11 荧光素酶报告基因实验.....	13
2.3.12 数据分析	13
三、研究结果.....	14
3.1 内源性 IRF4 蛋白定位于线粒体中	14
3.2 外源性 IRF4 蛋白定位于线粒体中	16
3.3 IRF4 调控线粒体基因组的转录.....	18
四、讨 论.....	21
参考文献.....	22
致 谢.....	24

摘要

干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, IRF4) 是转录因子家族 IRFs 的成员之一，它在病毒、细菌和干扰素诱导的信号通路以及先天性和适应性免疫过程的调节中发挥着至关重要的作用。尽管 IRF4 最初被认为只在免疫细胞中特异性表达，但是近期也有许多研究发现 IRF4 同样可以在脂肪细胞和肌细胞中表达，且可以在调节代谢相关基因表达的同时，参与调控线粒体功能来影响机体的能量代谢。不过目前对于 IRF4 调控线粒体功能的机制尚未进行系统探索。本研究中，我们通过体内外研究模型，利用免疫荧光和免疫印迹等实验，发现 IRF4 定位于不同类型的组织和细胞的细胞核和线粒体中。此外，邻近连接实验、染色质免疫共沉淀和荧光素酶报告基因实验等结果表明，IRF4 可以直接与线粒体 DNA 结合，调控线粒体基因组的转录活性，从而影响线粒体功能。总而言之，这些结果不仅阐明了 IRF4 调控线粒体功能的潜在机制，而且为研究核基因组与线粒体基因组之间的潜在关联提供了重要参考。

关键词：干扰素调节因子，转录因子，细胞核，线粒体

Abstract

Interferon regulatory factor 4 (IRF4) is a nuclear transcription factor which belongs to the interferon regulatory factor family. It is vital for the regulation of viral, bacterial, and interferon-induced signaling pathways and innate and adaptive immune processes. Although it was originally described as immune cell-specific, data accumulated indicates that IRF4 is also expressed in adipocytes and myocytes and regulates mitochondrial function while regulating the expression of metabolism-related genes. However, the mechanisms of how IRF4 regulates the activities of mitochondria have not been systemically explored. Here, this work identified that IRF4 localized in both nucleus and mitochondria in various types of tissue and cells in vivo and ex vivo by using immunofluorescence and western blot. Besides, the results of proximity ligation assay, chromatin immunoprecipitation and luciferase assay showed that IRF4 could directly bind to the mitochondrial DNA to regulate its transcription. These facts not only elucidate the potential mechanism of IRF4 regulating mitochondrial function, but offer a new perspective on the association between nuclear and mitochondrial genomes.

Key words: interferon regulatory factors, transcription factors, nucleus, mitochondria

一、前言

1.1 研究背景

1.1.1 干扰素调节因子家族

第一个 IRF 家族的成员 IRF1 于 1998 年首次被人类发现。到现在为止，已经在人类细胞中鉴定出 9 个 IRF 成员，即 IRF1-IRF9，它们在病毒、细菌和干扰素 (interferon, IFN) 诱导的信号通路以及先天性和适应性免疫过程的调节中至关重要^[1,2]。

IRF 家族中，每个 IRF 的 N 端一般会含有一个由约 120 个氨基酸组成的 DNA 结合域 (DNA-binding domain, DBD)，可以识别与 IFN 刺激反应元件 (IFN-stimulated response element, ISRE) 对应的 DNA 序列^[3]。而 IRFs (除 IRF1 和 IRF2) 的 C 端携带 IRF 关联域 (IRF-association domain, IAD)，介导和家族其它成员，或其它转录因子家族成员之间的相互作用^[2]。尽管不同的 IRFs 之间结构相似，但由于其细胞类型特异性表达、转录激活潜能以及与其它转录因子间的互作等因素的不同，最终导致了 IRFs 之间相似又区别的功能与作用。

1.1.2 干扰素调节因子 4 的结构和功能

不同于 IRF 家族中其它转录因子的是，IRF4 并非由 I 型或 II 型 IFN 调控，而是通过激活免疫相关的淋巴样细胞中的受体，从而在 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、巨噬细胞和树突状细胞中特异性表达^[4]，在免疫细胞的发育、分化和细胞命运决定中发挥重要作用^[5]。

IRF4 由三个结构域组成 (图 1.1): 高度保守的 N 端 DBD、可变的 C 端 IAD 和中间连接结构域^[6] (intermediate linker domain, ILD)。一方面，IRF4 结合 ISREs 激活干扰素刺激基因；另一方面，IRF4 与多种 DBD 互作形成转录复合物，发挥对应的转录调节功能。然而，含有 IRF4 的转录复合物的形成在很大程度上取决于靶细胞的类型，并参与调控不同的功能。例如，IRF4 和信号传导与转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 协同激活 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白 1 (B lymphocyte-induced maturation protein 1, Blimp-1)，促进滤泡辅助性 T 细胞的分化^[7]。IRF4 还可以结合 B 细胞激活转录因子维持细胞

毒性 T 细胞的效应功能^[8]。



图 1.1 IRF4 结构示意图^[6]

然而，近期许多研究发现，IRF4 可能不仅是免疫系统中的关键一环，还在人体代谢稳态中“身兼多职”。有研究表明，在 IRF4 缺失的脂肪细胞中，编码脂肪甘油三酯脂肪酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 和激素敏感脂肪酶 (hormone-sensitive triglyceride lipase, HSL) 的基因表达下降，且由异丙肾上腺素刺激的脂肪分解减少。相反，在诱导分化的小鼠前脂肪细胞系 3T3-L1 中过表达 *Irf4* 基因，异丙肾上腺素刺激的脂肪分解显著增强，并且增加了 HSL 和 ATGL 的基因的表达^[9]。进一步通过荧光素酶报告基因实验研究发现，IRF4 与编码 ATGL 的基因上游区域预测到的 ISRE 结合位点结合诱导基因表达，从而调控脂肪分解^[9]。另外，棕色脂肪细胞可以利用解耦联蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 消耗大量底物（如脂肪酸等）以产热，从而消耗能量。从转录水平上看，转录因子过氧化物酶体增植物激活受体 γ 共激活剂 1- α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α , PGC-1 α) 可以共同激活过氧化物酶体增植物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptor, PPAR) PPAR γ 和 PPAR α ，分别促进棕色脂肪细胞的分化和脂肪酸氧化分解功能。而已有研究发现，IRF4 在小鼠的棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 中，可以与 PGC1- α 结合，诱导产热基因 *Ucp1* 表达上升^[10]，能量消耗增加以耐寒（图 1.2 左）。BAT 中 IRF4 的缺失，还会诱导肌源性基因表达，影响线粒体功能、核糖体蛋白合成和肌肉中的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号，从而降低骨骼肌的运动能力^[11]（图 1.2 右）。这些研究均表明 IRF4 的调控作用并非仅局限于炎症、肿瘤等，而是与肥胖、糖尿病等代谢异常同样息息相关。

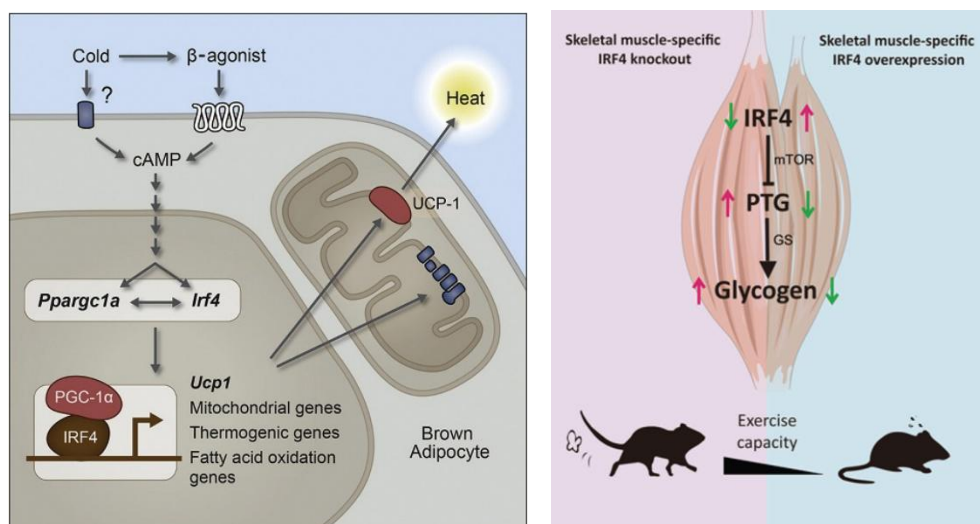


图 1.2 IRF4 影响产热^[10]（左）和运动能力^[12]（右）的机制示意图

1.1.3 线粒体的结构和功能

线粒体是双层膜结构，外膜光滑，内膜折叠形成嵴，两层膜之间是膜间隙，线粒体基质则位于内膜包裹的内部空间。线粒体是细胞中的“能量工厂”，其在细胞中的数量与分布与细胞类型密切相关。在大多数细胞中，线粒体均匀分布；而在一些细胞中，线粒体多集中于代谢较为活跃的区域，以便更充分地提供腺嘌呤核苷三磷酸（adenosine triphosphate, ATP）以维持生理功能，如肌细胞的肌纤维中。

