



 **兰州大学**

本科毕业论文

论文题目（中文） 组织蛋白酶家族对于
体内屏障衰老的作用与机制

论文题目 (英文) Cathepsin Family: Mechanisms and Impact
on Aging of Physiological Barriers

学生姓名 张蔚华

指导教师 金卫林，沈义栋

学 院 萃英学院

专 业 生物学

年 级 2021 级

兰州大学教务处

诚信责任书

本人郑重声明：本人所呈交的毕业论文（设计），是在导师的指导下独立进行研究所取得的成果。毕业论文（设计）中凡引用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均已明确注明出处。除文中已经注明引用的内容外，不包含任何其他个人、集体已经发表或未发表的论文。

本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：

张蔚华

日

期：2025年4月27日

关于毕业论文（设计）使用授权的声明

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属兰州大学。本人完全了解兰州大学有关保存、使用毕业论文（设计）的规定，同意学校保存或向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权兰州大学可以将本毕业论文（设计）的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用任何复制手段保存和汇编本毕业论文（设计）。本人离校后发表、使用毕业论文（设计）或与该毕业论文（设计）直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为兰州大学。

本毕业论文（设计）研究内容：

☒ 可以公开

☐ 不宜公开，已在学位办公室办理保密申请，解密后适用本授权书。

（请在以上选项内选择其中一项打“√”）

论文作者签名：

张蔚华

导师签名：

李己林

日

期：2025年4月27日

日

期：2025年4月30日

组织蛋白酶家族对于体内屏障衰老的作用与机制

中文摘要

在生物体中，细胞间的连接不仅发挥着细胞间信息交流和物质运输的作用，还维持着组织屏障的完整性。然而随着衰老，细胞间的连接被逐渐破坏，生物体产生生理功能紊乱，目前这种现象的潜在分子机制还未完全阐明。既往研究表明，在线虫模型中，分泌型组织蛋白酶家族 B 在线虫中的其中一个同源物 CPR-6 蛋白的表达水平呈现年龄依赖性上调，且通过降解表皮细胞的胞间连接蛋白破坏组织屏障完整性，这一发现表明组织蛋白酶 B 家族在衰老相关的屏障功能失调中发挥关键作用。然而，组织蛋白酶在线虫中的其他同源物是否参与这一生物学过程仍有待解析。因此，在本研究中，我们以秀丽隐杆线虫为模式生物，理论上，我们第一次深入探索了组织蛋白酶在线虫中的其他同源物，并研究它们在衰老过程中的作用；实验中，我们利用 RNA 干扰技术，特异性敲低线虫中相应组织蛋白酶的表达，结合组织屏障完整性相关的实验，观察对比在衰老过程中线虫实验组与对照组之间组织屏障的受损程度。实验数据揭示了有关组织蛋白酶在衰老过程中对组织屏障的调控机制，并为开发基于屏障功能维持的衰老干预策略提供了潜在的分子靶点。

关键词： 衰老；秀丽隐杆线虫；组织蛋白酶家族；组织屏障；胞间连接蛋白

Cathepsin Family: Mechanisms and Impact on Aging of Physiological Barriers

Abstract

In organisms, intercellular connections are crucial for cellular communication, material transport, and maintaining the integrity of tissue barriers. However, during aging, the gradual breakdown of these connections can lead to physiological dysfunction. The underlying molecular mechanisms are not fully understood. Previous studies in a nematode model revealed that the expression of CPR-6, a homolog of the secreted tissue plasminogen activator family B, increases with age. It disrupts tissue barriers by degrading epithelial cell junction proteins, indicating a key role of this family in age-related barrier dysfunction. Yet, the involvement of other homologs of this family in this process remains unclear. In this study, using *Caenorhabditis elegans* as a model, we explored the role of other tissue plasminogen activator homologs in aging. Through RNA interference, we specifically knocked down their expression and assessed tissue barrier integrity to compare the damage between experimental and control groups during aging. Our data uncover the regulatory mechanisms of tissue plasminogen activators on tissue barriers during aging and offer potential molecular targets foraging intervention strategies based on barrier function maintenance.

Keywords: Aging; *Caenorhabditis elegans*; Cathepsin family; Tissue barrier; Cell junction proteins

目 录

中文摘要	I
英文摘要	II
第一章 引言	1
第二章 背景介绍.....	2
2.1 衰老与秀丽隐杆线虫.....	2
2.2 胞间连接及组织屏障.....	3
2.3 组织蛋白酶	4
2.4 研究不同种类之间同源物的意义	5
2.5 RNAi 实验在线虫中的应用	5
2.6 小结	5
第三章 实验流程与方法	7
3.1 实验流程.....	7
3.2 实验方法.....	7
3.2.1 扩增插入基因	7
3.2.2 扩增质粒	10
3.2.3 构建新的质粒.....	10
3.2.4 PCR 验证和测序	11
3.2.5 RNAi 实验	11
3.2.6 Smurf Assy 实验.....	12
3.2.7 荧光共聚焦实验.....	12
3.3 小结	12
第四章 实验结果.....	14
4.1 组织蛋白酶同源基因的筛选	14
4.2 线虫肠道屏障实验结果.....	17