线粒体是真核细胞中的一类重要细胞器。线粒体中的三羧酸（tricarboxylic acid, TCA）循环（图 1.3）不仅是糖、蛋白质和脂质三大物质的联络与转化的枢纽，而且可以通过氧化磷酸化为生物体大量供能，以维持正常的生理活动^[13]。另外，线粒体作为半自主细胞器，除了受到核基因组的调控，还拥有独立转录和表达少量自身特有的蛋白质的能力以行使其特殊功能。因此，线粒体的功能障碍可能会与越来越多的常见疾病密切相关，如神经退行性疾病、肥胖等^[14]，对线粒体功能的调控机制研究也愈发受到广泛的关注。

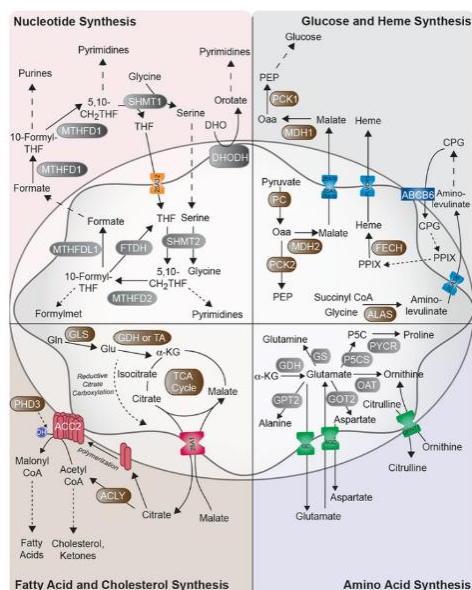


图 1.3 线粒体中的生物合成途径^[15]

调节线粒体功能的因素有很多。一方面，温度等环境因素可能通过与交感神经系统的相互作用影响线粒体的活动。另一方面，由于线粒体自身可以表达几种关键的功能蛋白，所以线粒体基因组的转录活性也参与调控线粒体功能^[16]。在可能调节线粒体基因组转录活性的蛋白质中，线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 被广泛认为是直接结合线粒体 DNA 的转录因子^[17]。此外，肿瘤抑制蛋白 P53 曾被报道可以通过与线粒体伴侣蛋白 CHCHD4 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4) 相互作用而定位于线粒体中^[18]。

1.1.4 干扰素调节因子 4 调控线粒体功能

线粒体作为脂质代谢的重要场所，脂质代谢过程中的物质合成与分解、能量消耗与利用等均与线粒体功能的调控密不可分。有研究表明，在棕色或米色脂肪细胞中，线粒体中表达的 UCP1 蛋白，可以使 ATP 合成与氧化磷酸化解耦连，将能量以热量的形式释放，实现非颤抖的适应性产热，从而通过调节能量的平衡来应对温度和饮食的变化^[19]。那么，如何人为调控线粒体功能，从而缓解或逆转代谢紊乱显得尤为重要。事实上，在上述的几项关于 IRF4 调控机体代谢的研究中，都有观察到 IRF4 在调节代谢相关基因表达^[20]的同时，其过表达或缺失都会影响细胞内线粒体的功能，如线粒体基因组转录和能量消耗情况等（图 1.4），如线粒体内基因表达情况及线粒体中氧气消耗和二氧化碳生成情况等。这可能说明，转录因子 IRF4 有可能通过调控线粒体 DNA 的转录表达，从

而影响线粒体的功能。

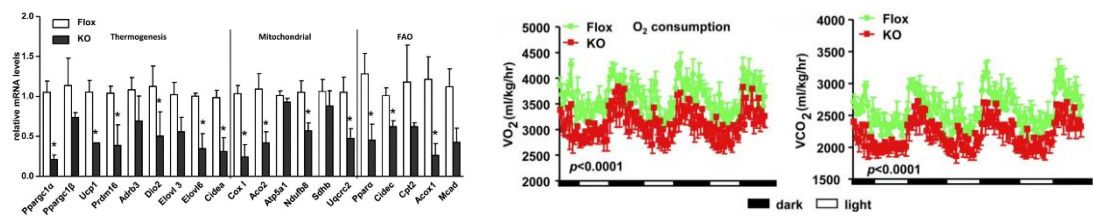


图 1.4 IRF4 调控线粒体功能^[10]

左图：高脂饮食喂养 22 周后的对照组小鼠或 BAT 中特异性敲除 *Irf4* 基因的小鼠 BAT 中产热、线粒体和脂肪酸氧化基因的表达情况；右图：高脂饮食喂养 22 周后的对照组小鼠或 BAT 中特异性敲除 *Irf4* 基因的小鼠的氧气消耗率和二氧化碳产率

1.2 研究目的和意义

现有的研究已经报道了 IRF4 和线粒体各自调控生物体物质和能量代谢的可能性，也暗示了 IRF4 的表达会影响线粒体的功能，却始终缺乏具体可行的实验验证和背后的机制探究。

而通过进一步验证 IRF4 调控线粒体功能，及其背后的具体机制探究，一方面，有助于完善已有的对 IRF4 调控代谢途径的线索链的缺失；另一方面，或将有利于研究核基因组与线粒体基因组之间的关联，为更加深入地研究线粒体的功能及特征进行铺垫。更重要的是，IRF4 也许会成为人为调控线粒体功能，以缓解相关代谢紊乱疾病的重要靶点。

所以，本研究将首先通过建立体外研究模型，通过免疫荧光和免疫印迹实验在不同类型的组织和细胞中探究 IRF4 的定位表达情况。然后，本研究将通过邻近连接实验、染色质免疫共沉淀和荧光素酶报告基因实验探索 IRF4 调控线粒体功能的可能机制。总的来说，我们希望能借此研究不断完善对于 IRF4 调控线粒体功能的认识，并为探究细胞核和线粒体之间的相互作用提供重要的理论参考。

二、材料与amp;方法

2.1 材料与试剂

2.1.1 主要实验试剂与抗体

表 2.1 主要实验试剂

试剂名称	生产厂家	货号
1X PBS 缓冲液	武汉赛维尔生物科技有限公 司	G4202
0.05% Trypsin-EDTA	赛默飞世尔科技公司	25300062
DMEM 高糖培养基	赛默飞世尔科技公司	11965092
胎牛血清	Biological Industries	04-001-1A
Penicillin-Streptomycin	赛默飞世尔科技公司	10378016
胶原酶 D	霍夫曼·罗氏公司	11088858001
牛血清白蛋白	生工生物工程（上海）股份 有限公司	A602449
ACK Lysing Buffer	赛默飞世尔科技公司	A1049201
胰岛素	MedChemExpress	HY-P0035
IBMX	MedChemExpress	HY12318
dexamethasone	MedChemExpress	HY-14648
rosiglitazone	MedChemExpress	HY-17386
4%多聚甲醛	武汉赛维尔生物科技有限公 司	G1101
TritonX-100	生工生物工程（上海）股份 有限公司	A110694
Hoechst 33342 染液	翌圣生物科技（上海）股份 有限公司	40732ES03
NP40	上海碧云天生物技术股份有 限公司	P0013F
Protease Inhibitor Cocktail	APExBIO Technology LLC	K1007
Phosphatase Inhibitor Cocktail	APExBIO Technology LLC	K1015
Cell Fractionation Kit	Abcam	ab109719

ECL 显影液	武汉赛维尔生物科技有限公司	G2014
Trizol	赛默飞世尔科技公司	15596018CN
氯仿	国药集团药业股份有限公司	10006818
异丙醇	国药集团药业股份有限公司	40064360
75%乙醇	国药集团药业股份有限公司	80176961
5×PrimeScript Mix	宝生物工程（大连）有限公司	RR037A
TB Green Premix EX Taq II	宝生物工程（大连）有限公司	RR420B
ROX Reference Dye II	宝生物工程（大连）有限公司	RR420B
NaveniFlex™ Cell MR 试剂盒	Navinci	NC.MR.100.Red
CutSmart	New England Biolabs	B6004V
<i>Mlu</i> I	New England Biolabs	R0538S
<i>Xho</i> I	New England Biolabs	R0146S
GeneJET Gel Extraction Kit	赛默飞世尔科技公司	K0691
ClonExpress® II One Step Cloning Kit	南京诺唯赞生物科技股份有限公司	C112
双荧光素酶报告基因检测试剂盒	上海碧云天生物技术股份有限公司	RG027

表 2.2 抗体使用汇总

抗体名称	生产厂家	货号
IRF4 Monoclonal antibody	武汉三鹰生物技术有限公司	66451-1-Ig
TOM20 Rabbit pAb	爱博泰克生物科技有限公司	A6774
Rabbit Anti-GAPDH Antibody	翌圣生物科技（上海）股份有限公司	30202ES
RCC1 Monoclonal antibody	武汉三鹰生物技术有限公司	67335-1-Ig
β-Actin Rabbit mAb	爱博泰克生物科技有限公司	AC048
Anti-Flag -HRP	GNI 集团有限公司	GNI4310-FG-S
β-Tubulin Rabbit mAb	爱博泰克生物科技有限公司	A12289

Histone H3 Rabbit mAb	爱博泰克生物科技有限公司	A22348
Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	艾比玛特生物医药（上海） 有限公司	M21002S
IgG H&L (Alexa Fluor® 647)	Abcam	ab150079
IgG H&L (Alexa Fluor® 488)	Abcam	ab315184

2.1.2 引物序列汇总

表 2.3 引物序列汇总表

引物名称	引物序列
β -Actin-F	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
β -Actin-R	CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>IRF4</i> -F	CCTACACCATGACAACGCCT
<i>IRF4</i> -R	CTGTCACCTGGCAACCATT
HSP-F	aggtaccgagctcttacgcgtCAATACAACCCC CGCCCA
HSP-R	atgcagatcgagatctcgagATTTGTTTATGG GGTGATGTGAGC
LSP-F	aggtaccgagctcttacgcgtATTAGTAGTATGG GAGTGGGAGGG
LSP-R	atgcagatcgagatctcgagTTCTGGCCACAG CACTTAAACA

2.2 仪器与软件

2.2.1 主要实验仪器

表 2.4 主要实验仪器

仪器名称	生产厂家
移液器	德国艾本德股份公司
LABGARD CLASS II 生物安全柜	NUAIRE
DK-8AXX 电热恒温水槽	青岛明博环保科技有限公司
5804 R 冷冻离心机	德国艾本德股份公司
EVOS FL 细胞显微成像系统	赛默飞世尔科技公司
激光共聚焦显微镜	日本奥林巴斯株式会社
混合型冷冻研磨仪	上海必横生物科技有限公司
MIKRO 200 高速冷冻离心机	海蒂诗国际集团

TS-100 水平轨道摇床	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
恒温混匀金属浴	奥盛集团有限公司
QB-128 旋转培养器	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
WIX-EP300 电泳仪	韦克斯科技
化学发光成像系统	上海勤翔科学仪器有限公司
VORTEX-5 涡旋震荡仪	海门市其林贝尔仪器制造有限公司
微量光度计	深圳科瑞技术股份有限公司
T100 型热循环 PCR 仪	赛默飞世尔科技公司
QuantStudio 3-实时荧光定量 PCR 仪	赛默飞世尔科技公司
高性能多功能微孔板检测仪	美国伯腾仪器有限公司

2.2.2 实验软件

表 2.5 实验软件

软件名称	开发公司
Microsoft Excel	微软股份有限公司
ImageJ	National Institutes of Health
GraphPad Prism	GraphPad Software 公司

2.3 实验方法

2.3.1 贴壁细胞培养

细胞培养过程中全部操作于生物安全柜中进行，所用试剂和耗材全部无菌。DMEM 高糖培养基中添加 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素溶液。培养箱环境为 37℃、5% CO₂。细胞传代时，弃去培养皿中原先的培养基，用 1 mL 1X PBS 缓冲液清洗后，加入 1 mL 0.05%胰蛋白酶，于 37℃下消化 2-3 min，然后加入 1 mL DMEM 高糖培养基终止消化，220 rcf 离心 3 min，弃上清。取适量培养基重悬后的细胞悬液于培养皿中培养。

2.3.2 原代脂肪前体细胞的分离培养

使用 7-8 周龄的野生型 C57BL/6J 雄鼠提取原代脂肪源血管基质组分 (stromal vascular fraction, SVF) 细胞。对小鼠实施安乐死后，取小鼠两侧皮下脂肪组织放入装有 10 mg/mL 胶原酶 D (10 mg/mL BSA 溶液配置) 溶液的 2 mL 离心管中，剪碎后转移至金属浴中，37℃，750 rpm 震荡消化 3 h。消化后的组织液用 DMEM 高糖培养基经 100 μm 细胞筛过滤，然后室温，800 rpm 离心 5 min。弃上清，使用 10 mg/mL BSA 溶液 (1X PBS 缓冲液配置) 重悬后再次室温，800 rpm 离心 5 min。弃上清，加入 1 mL ACK Lysing Buffer 重悬，室温静置 5 min

后，再次 800 rpm 离心 5 min。弃上清，加入 10 mg/mL BSA 溶液重悬后，经 40 μ m 细胞筛过滤，然后室温，800 rpm 离心 5 min。弃上清，使用培养基重悬，并接种至 100 mm 培养皿中，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中培养。

2.3.3 原代脂肪前体细胞的诱导分化

原代脂肪前体细胞生长至汇合度约 80%左右，经 1X PBS 缓冲液洗涤后，加入 1 mL 0.05%胰蛋白酶，于 37℃培养箱中消化 3 min，然后加入 1 mL DMEM 高糖培养基终止消化，220 rcf 离心 3 min，弃上清。使用培养基重悬后，将细胞接种在 24 孔板中，置于 37℃，5% CO₂ 培养箱中过夜培养。第二天加入使用培养基配置的分化试剂（5 mg/mL insulin, 1:1000; 250 mM IBMX, 1:500; 1 mM dexamethasone, 1:1000; 1 mM rosiglitazone, 1:1000）第一次诱导分化。培养 48 h 后，加入培养基配置的 5 mg/mL insulin（1:1000）第二次诱导分化。再次培养 48 h 后，可收样进行后续实验。

2.3.4 免疫荧光实验

组织或细胞样品使用 1X PBS 缓冲液润洗，然后依次使用 4%多聚甲醛溶液室温固定 15 min，0.1% TritonX-100 溶液透化处理 5 min，5% BSA 溶液室温封闭 30 min，“一抗”4℃孵育过夜，“二抗”和 Hoechst 33342 溶液室温避光孵育 1 h，最后利用激光共聚焦显微镜进行荧光观察。

2.3.5 总蛋白提取

对于小鼠的组织样本，取黄豆大小的组织于 2 mL 离心管中，加入适量 NP40 蛋白裂解液（加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂）和小钢珠，利用组织破碎仪将组织研磨至混悬液；对于细胞样本，加入适量 NP40 蛋白裂解液后，置于 4℃摇床上孵育 20 min，用枪头刮取细胞后，将细胞悬液转移至 1.5 mL 离心管中。然后 4℃，12000 rpm 离心 20 min，取上清，加入 5X 上样缓冲液，100℃金属浴孵育 10 分钟，置于-20℃备用。