4.3 线虫表皮屏障实验结果.....	18
4.4 实验结论汇总	19
4.5 总结	20
第五章 总结和期望	21
参考文献	22
致 谢	24

图 目 录

图 2.1 线虫结构以及线虫衰老过程中的生理变化：(a) 线虫基本的身体数据；(b) 线虫在衰老过程中的生理变化.....	2
图 2.2 细胞间连接的三种方式：紧密连接、粘附连接和间隙连接	3
图 2.3 实验用绿色荧光蛋白标记 HMR-1 来显示线虫的表皮屏障示意图.....	3
图 2.4 线虫的组织屏障示意图	4
图 2.5 组织蛋白酶破坏细胞间连接示意图	4
图 3.1 实验流程	7
图 4.1 组织蛋白酶同源物在秀丽隐杆线虫不同组织中的表达热图	17
图 4.2 线虫肠道屏障的 smurf assay 实验及定量结果.....	18
图 4.3 四十种同源物在线虫体不同组织中的表达水平.....	19
图 4.4 筛选出的具有破坏细胞间连接蛋白的组织蛋白酶基因	19

表 目 录

表 1	PCR 反应体系	8
表 2	PCR 反应条件	8
表 3	酶切体系	10
表 4	连接体系	11
表 1	在线虫体内筛选出的 40 种同源物	14

第一章 引言

在生物体中，细胞间的连接包括紧密连接、黏附连接和间隙连接，这些连接共同构成了生物组织屏障的基础，确保了细胞间的正常连接交流和组织内部环境的稳定^[1]。然而，随着机体的衰老，细胞连接被逐渐破坏，出现组织屏障功能障碍以及生理功能紊乱的现象^[2]。在秀丽隐杆线虫这一经典模式生物中，表皮屏障作为抵御外界环境的第一道防线，其结构完整性主要依赖于细胞间连接蛋白 HMR-1。HMR-1 蛋白在维持表皮组织的紧密连接和屏障功能方面发挥着关键作用^[3]。前期研究显示，随着线虫的衰老，表皮屏障中的 HMR-1 蛋白逐渐降解。更深入的分子机制研究表明，组织蛋白酶 B 家族在线虫中的同源物 CPR-6 在此过程中起到降解 HMR-1 的作用，破坏线虫屏障的完整性。同时，在线虫中，组织蛋白酶家族成员众多且功能重叠度高，这不由得引起我们的猜想，组织蛋白酶家族的其他成员是否在衰老过程中参与降解胞间连接蛋白 HMR-1，并且最终导致机体出现严重的生理功能障碍。基于上述研究背景，本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物，探究组织蛋白酶家族在线虫中的其他同源物是否具有与 CPR-6 类似的调控功能，我们利用 RNA 干扰技术特异性敲低这些基因，并结合线虫组织屏障检查的相关实验，筛选出了一些和 CPR-6 具有相同作用的同源基因。通过这一研究，我们首次系统阐明了组织蛋白酶家族调控组织屏障稳态的分子机制。本研究的结果不仅完善了衰老相关屏障功能障碍的理论框架，更为开发靶向组织蛋白酶家族的抗衰老策略提供了重要理论依据。通过本研究，我们有望找到新的干预靶点，延缓组织屏障功能的衰退，延长生物体的健康寿命，具有重要的科学意义。

第二章 背景介绍

2.1 衰老与秀丽隐杆线虫

衰老是生命活动中一种极为复杂的生物学现象，它贯穿生命的整个历程。从分子层面的微观变化，到器官乃至整个系统的宏观转变，无一不彰显着这一过程的深远影响。在生物体衰老的过程中，细胞功能会逐渐衰退，细胞的代谢活性也随之降低。与此同时，氧化应激会不断在体内积累^[4]。此外，DNA 修复能力也会逐渐丧失，这些变化相互交织、相互影响，最终使得生物个体的生存能力逐渐降低、适应能力下降、生命走向衰退^[5]。近年来，衰老研究逐渐成为生物医学领域的热点，不仅因为衰老是许多慢性疾病的主要风险因素，而且它是人类健康寿命延长的重要方向^[6]。为了深入探索衰老的分子机制，科学家们开发了多种模型生物，其中秀丽隐杆线虫因其独特的优势成为研究衰老的重要工具^[7]（图2.1）。