2.3.6 免疫印迹实验

配置 12% SDS-PAGE 凝胶后，上样，加入电泳缓冲液，以 60 V，30min→110 V，1 h 20 min 进行电泳。取出凝胶后，按“三明治”结构组装好转膜装置，加入转膜缓冲液，220 mA 转膜 1.5 h。转膜结束后，按目的蛋白分子量裁膜，依次进行 5% BSA 溶液室温摇床封闭 1 h、“一抗”4℃摇床孵育过夜、TBST 缓

冲液（加入 2 mL Tween-20）洗膜 30 min、“二抗”室温孵育 1 h、TBST 洗膜 30 min，滴加 ECL 发光液，利用化学发光成像系统进行曝光显影。

2.3.7 总 RNA 提取

对于小鼠的组织样本，取绿豆大小的组织于 2 mL 离心管中，加入 1 mL Trizol 和小钢珠，利用组织破碎仪将组织研磨至混悬液；对于细胞样本，直接加入 1 mL Trizol。然后加入 200 μ L 氯仿，涡旋震荡后，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 20 min，取上层液体转移至新的 1.5 mL 离心管中，加入等体积异丙醇，上下颠倒 10 次混匀。冰上静置 30 min 后，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 15 min，弃上清。加入 500 μ L 预冷后的 75%乙醇，吹打混匀，4 $^{\circ}$ C，12000 rpm 离心 5 min，弃上清。干燥 10 min 后，加入适量无酶水，将沉淀全部溶解，配置反转录反应体系（表 2.6），并进行反转录程序（表 2.7），反转录得到的 cDNA 产物保存于-20 $^{\circ}$ C 备用。

表 2.6 反转录反应体系

试剂名称	质量或体积
RNA 样品	500 ng
5X PrimeScript Mix	2 μ L
无酶水	补至 10 μ L

表 2.7 反转录反应程序

温度	时间
37 $^{\circ}$ C	15 min
85 $^{\circ}$ C	5 s
4 $^{\circ}$ C	∞

2.3.8 实时荧光定量逆转录 PCR

取稀释 5 倍后的 cDNA 样品 1 μ L，加入上下游引物和 ROX 溶液各 0.2 μ L，并加入 2X SYBR Mix 溶液 5 μ L，加入无酶水 3.4 μ L，配置成 RT-qPCR 体系后，点样，上机，运行程序。

2.3.9 邻近连接实验

细胞爬片，待生长至 50%汇合度时，使用 1X PBS 溶液润洗，然后依次使用 4%多聚甲醛溶液室温固定 15 min，0.1% TritonX-100 溶液透化处理 5 min，1X Block 溶液 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 1 h，“一抗”4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，稀释后的“Navenibody M1”和“Navenibody R2”于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 1 h，稀释后的 Enzyme 1 于 37 $^{\circ}$ C 中培养箱中孵育 30 min，稀释后的 Enzyme 2 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中

避光孵育 90 min，稀释后的 Hoechst 33342 溶液染核 5 min，最后利用激光共聚焦显微镜进行荧光观察。

2.3.10 分子克隆

质粒 pGL3-Promoter 购买于生物风国际生物试剂物流中心。Luciferase 报告基因质粒 HSP_pGL3-promoter 和 LSP_pGL3-promoter 经分子克隆获得。

(1) 如下（表 2.8）所示制备线性化载体

表 2.8 双酶切体系配置

组分	体积
pGL3-promoter	1 µg
CutSmart	5 µL
<i>Mlu</i> I	1 µL
<i>Xho</i> I	1 µL
ddH ₂ O	up to 50 µL

混匀后，金属浴中 37℃ 酶切 4 h。

(2) 冰上配置 PCR 扩增体系(表 2.9), 并进行对应的 PCR 反应程序(表 2.10)

表 2.9 PCR 扩增体系配置

组分	体积
ddH ₂ O	up to 50 µL
2X Phanta Max Master Mix	25 µL
上游引物 (10 µM)	2 µL
下游引物 (10 µM)	2 µL
cDNA	5 µL

表 2.10 PCR 反应程序设置

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	3 min	1 cycle
变性	95℃	15 s	
退火	56~72℃	15 s	35 cycles
延伸	72℃	1 min/kb	
彻底延伸	72℃	5 min	1 cycle

(3) 线性化载体和插入片段的胶回收纯化

配置 1%琼脂糖凝胶后，上样，设置程序为 150 V、20 min 进行电泳。电泳完成后，成像，并切出目的条带，转移至 1.5 mL EP 管中。使用 GeneJET Gel

Extraction Kit 进行胶回收。用分光光度计测量胶回收产物浓度。

(4) 如下(表 2.11) 所示配置重组反应体系

表 2.11 重组反应体系配置

组分	体积
线性化载体	100 ng
插入片段	10 ng
5X CE II Buffer	4 μ L
Exnase II	2 μ L
ddH ₂ O	up to 20 μ L
混匀后, 金属浴中 37℃ 反应 30 min。	

(5) 重组产物转化

冰上解冻感受态细胞 DH5 α , 然后取 5 μ L 重组产物加入到 50 μ L 感受态细胞中, 轻轻混匀。冰上静置 30 min 后, 42℃ 金属浴热激 90 s, 立即置于冰上冷却 5 min。取适量重组产物涂布于氨苄抗性的平板上, 置于 37℃ 培养箱中倒置培养过夜。

(6) 重组产物鉴定

挑单克隆进行菌落 PCR 鉴定, 然后挑取 PCR 鉴定为阳性的菌落, 将剩余的菌液接种至含有氨苄抗性的液体 LB 培养基中培养过夜, 取 1 mL 菌液送测序。

2.3.11 荧光素酶报告基因实验

使用报告基因细胞裂解液室温裂解细胞后, 15000 g 离心 5 min, 取上清, 加入萤火虫荧光素酶检测试剂, 使用高性能多功能微孔板检测仪测定化学发光, 然后加入海肾荧光素酶检测工作液, 再次检测化学发光。

2.3.12 数据分析

数据以平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SEM) 表示, 两组之间采用 unpaired t-test 检验。*表示 $p < 0.05$; **表示 $p < 0.01$; ***表示 $p < 0.001$; ****表示 $p < 0.0001$ 。

三、研究结果

3.1 内源性 IRF4 蛋白定位于线粒体中

IRF4 是核转录因子家族 IRFs 的成员之一，多在核内表达，但目前也有研究表明在不同品系的小鼠棕色脂肪组织的线粒体蛋白质组学数据库中，同样可以鉴定到 IRF4 蛋白的存在^[21]。那么，IRF4 对线粒体功能的调控作用是否与其细胞核或线粒体的定位相关呢？基于此，我们首先在小鼠的棕色脂肪组织中，探究了内源性 IRF4 蛋白的定位表达情况。通过免疫荧光实验，我们发现 IRF4 蛋白与线粒体外膜转位酶 20 蛋白 (translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20) 存在共定位 (图 3.1 左)。另外，通过分离小鼠棕色脂肪组织中的非线粒体组分和线粒体组分并进行免疫印迹实验，我们可以观察到，当成功分离两个组分后，即线粒体蛋白 TOMM20 仅存在于线粒体组分中，而细胞质蛋白甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 主要存在于非线粒体组分中时，IRF4 蛋白在两个组分中均有表达 (图 3.1 右)。