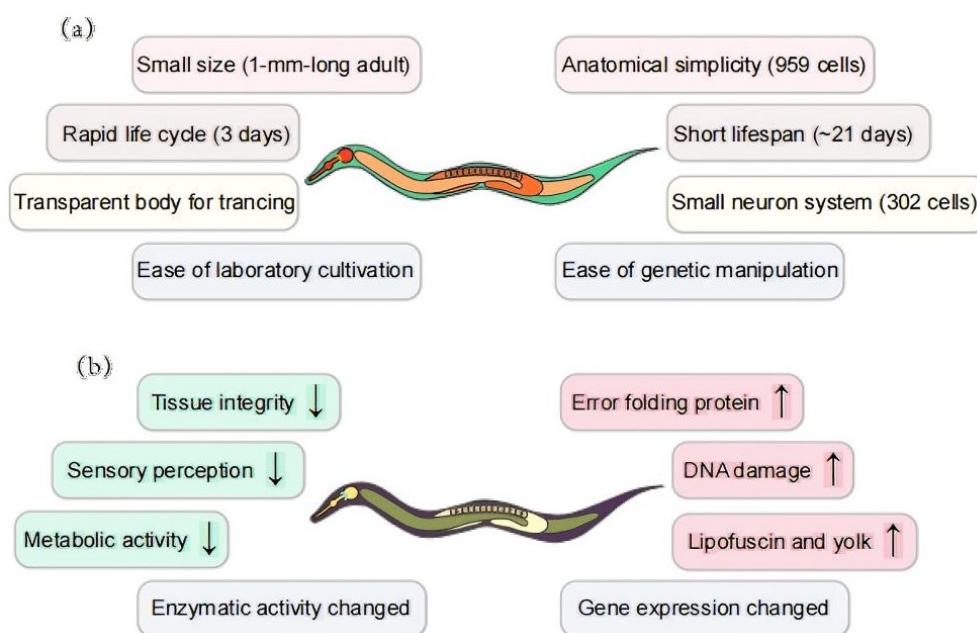


图 2.1 线虫结构以及线虫衰老过程中的生理变化：(a) 线虫基本的身体数据；(b) 线虫在衰老过程中的生理变化

秀丽隐杆线虫因其生命周期短、遗传背景简单、易于操作以及完全测序的基因组等特点，已成为研究衰老和发育生物学的理想模型生物^[7]。在秀丽隐杆线虫的衰老研究中，成虫期从其被孵化后的第 1 天开始算起，其生殖期通常处于第 3-4 天，而衰老的迹象则从线虫的第 8 天左右开始显现^[7]（图2.1）。因此在研究中，第一天被视为线虫成虫期的起点，第八天被视为线虫发生明显的衰老的时间线。这种时间上的对应关系使得科学家能够通过对线虫进行不同时间点的比较，研究衰老的动态过程。

2.2 胞间连接及组织屏障

胞间连接是细胞间进行通信和物质交换的重要途径。细胞间的三种连接方式为紧密连接，粘附连接和间隙连接。其中，紧密连接发挥着渗透屏障作用，粘附连接负责固定、维持组织中细胞间的相对位置，间隙连接则负责信号传递（图2.2）。

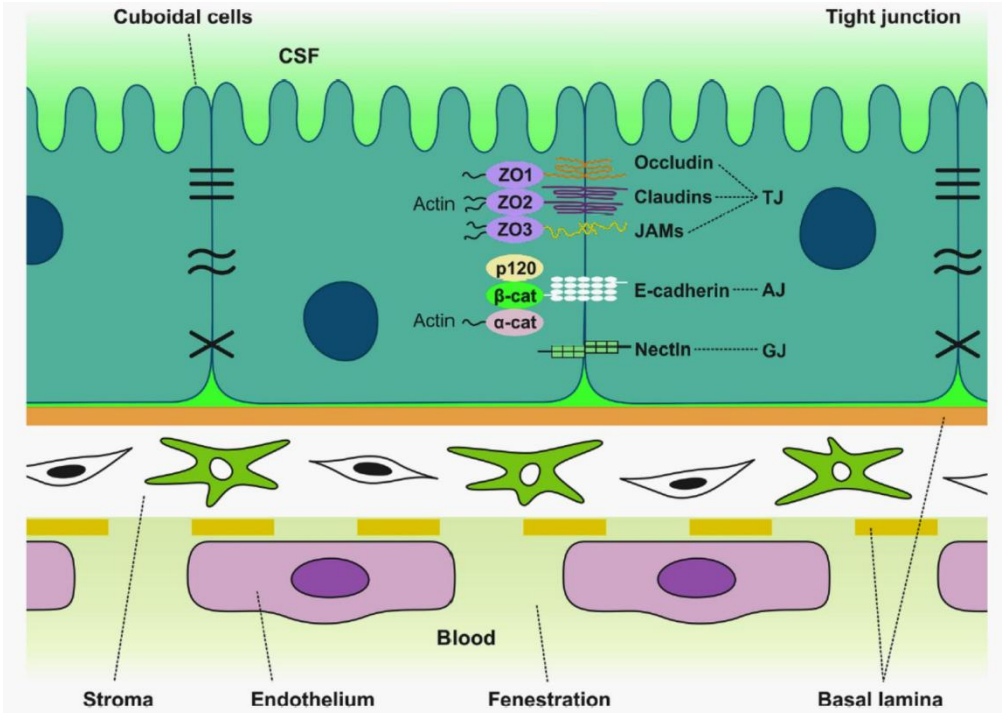


图 2.2 细胞间连接的三种方式：紧密连接、粘附连接和间隙连接

在线虫中，胞间连接主要通过缝隙连接实现。缝隙连接是一种特殊的细胞间结构，允许小分子在相邻细胞之间直接传递。这种连接在多种生理过程中起着关键作用，包括发育调控、代谢协调和应激响应等^[8]。在线虫中，HMR-1 蛋白是一种重要的缝隙连接蛋白，且 HMR-1 与哺乳动物的连接蛋白具有高度同源性。HMR-1 在线虫的多种组织中表达，包括表皮、肠道和生殖器官等（图2.3）。研究表明，HMR-1 不仅参与了细胞间的直接通信，还在胚胎发育、组织屏障功能和环境应激反应中发挥重要作用^[9]。

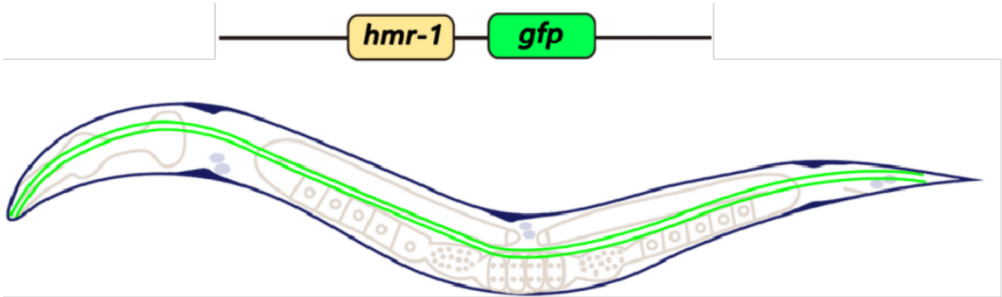


图 2.3 实验用绿色荧光蛋白标记 HMR-1 来显示线虫的表皮屏障示意图

线虫的组织屏障主要包括表皮屏障和肠道屏障，这两种屏障在维持线虫的内环境稳定

和防御外界病原体侵害中起着关键作用（图2.4）。线虫的表皮屏障由外层的表皮细胞构成，主要负责保护线虫免受外界机械损伤和病原体的侵害。表皮细胞通过紧密连接形成了一种屏障结构，防止有害物质从外界进入线虫体内^[10]。肠道屏障是线虫消化系统的重要组成部分，主要由肠道上皮细胞构成。肠道屏障的主要功能是吸收食物中的营养物质，同时防止有害物质扩散进入线虫体内。线虫肠道上皮细胞通过紧密连接，发挥选择性通透性屏障的作用，确保营养物质的吸收和有害物质的排除^[11]。

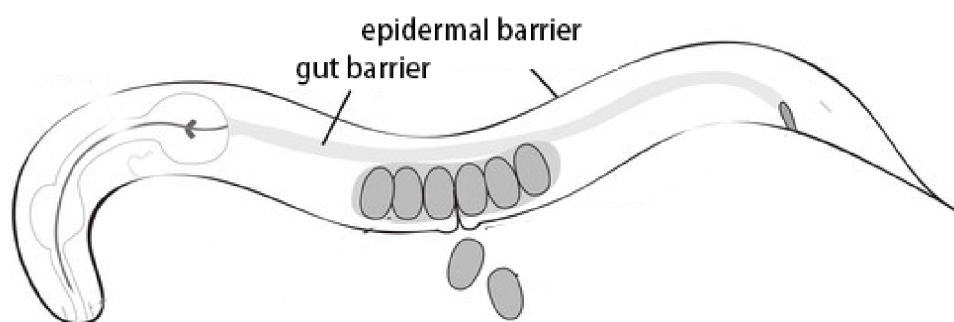


图 2.4 线虫的组织屏障示意图

胞间连接和组织屏障在功能上具有密切的联系。胞间连接的异常状态会导致组织屏障的功能发生障碍，进而影响线虫的整体生理状态^[8]。因此，通过对线虫 HMR-1 蛋白和组织屏障的研究，可以为开发新的临床治疗策略提供理论依据。

2.3 组织蛋白酶

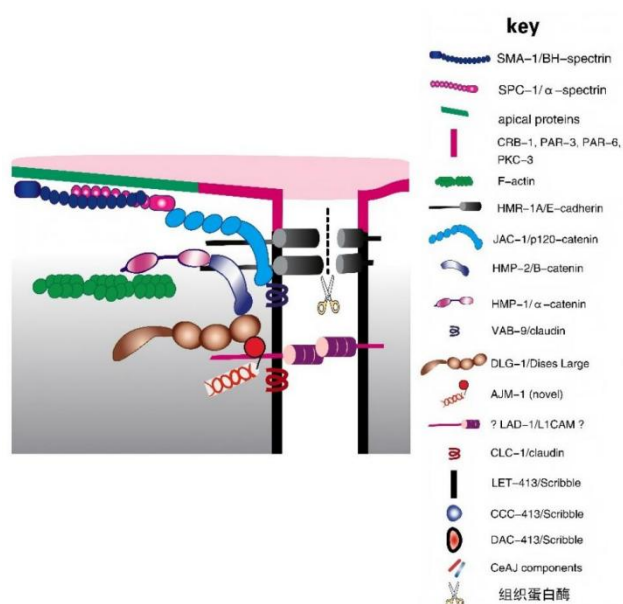


图 2.5 组织蛋白酶破坏细胞间连接示意图

组织蛋白酶是一类能够特异性分解细胞外基质成分的蛋白酶，广泛参与组织修复、细胞迁移、胚胎发育和疾病发生^[12]等过程^[13]。在线虫中，组织蛋白酶在细胞屏障的维持、胞间连接的调控以及生理和病理过程中都具有重要的功能^[14]。组织蛋白酶可能会通过调节细胞外基质的成分，间接影响胞间连接的结构和功能。然而，组织蛋白酶的过度表达可能导致细胞连接的稳定性失调，破坏细胞间的通信以及组织屏障（图2.5）。