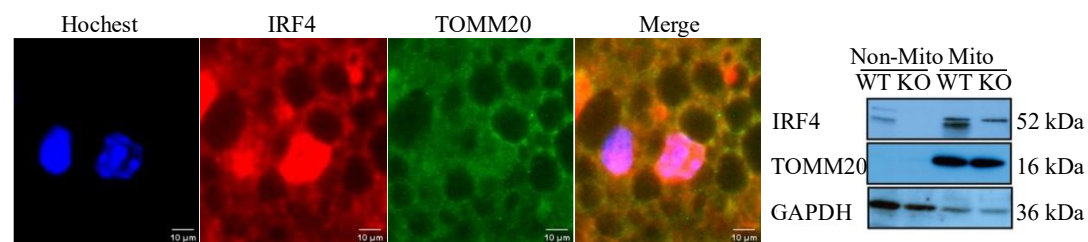


图 3.1 小鼠棕色脂肪组织中 IRF4 蛋白的定位表达情况

左图：小鼠棕色脂肪组织的免疫荧光染色结果，细胞核用 Hoechst 33342 染色；

右图：对小鼠棕色脂肪组织分离得到的非线粒体组分 (Non-Mito) 和线粒体组分 (Mito) 进行免疫印迹分析。WT，野生型小鼠；KO，*Irf4* 基因全身敲除小鼠

另外，在由小鼠肩胛间棕色脂肪组织分化而来的棕色脂肪细胞中，我们发现 IRF4 蛋白同样与 TOMM20 蛋白存在共定位 (图 3.2 左)。不仅如此，在进一步分离了棕色脂肪细胞的细胞核、细胞质和线粒体组分后，即细胞核蛋白染色体凝缩调节因子 1 (regulator of chromosome condensation 1, RCC1) 仅存在于细胞核组分中，而线粒体蛋白 TOMM20 仅存在于线粒体组分中时，IRF4 蛋白依然在细胞核和线粒体中均有表达 (图 3.2 右)。

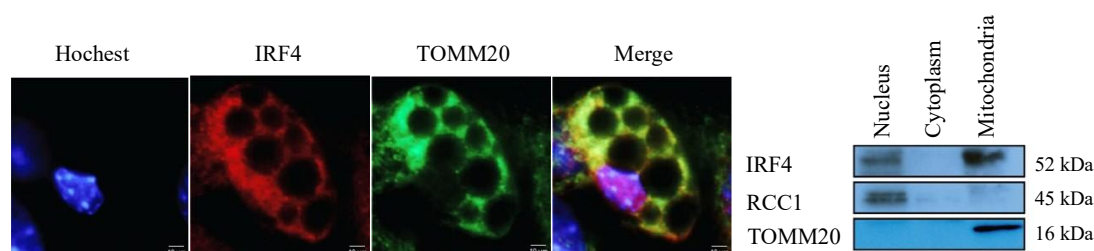


图 3.2 小鼠棕色脂肪组织分化而来的棕色脂肪细胞中 IRF4 蛋白的定位表达情况

左图：小鼠棕色脂肪组织分化而来的棕色脂肪细胞的免疫荧光染色结果，细胞核用 Hoechst 33342 染色；右图：对小鼠棕色脂肪组织分化而来的棕色脂肪细胞分离得到的细胞核组分 (Nucleus)、细胞质组分 (Cytoplasm) 和线粒体组分 (Mitochondria) 进行免疫印迹分析

很有意思的一点是，我们发现内源性 IRF4 蛋白的线粒体定位并不局限于脂肪细胞这一类型的细胞中，在免疫相关的脾细胞和 RAW264.7 细胞（小鼠单核巨噬细胞白血病细胞）中，该结论同样成立（图 3.3）。这说明 IRF4 蛋白的线粒体定位在不同的组织和细胞中是相对保守的。

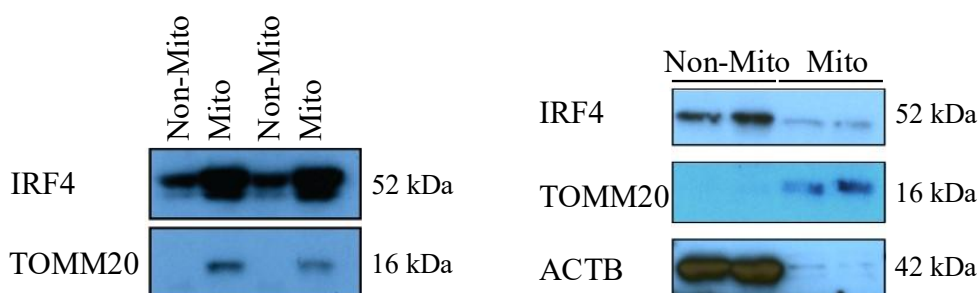


图 3.3 免疫相关细胞中 IRF4 蛋白的定位表达情况

左图：对脾细胞分离得到的非线粒体组分 (Non-Mito) 和线粒体组分 (Mito) 进行免疫印迹分析；右图：对 RAW264.7 细胞分离得到的非线粒体组分 (Non-Mito) 和线粒体组分 (Mito) 进行免疫印迹分析

除此之外，我们还进一步利用胰蛋白酶消化实验探究了 IRF4 蛋白在线粒体中的具体定位。结果表明，即使 TOMM20 蛋白消失（意味着线粒体外膜被消化），线粒体内膜蛋白 CHCHD3 逐渐被暴露，但是我们始终可以观察到 IRF4 蛋白的表达，这说明 IRF4 可能定位于线粒体基质中（图 3.4）。

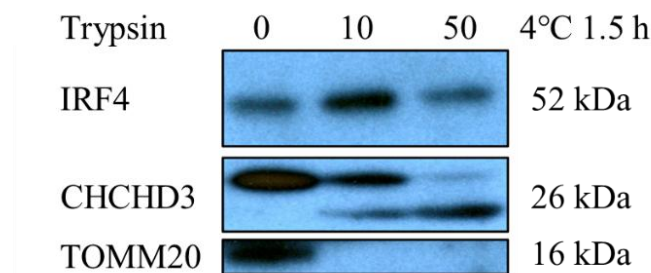


图 3.4 胰蛋白酶消化实验的免疫印迹分析

3.2 外源性 IRF4 蛋白定位于线粒体中

在验证了内源性 IRF4 蛋白的细胞核和线粒体定位后，我们还利用 HeLa 细胞来探究外源性 IRF4 蛋白的定位和表达情况。HeLa 细胞是人宫颈癌细胞，也是常见的工具细胞，以此来构建体外研究模型，不仅可以在人的细胞系中进一步验证 IRF4 蛋白的定位，而且也有利于实验的开展。

所以，我们首先基因合成了对照组质粒 pcDNA3.1(+)和实验组质粒 Flag-IRF4_pcDNA3.1(+)质粒（图 3.5），并利用 PEI 转染法在 HeLa 细胞中过表达了带有 Flag 标签的人源 *IRF4* 基因。

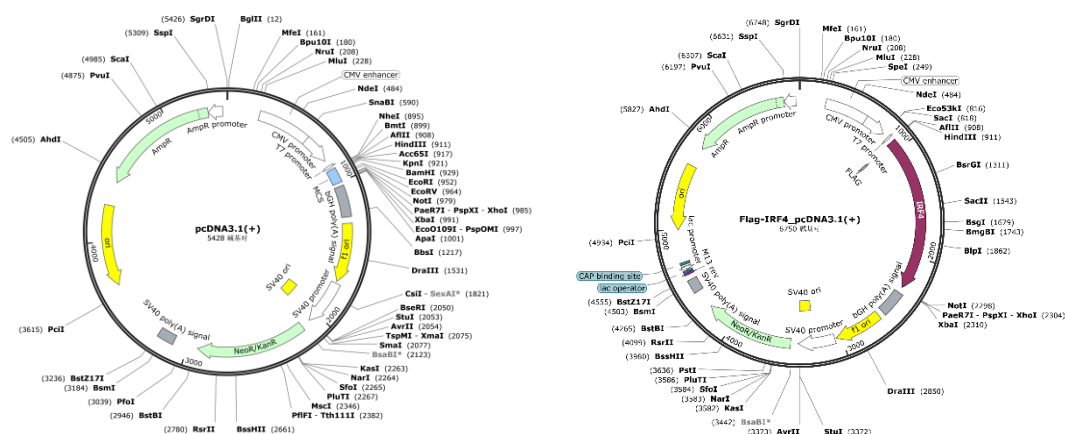


图 3.5 pcDNA3.1(+)（左）和 Flag-IRF4_pcDNA3.1(+)（右）质粒图谱

接下来，我们使用实时荧光定量逆转录 PCR 和免疫印迹实验检测了 HeLa 细胞中外源 *IRF4* 基因的过表达情况，来验证体外研究模型的构建成功与否。研究结果如图 3.6 所示，无论是从转录水平，还是从蛋白表达水平来看，Flag-IRF4 的过表达水平均显著高于对照组（图 3.6）。上述结果表明，本研究中，HeLa 细胞中外源过表达人源 *IRF4* 基因的研究模型构建成功。