2.4 研究不同种类之间同源物的意义

在生物学种系发生理论中，若两个或多个结构具有相同的祖先，则称它们同源。这里相同的祖先既可以指演化意义上的祖先，即两个结构由一个共同的祖先演化而来，比如，蝙蝠的翅膀与人类的手臂是同源的；也可以指发育意义上的祖先，即两个结构由胚胎时期的同一组织发育而来，例如，人类女性的卵巢与男性的睾丸同源。总而言之，若两个或多个基因、蛋白、结构、组织或器官等具有相同的祖先，则称它们互为同源物。

在生物科学研究中，同源物的研究具有多方面的重要意义。比如，科学家可以通过比较同源基因或者蛋白质，确定物种之间的亲缘关系，构建进化树，预测基因功能以及进行基因注释等。而通过研究不同物种之间的同源物，尤其是人类在不同模式生物中的同源物对于开发针对人类不同疾病的治疗方法等极为关键。这种方法不仅高效有用，而且能够最大程度降低生物实验的成本，对于科研人员具有重要的科研价值和实际应用意义。

2.5 RNAi 实验在线虫中的应用

RNAi 干扰是一种分子生物学上由双链 RNA 诱发的基因沉默现象，其机制是通过阻碍特定基因的转录或翻译来抑制基因表达。当细胞中导入与内源性 mRNA 编码区同源的双链 RNA 时，该 mRNA 会发生降解从而导致基因表达沉默^[15]。

在线虫中，RNAi 实验应用广泛^[16]。它不但能够研究基因的功能，还能够确定信号通路中不同基因的上下游关系，帮助我们理解细胞里的信息传递网络。线虫对 RNAi 反应敏感高效，只需要通过喂食，就能轻松把 dsRNA 送入线虫体内，引发 RNAi 反应。RNAi 实验在线虫中的意义重大。它不仅推动了研究人员对线虫基因功能的认识，还为理解人类基因功能和疾病机制提供了线索。而在我们的实验中之所以选择 RNAi 来敲低目的基因，是因为我们的实验需要筛选目的基因，该试验便于进行大规模的基因筛选。

2.6 小结

本章节从衰老这一生命活动的复杂生物学现象出发，阐述了秀丽隐杆线虫作为研究衰老的重要模式生物的优势；进而深入探讨了胞间连接里紧密连接、粘附连接和间隙连接的功能，且着重介绍了线虫缝隙连接及 HMR-1 蛋白的关键作用；接着又介绍了线虫组织屏障

的构成与功能,以及胞间连接与组织屏障的密切联系;随后聚焦于组织蛋白酶,阐述其广泛参与多种生理病理过程的现象及其对胞间连接和组织屏障的潜在影响;最后介绍 RNAi 实验原理及在线虫中的应用优势,为后续基于 RNAi 的基因功能研究实验介绍奠定了基础。