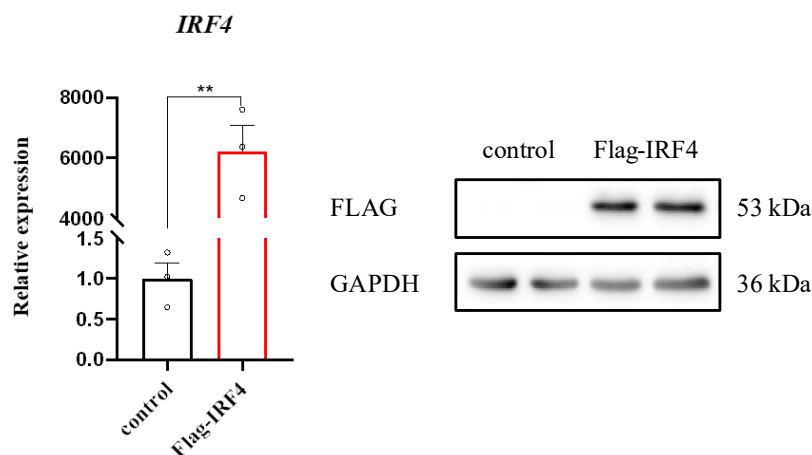


图 3.6 HeLa 细胞中 *IRF4* 基因的过表达效率验证

左图：HeLa 细胞中转染对照组质粒 pcDNA3.1(+) (control 组) 和转染实验组质粒 Flag-IRF4_pcDNA3.1(+) (Flag-IRF4 组) 的 *IRF4* mRNA 水平的 RT-qPCR 分析。数据归一化为 β -actin mRNA 水平, $n = 3$, unpaired t-test, $**p < 0.01$; 右图：HeLa 细胞中转染对照组质粒 pcDNA3.1(+) (control 组) 或转染实验组质粒 Flag-IRF4_pcDNA3.1(+) (Flag-IRF4 组) 的 Flag-IRF4 蛋白水平的免疫印迹分析

在此基础上, 我们验证了 HeLa 细胞中外源过表达的人源 IRF4 蛋白的细胞核和线粒体的定位表达。通过免疫荧光实验, 我们观察到 Flag-IRF4 蛋白与线粒体外膜蛋白 TOMM20 存在共定位 (图 3.7 左)。然后, 我们进一步分离了 HeLa 细胞的细胞核、线粒体和细胞质组分, 发现 IRF4 蛋白在三类组分中均有一定量的表达, 且在线粒体中的表达量并不低 (图 3.7 右)。上述结果表明, 无论是内源性的 IRF4 蛋白, 还是外源过表达的 IRF4 蛋白, 核转录因子 IRF4 都具有细胞核和线粒体的双重定位, 其在细胞质中完成翻译表达后, 除以往认知中的进入细胞核调控核基因的转录表达以外^[4], 还可以进入线粒体中, 且可能在线粒体中起特殊功能。

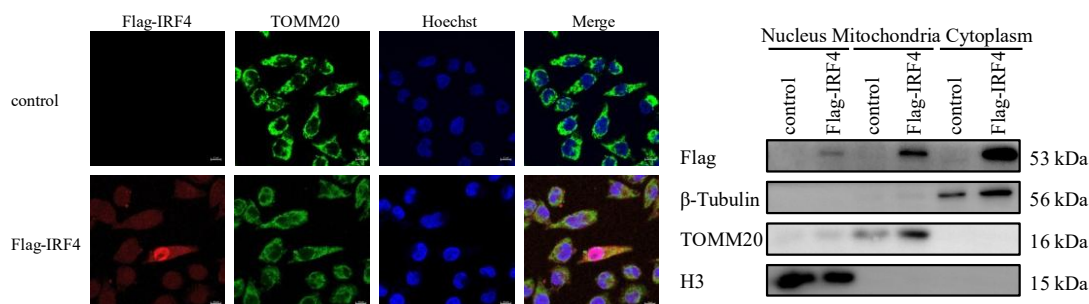


图 3.7 HeLa 细胞中 IRF4 蛋白的定位表达情况

左图：HeLa 细胞的免疫荧光染色结果, 细胞核用 Hoechst 33342 染色; 右图：对 HeLa 细胞分离得到的细胞核组分 (Nucleus)、线粒体组分 (Mitochondria) 和细胞质组分 (Cytoplasm) 进行免疫印迹分析。control 组, 转染对照组质粒 pcDNA3.1(+); Flag-IRF4 组, 转染实验组质粒 Flag-IRF4_pcDNA3.1(+)

3.3 IRF4 调控线粒体基因组的转录

综合前文的研究结果,我们发现核转录因子 IRF4 确实具有细胞核和线粒体的双重定位。那么 IRF4 进入线粒体之后,是如何发挥它的转录调控作用的呢?考虑到转录因子一般都具有 DNA 结合域,可以识别特定的 DNA 序列,并与之结合,来启动下游的转录调控;而线粒体作为半自主细胞器,同样拥有独立于核基因组之外的基因组。因此,我们猜测 IRF4 或许也可以直接与线粒体基因组结合,来启动转录调控,从而影响线粒体的功能。

含 ATPase 家族 AAA 结构域 3 蛋白 (AATPase family AAA domain-containing protein 3, ATAD3) 是已知的线粒体类核组装所必需的蛋白质,可以与线粒体基因组上的非编码区 D-loop 区结合^[22]。所以,如果 ATAD3 蛋白与 IRF4 存在共定位的话,那么在空间上,IRF4 应该同样可以有可能与线粒体基因组上的 D-loop 区结合。为了验证我们的假设,我们利用了邻近连接技术 (proximity ligation assay, PLA), 该技术通过特异性的一抗来识别并结合待研究的两个目的蛋白,再通过一段带有寡聚脱氧核苷酸的 PLA 探针识别并结合一抗。当两个目的蛋白在空间上相互靠近时,两个 PLA 探针就会互补配对并扩增,从而可以通过检测荧光信号的强弱来探究两个蛋白之间的共定位情况^[23]。基于此,我们发现相较于对照组 FLAG+ATAD3 而言,只有在 HeLa 细胞中外源过表达了 IRF4 蛋白,ATAD3 才能与之互作,产生更明亮的红色 PLA 荧光信号,从而间接证明了 IRF4 与线粒体基因组非编码区 D-loop 的结合 (图 3.8)。

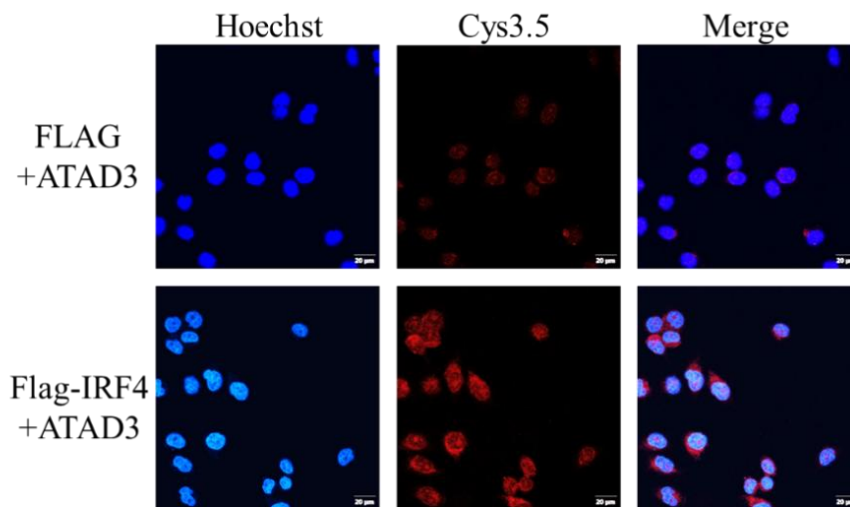


图 3.8 HeLa 细胞中邻近连接实验的激光共聚焦荧光显微镜成像结果

FLAG 组, 转染对照组质粒 Flag_pcDNA3.1(+); Flag-IRF4 组, 转染实验组质粒 Flag-IRF4_pcDNA3.1(+). 细胞核用 Hoechst 33342 染色, Cys3.5, PLA 荧光信号

另外，考虑到线粒体基因组上的非编码区很短，主要由一系列编码基因紧凑排列形成，那么，IRF4 是否会与线粒体基因组上的编码区结合呢？利用染色体免疫共沉淀 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 技术，我们分离得到了与 IRF4 蛋白存在相互作用的染色质片段，再经由 PCR 实验，我们检测到了线粒体基因组 D-Loop 区以外的编码区上的 10 段基因片段（图 3.9）。这表明 IRF4 也可以与线粒体基因组上的编码基因直接结合。而综合之前的实验结果，我们证明了转录因子 IRF4 在进入线粒体之后，可以与线粒体全基因组结合。

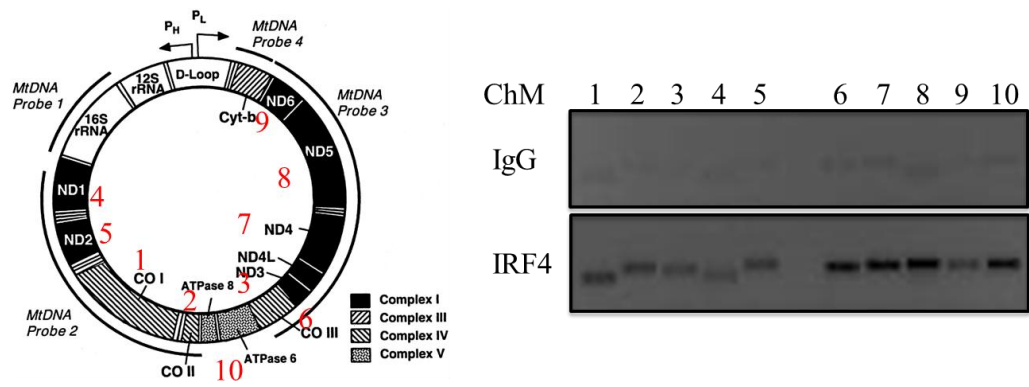


图 3.9 3T3-L1 细胞中 ChIP-PCR 实验结果

左图：线粒体基因组结构示意图，红色数字为右图中所检测的基因片段；右图：PCR 检测结果

事实上，转录因子与基因组的结合只是转录因子驱动基因转录表达的前提条件，但是转录因子 IRF4 是否确实可以驱动线粒体基因的转录表达呢？为了验证该结论，我们还利用线粒体基因组重链启动子 (heavy strand promoter, HSP) 和轻链启动子^[24] (light strand promoter, LSP) 构建了荧光素酶报告基因质粒（图 3.10）。



图 3.10 荧光素酶报告基因质粒

左图：人类线粒体基因组结构简图^[24]；中间：HSP_pGL3-Promoter 质粒图谱；右图：LSP_pGL3-Promoter 质粒图谱

研究结果如图 3.11 所示，当我们在 HeLa 细胞中分别共转染转录因子 IRF4 与两个荧光素酶报告基因质粒时，可以观察到细胞内荧光素酶的活性均极其显著地上升（图 3.11）。这说明，IRF4 可以与线粒体基因组上的启动子 HSP 和 LSP 结合并激活下游荧光素酶的转录表达。这进一步说明了转录因子 IRF4 直接结合线粒体 DNA，从而调控线粒体基因转录的潜力与功能。

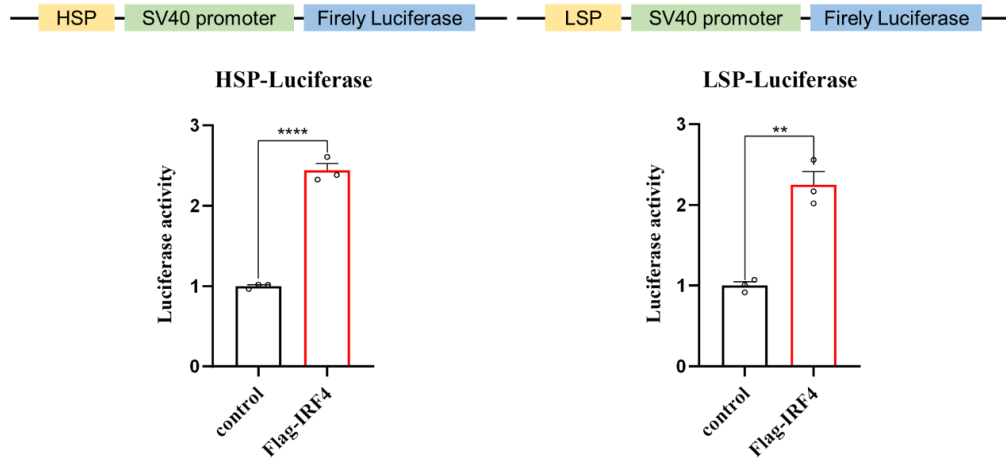


图 3.11 HeLa 细胞中荧光素酶活性测定

左图：使用 HSP_pGL3-promoter 荧光素酶报告基因质粒；右图：使用 LSP_pGL3-promoter 荧光素酶报告基因质粒。control 组，转染对照组质粒 pcDNA3.1(+); Flag-IRF4 组，转染实验组质粒 Flag-IRF4_pcDNA3.1(+). n = 3, unpaired t-test, **p < 0.01, ****p < 0.0001

四、讨 论

很长一段时间，IRF4 一直被认为是一个主要定位于细胞核中，且可以直接与核基因组结合并发挥转录调控功能的转录因子^[25]。然而，线粒体蛋白质组学数据库中 IRF4 的被发现^[21]促使我们开始思考，IRF4 是否存在其它的亚细胞定位的可能性。在本研究中，我们也通过一系列的细胞生物学和生物化学相关的实验验证了我们的猜想。我们发现，无论是内源性还是外源过表达的 IRF4 蛋白，在不同类型的组织和细胞中都拥有细胞核和线粒体的双重定位。

尽管 IRF4 最初是以调控免疫过程的核转录因子的身份被人们所熟知，但越来越多的研究也使得 IRF4 已经成为一个重要的代谢相关蛋白。在棕色脂肪组织中，IRF4 通过与 PGC1 α 的相互作用调节能量代谢^[10]。在骨骼肌中，IRF4 通过直接影响相关基因的转录来调节糖原代谢^[12]。而在这些复杂的细胞代谢过程中，细胞核和线粒体之间的相互作用与功能协调显得尤为重要。而我们的研究发现，核转录因子 IRF4 或许就承担着细胞核与线粒体之间重要的“桥梁”作用。

线粒体作为拥有独立基因组的细胞器，其基因组对其活性至关重要。一方面，基因组本身可能导致线粒体功能的突变。许多研究已经关注到线粒体基因组的单核苷酸变异是调控线粒体功能的重要因素^[16,26]。另一方面，转录因子等也被证明是通过多种机制影响线粒体功能的关键蛋白^[27]。在本研究中，我们利用邻近连接技术、ChIP-PCR 技术和荧光素酶报告基因实验等多种实验，验证了 IRF4 与线粒体基因组直接结合，并调控下游基因转录表达的可能性。这不仅大大拓展了我们对线粒体和能量代谢的认识，更丰富了对细胞核与线粒体之间的相互作用的可能性的探究。