第三章 实验流程与方法

3.1 实验流程

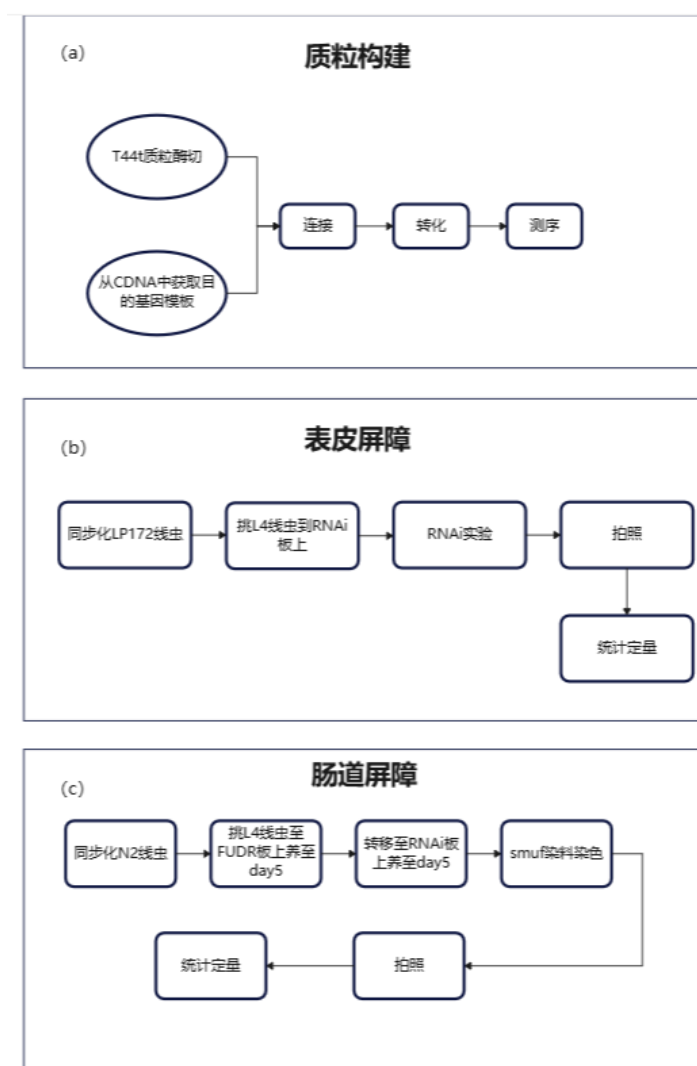


图 3.1 实验流程

3.2 实验方法

3.2.1 扩增插入基因

一、引物设计

1. 使用高质量的模板。
2. 勿使用 dUTP 和带有尿嘧啶的引物和模板。
3. 如实验需要,可适当提高 Phanta 酶的使用量,但 50ul 体系内酶量建议不要超过 2ul。

4. Phanta 酶具有较强的校对活性。因此,如扩增产物需要进行 TA 克隆,加之前必须进行 DNA 纯化。

5. 为了防止 Phanta 酶的校对活性降解引物,在配制反应体系时请最后加入聚合酶。

6. 引物设计

- (1) 引物 3 端最后一个碱基最好为 G 或者 C;
- (2) 引物 3 端最后 8 个碱基应避免出现连续错配;
- (3) 引物 3 端应避免出现发夹结构;
- (4) 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1 为佳,Tm 值调整至 55 ~ 65 为佳;
- (5) 引物额外附加序列,即与模板非配对序列,不应参与引物 Tm 值计算
- (6) 引物的 GC 含量控制在 40%-60% 之间;
- (7) 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀,避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域;
- (8) 引物内部或者两条引物之间避免有 5 个碱基以上的互补序列,两条引物的 3 端避免有 3 个碱基以上的互补序列;
- (9) 引物设计完毕请使用 NCBI BLAST 功能检索引物特异性,以避免非特异性扩增产生。

二、PCR (Panta 酶反应体系,从全基因组中 PCR 结束之后需要再做一步消化。要注意全程在冰上操作,加的体积从大到小)

表 1 PCR 反应体系

组分	体积
ddH ₂ O	17 μ l (加到 50 μ l)
2 \times Buffer	25 μ l
dNTP	1 μ l
上、下游引物 (分开加)	2 μ l
酶	1 μ l
模板 DNA	2 μ l

表 2 PCR 反应条件

步骤	时间	温度
预变性	3 min	95 $^{\circ}$ C

表格接下页

续表: *PCR* 反应条件

步骤	时间	温度
变性	15 sec	95°C
退火	15 sec	60°C (根据引物 T _m 值调整)
延伸	150 sec (根据 bp 长度调整)	72°C
彻底延伸	5 min	72°C

三. 跑胶

1. 安仪器, 根据要跑胶的基因数目的具体情况计算要用到的梳子种类和皿的种类。
2. 加溶剂, 两次煮沸, 在侧面冷水下冲洗到 50°C。
3. 加核酸染料。
4. 倒胶。
5. 晾干 30min, 待胶条凝固冷却成型。
6. 取梳子。
7. 转胶条。
8. 加基因和 marker。
9. 电压 150V, 电流 400A, 跑胶。

四. 胶回收

1. 切胶, 置于 2.0ml EP 管中。切胶要放切胶板, 切完的胶扔到红色垃圾袋, 管中的胶放在相应的引物旁边, 作好引物名称标记。
2. 加 3 倍凝胶体积的 Buffer MB, 55°C 水浴加热, 直至凝胶全部融化。
3. 在等待胶溶期间, 向离心吸附柱中加入 500 μ l Buffer BL, 静置 1min, 室温下 12,000rpm 离心 1min, 弃收集管中的废液, 将离心吸附柱重新放回收集管中。
4. 待凝胶溶液冷却至室温后, 转移到离心吸附柱内, 静置 1min, 室温下 12,000rpm 离心 1min。
5. 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新插回收集管中。
6. 加入 600 μ l Buffer MW 于离心吸附柱中, 室温下 12,000rpm 离心 30s, 弃除收集管中的废液, 将离心吸附柱重新插回收集管中。
7. 重复操作步骤 6。
8. 室温下 12,000rpm 空离 2min, 弃除收集管。
9. 将吸附柱置于 1.5ml 离心管中, 加入 50 μ l~100 μ l 至吸附柱中央, 室温静置 1min, 12,000rpm 离心 1min。
10. 弃去吸附柱, 获得的 DNA 片段可直接用于后续反应或于 -20°C 长期保存。

3.2.2 扩增质粒

一. 摇菌 (扩增质粒数量)