后续，我们希望能够进一步探究 IRF4 进入线粒体的机制，以及 IRF4 的亚细胞定位又是分别以何种途径来调控机体的代谢。

总而言之，我们的研究表明，IRF4 不仅具有细胞核和线粒体的双重定位，更揭示了 IRF4 调控核编码基因转录表达以外的非经典功能。

参考文献

1. Tamura T, Yanai H, Savitsky D, et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis[J]. Annual review of immunology, 2008, 26: 535-84.
2. Wang G, Feng X, Ding J. Molecular basis for the functional roles of the multimorphic T95R mutation of IRF4 causing human autosomal dominant combined immunodeficiency [J]. Structure, 2023, 31(11): 1441-1451.
3. Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, et al. IRF family of transcription factors as regulators of host defense[J]. Annual review of immunology, 2001, 19: 623-55.
4. Wong RWJ, Ong JZL, Theardy MS, et al. IRF4 as an Oncogenic Master Transcription Factor[J]. Cancers (Basel), 2022, 14(17): 4314.
5. Savitsky D, Tamura T, Yanai H, et al. Regulation of immunity and oncogenesis by the IRF transcription factor family[J]. Cancer immunology, immunotherapy: CII, 2010, 59(4): 489-510.
6. Lu J, Liang T, Li P, et al. Regulatory effects of IRF4 on immune cells in the tumor microenvironment[J]. Frontiers in immunology, 2023, 14: 1086803.
7. Kwon H, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, et al. Analysis of interleukin-21-induced Prdm1 gene regulation reveals functional cooperation of STAT3 and IRF4 transcription factors[J]. Immunity, 2009, 31(6): 941-52.
8. Grusdat M, McIlwain DR, Xu HC, et al. IRF4 and BATF are critical for CD8⁺ T-cell function following infection with LCMV[J]. Cell death and differentiation, 2014, 21(7): 1050-60.
9. Eguchi J, Wang X, Yu S, et al. Transcriptional control of adipose lipid handling by IRF4[J]. Cell metabolism, 2011, 13(3): 249-59.
10. Kong X, Banks A, Liu T, et al. IRF4 is a key thermogenic transcriptional partner of PGC-1 α [J]. Cell, 2014, 158(1): 69-83.
11. Kong X, Yao T, Zhou P, et al. Brown Adipose Tissue Controls Skeletal Muscle Function via the Secretion of Myostatin[J]. Cell metabolism, 2018, 28(4): 631-643.
12. Zhu X, Yao T, Wang R, et al. IRF4 in Skeletal Muscle Regulates Exercise Capacity via PTG/Glycogen Pathway[J]. Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 2020, 7(19): 2001502.
13. Oyewole AO, Birch-Machin MA. Mitochondria-targeted antioxidants[J]. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2015, 29(12): 4766-4771.
14. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health[J]. Cell, 2012, 148(6): 1145-1159.
15. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism[J]. Nature cell biology, 2018, 20(7): 745-754.

16. Castañeda V, Haro-Vinueza A, Salinas I, et al. The MitoAging Project: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in mitochondrial genes and their association to longevity[J]. *Mitochondrion*, 2022, 66: 13-26.
17. Koh JH, Kim YW, Seo DY, et al. Mitochondrial TFAM as a Signaling Regulator between Cellular Organelles: A Perspective on Metabolic Diseases[J]. *Diabetes & metabolism journal*, 2021, 45(6): 853-865.
18. Zhuang J, Wang PY, Huang X, et al. Mitochondrial disulfide relay mediates translocation of p53 and partitions its subcellular activity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(43): 17356-61.
19. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat[J]. *Cell*, 2014, 156(1-2): 20-44.
20. Ahmad Z, Kahloan W, Rosen ED. Transcriptional control of metabolism by interferon regulatory factors[J]. *Nature reviews, Endocrinology*, 2024, 20(10): 573–587.
21. Kazak, L., Chouchani, E. T., et al. A creatine-driven substrate cycle enhances energy expenditure and thermogenesis in beige fat[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 643-655.
22. He, J., Mao, C. C., et al. The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization[J]. *The Journal of cell biology*, 2007, 176(2): 141–146.
23. Alam M S. Proximity ligation assay (PLA)[J]. *Current protocols in immunology*, 2018, 123(1): e58.
24. Tan BG, Mutti CD, Shi Y, et al. The human mitochondrial genome contains a second light strand promoter[J]. *Molecular cell*, 2022, 82(19): 3646-3660.
25. Wong RWJ, Tan TK, Amanda S, et al. Feed-forward regulatory loop driven by IRF4 and NF- κ B in adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. *Blood*, 2020, 135(12): 934-947.
26. Cruz ACP, Ferrasa A, Muotri AR, et al. Frequency and association of mitochondrial genetic variants with neurological disorders[J]. *Mitochondrion*, 2019, 46: 345-360.
27. Carbognin E, Betto RM, Soriano ME, et al. Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency[J]. *The EMBO journal*, 2016, 35(6): 618-634.

致 谢

在朋友圈里看了一年又一年学长学姐们的致谢，没想到一眨眼也到了我自己写下这段文字的时候。回望过去四年的大学生活，有收获、有喜悦，也有过低谷、有过挫败。但无论如何，这对我而言，都是一段不可复制，也不可磨灭的经历。

感谢我的爸爸妈妈，给予我停下与重新出发的勇气。虽然你们或许不理解我为什么要养细胞，养“耗子”，偶尔不合时宜还不能共情地 push 我，但你们也尽可能地了解我做的每一件事，在我为实验崩溃的瞬间，在电话里告诉我“谁都是这样过来的，慢慢来”。每次假期回家，既是一场与你们的斗智斗勇，也是一个心理上的真正放松，为我的再次出发蓄积能量。

感谢我的导师李晋老师。来到 Li Lab 是一个不在计划之内，但又充满了幸运与惊喜的选择。李晋老师学识渊博，对待科研严谨认真，以及非常擅长讲故事，这一切都深深感染着我，引领着我真正打开所谓科研的世界的一扇门，也让我跃跃欲试地希望未来真的有机会能在其中有一点有意思的发现。我想，如果未来我依然坚定地走在科研这条道路上的话，李老师会一直是我学习的目标。

感谢实验室的每一位师兄师姐：伊传友师兄、符玮师姐、刘岑希师姐、郭晓师姐、路光星师姐、李富远师兄、张淑贤师姐、李艺峤师姐、李可馨师姐、薛智云师姐、李思泉师兄、王珍玉师姐。感谢你们带过我的每一个实验，告诉我的每一点经验，以及为人处世的理念，让我少走很多弯路。

感谢我的气氛组们。在每一个开心或难过的瞬间，都有你们陪着我，陪伴我度过每一时每一刻，与我共同分享喜悦或者悲伤，给予我方向和支持，温暖

和关怀，让我汲取力量。我的反内耗搭子彤姐，虽然我俩的反内耗只有在对方身上才能实现，但是很喜欢在微信上我俩不停地絮絮叨，分享每一刻的生活；我的情感搭子赖赖，有一些很小的很莫名的点，你永远都能 get 到我，互相共情，也是我的实验室搭子，我会一直怀念我们一起上下班的日子；我的外耗导师玥玥，在无形中让我拥有更多拒绝的勇气。或许未来，我们还是会“天各一方”，但希望我们总能“再续前缘”。祝福我们都能过上自己想要的生活。

感谢一路上我碰到的所有人。在人生这条单行道上，无论未来是否同行，还是走上了不同的道路，但在当下相交的这个点，感谢曾经相遇。

最后，还想感谢一下我自己。在记不清什么时候，我曾经思考过要如何写下这篇致谢，当时我给自己的关键词是“和解”。我一直知道自己是个内耗的人，所以一直期望自己有一天可以拥有坦然面对一切的勇气与释怀。尽管我还没能完全做到，但我想某种程度上我还是进步了的。如果说过去的我是内耗 80%，看开 20%；现在的我是内耗 60%，看开 40%；希望未来的我可以做到内耗 10%，看开 90%，保留一点点内耗作为自己永远的提醒与反思。

回望过去的四年，总觉得其实留有遗憾。没有更勇敢地踏出自己的舒适圈，尝试一些从未尝试的新领域；没能做的更好的国自然申报的汇报……但过去的四年，也有很多的难忘瞬间。全宿舍一起的集体出游；终于得到想要的实验结果；意料之外的生命科学竞赛特等奖；逐渐学会拒绝和说出自己的真心话……或许人生就是这样不受控，那么允许一切如其所示，允许一切事与愿违。

这是本科四年的终点，但只是我在复旦生活的中点。希望未来的我可以过得更加从容，但即使手忙脚乱也没关系，我走的每一步，都算数。