二. 提质粒

1. 取摇菌管, 4000rpm 离心 3min。弃去培养基, 将摇菌管倒扣于吸水纸上吸尽残液。
2. 向留有菌体沉淀的摇菌管中加入 250 μ l Buffer P1, 用移液器或涡旋振荡混匀后将其转入 1.5ml 离心管中。
3. 向步骤 2 中加入 250 μ l Buffer P2, 温和地上下颠倒混匀 8–10 次, 使菌体充分裂解。
4. 向步骤 3 中加入 350 μ l Buffer P3, 立即温和地上下颠倒 8–10 次使溶液彻底中和。将混合液加入吸附柱中, 12,000rpm 离心 30–60s, 弃废液并将吸附柱重新放回收集管中。
5. 重复步骤 4。
6. 将吸附柱放入新的 1.5ml 离心管中, 12,000rpm 离心 2min, 以干燥吸附柱, 彻底去除残留漂洗液。
7. 将吸附柱再次置于新的灭菌 1.5ml 离心管中, 加入 30 μ l 无菌水至吸附柱膜中央, 室温静置 2min, 12,000rpm 离心 1min 以洗脱 DNA。
8. 测定质粒 DNA 浓度, 并在离心管上做好标记。

3.2.3 构建新的质粒

一、酶切

表 3 酶切体系

组分	用量
Plasmid	2 μ g
Enzyme 1	1 μ l
Enzyme 2	1 μ l
10 \times 酶切 Buffer	3 μ l
ddH ₂ O	up to 30 μ l

震荡混匀, 37°C 酶切 30min (3000bp 酶切 30min)

二、纯化 (与胶回收的原理和步骤类似)

三、连接

弹管混匀后冰浴 30min

表 4 连接体系

组分	用量
载体	30 ng (3 μ l / 2 μ l)
插入序列	50 ng (5 μ l / 6 μ l)
10 \times 酶切 Buffer	1 μ l
Exo3	1 μ l (取 1 μ l 加到 9 μ l 水中, 稀释 10 倍后取 1 μ l)

四. 转化

1. 取感受态细胞放冰上解冻。
2. 向感受态细胞中加入 10 μ l 连接产物, 弹管混匀。
3. 冰浴 10min。
4. 42°C 热激 90s。
5. 冰浴 35min。
6. 在超净台中加入 1ml 不含抗生素的 LB 培养基, 混匀后于 37°C 孵育 1h。
7. 5,000rpm 离心 4min, 吸走上清, 只留 100 μ l, 吹打重悬后涂布于抗性平板上。
8. 置于 37°C 培养 10–16h。
9. 挑取单克隆接种至含抗生素的 LA 液体培养基中, 小摇培养约 3h。

注意: 需要设置一个阴性对照——酶切后的载体 (3 μ l, 无需添加连接酶), 用于判断载体是否被完全切开或发生自我连接。

3.2.4 PCR 验证和测序

一、菌液 PCR

二、跑胶验证

3.2.5 RNAi 实验

1. 第 0 天: 在含抗生素的 LB 液体培养基中接种含有 RNAi 质粒的 HT115 大肠杆菌, 于 37°C 震荡培养 12–16 小时, 以获取最多的活菌。
2. 第一天:
 2. (a) 将菌液 1:100 稀释至 2 \times YT⁺ 抗生素中, 培养至 OD₅₉₅ = 0.4;
 2. (b) 加入无菌 IPTG 使终浓度达到 0.4mM, 在 37°C 摇床诱导 4 小时;
 2. (c) 在含抗生素和 IPTG 的培养条件下继续培养。可直接使用培养液, 也可将菌液以 2000rpm 离心、吸走上清后重悬浓缩细胞, 然后播种至 RNAi 平板上。

3. 挑选线虫至 RNAi 平板上, 开始 RNAi 实验。

3.2.6 Smurf Assay 实验

1. 提前一天使用 LB 培养基摇菌 OP50 (线虫的食物), 于 37°C 培养 12–16 小时。使用前将菌液浓缩 10 倍。
2. 配制 5% Smurf 染液: 在浓缩后的菌液中加入 0.25g Smurf 染料粉末, 加入 5ml 浓缩菌液, 涡旋混匀备用。
3. 用 2ml 离心管, 加入 200 μ l M9 缓冲液, 将待处理线虫挑入管中。再加入 400 μ l 步骤 2 中配制的 5% Smurf 染液。
4. 将混合液放置在 20°C 水平摇床上, 缓慢摇晃 3 小时。
5. 使用台式小型离心机离心 10s, 使线虫沉降至管底。吸去上清, 保留约 300 μ l 液体, 补加 1ml M9, 轻轻重悬清洗。重复洗涤多次, 直到线虫体表的蓝色染料明显变淡, 能透过离心管看到手指为止。最后保留约 300 μ l 液体。
6. 将洗后的线虫液体, 用低吸附枪头滴加在已吹干的 NGM 平板上, 轻轻摇晃, 使液体尽可能摊平于平板表面。从该平板中挑取线虫转移到无菌 NGM 平板 (用于拍照)。
7. 在无菌 NGM 平板上加入叠氮化钠杀死线虫, 排列整齐后进行拍照观察。根据 Smurf 染料在虫体内的渗透程度, 判断线虫肠道屏障的完整性。

3.2.7 荧光共聚焦实验

1. 使用左旋咪唑麻醉线虫, 将线虫进行排列 (每个 RNAi 组拍摄大约 30 条虫子)。
2. 使用 488nm 波长的荧光通道, 拍摄线虫表皮细胞间 HMR-1-GFP 的点状荧光信号。

3.3 小结

本章节详细描述了从基因扩增到荧光共聚焦实验的完整实验步骤, 涵盖了 DNA 操作, RNAi 实验以及线虫屏障相关实验多个环节。整个实验流程设计严谨, 步骤清晰, 我们的实验确保了每一步操作的准确性和可重复性, 为研究基因功能和线虫生物学特性提供了可靠的实验方法。

我们的实验首先从引物设计开始, 整个引物设计规则严谨, 为了确保后续的一系列实验按部就班开展。在扩增插入基因时, 我们使用 Phanta 酶进行 PCR 反应, PCR 产物会通过跑胶和胶回收进行纯化。接下来是质粒的扩增和提取。我们通过摇菌培养细菌以扩增质粒数量, 然后进行质粒提取, 最终获得高纯度质粒 DNA。在构建新的质粒时, 我们首先对质粒进行酶切, 酶切后的载体通过纯化去除杂质, 然后与插入目的片段进行连接, 连接产物又通过转化进入感受态细胞, 经过培养后在氨苄板上筛选阳性克隆。为了验证阳性克隆, 本实验采用菌液 PCR 和跑胶验证, 以确保插入序列的正确性。

随后我们进行 RNAi 实验。首先我们在 LB 培养基中培养 HT115 菌株，加入 IPTG 诱导 dsRNA 表达涂板。然后我们将线虫转移到 RNAi 平板上进行喂养。Smurf Assay 实验用于评估线虫肠道屏障功能，利用浓缩菌液配制 5% 的 Smurf 染料，对线虫进行染色后通过离心、洗涤和显微镜观察得出线虫肠道屏障损伤程度结果。最后，荧光共聚焦拍摄和判断线虫表皮屏障的受损情况。最后两种判断线虫屏障受损与否的实验结果我们都将用定量软件进行分析，以确保最终的实验结论严谨可靠。

第四章 实验结果

4.1 组织蛋白酶同源基因的筛选

为了深入探讨组织蛋白酶家族在秀丽隐杆线虫体内屏障衰老过程中的作用，我们首先从线虫基因组数据库 WormBase 中系统性地筛选了组织蛋白酶家族的同源基因。

通过基因序列比对和功能注释分析，我们共筛选出了 40 种组织蛋白酶同源物（表 1）。这些基因在线虫体内的表达位置和表达水平各不相同，涵盖了从表皮到肠道等多个组织器官。全面展示了组织蛋白酶家族在秀丽隐杆线虫中的同源基因名称及其表达位置，为研究这些基因在衰老过程中的功能提供了重要的基础数据。在这 40 个基因中，有 7 个基因属于组织蛋白酶 A 家族；10 个基因属于组织蛋白酶 B 家族；10 个基因属于组织蛋白酶 E 家族；少量基因属于其他组织蛋白酶家族。且这些不同的基因表达的位置也各不相同，这些部位主要包括神经、咽部、肠道、体壁肌等。

表 1 在线虫体内筛选出的 40 种同源物

name	gene name	orthology	express in
K10C2.1	ctsa-2	CTSA	head mesodermal cell, intestine
Y40D12A.2	drd-8, ctsa-2	CTSA	head mesodermal cell, intestine, OLL, PVD neurons
K10B2.2	ctsa-1	CTSA	intestine, OLL, PVD neurons
C08H9.1	ctsa-3.2	CTSA	dopaminergic neuron
F32A5.3	ctsa-3.1	CTSA	head mesodermal cell, intestine
F41C3.5	ctsa-1.1	CTSA	BWM, germ line, gonad, head neurons, hypodermis, intestine, muscle cell, pharynx, reproductive system
F13D12.6	ctsa-1.2	CTSA	OLL PVD neurons, intestine, pharyngeal muscle cell
C52E4.1	cpr-1	CTSB	AVA DA OLL PVD SAB I5 neurons, head mesodermal cell, hypodermis, intestine, muscle
T10H4.12	cpr-3	CTSB	OLL PVD neurons, intestine, pharynx, rectal gland cell

表格接下页

续表：在线虫体内筛选出的 40 种同源物

name	gene name	orthology	express in
F57F5.1	cpr-9	CTSB	DA OLL I5 PVD SAB neurons, intestine, head mesodermal cell
F44C4.3	cpr-4	CTSB	OLL PVD neurons, intestine, coelomocyte
W07B8.1	cpr-8	CTSB	intestine
F32H5.1	\	CTSB	intestine
C25B8.3	cpr-6	CTSB	intestine, pharyngeal muscle cell
W07B8.4	\	CTSB	intestine
F36D3.9	cpr-2	CTSB	OLL PLM PVD neurons, coelomocyte, intestine
W07B8.5	cpr-5	CTSB	OLL, PVD, intestine
Y113G7B.15	\	CTSC, CTSK, CTSS	DTC, gonad
Y51A2D.1	\	CTSC, CTSK, CTSS	AVK neurons
Y51A2D.8	\	CTSC, CTSW, CTSS	germ line, male-specific germ
R12H7.2	asp-4	CTSD	germ line, intestine, muscle cell
ZK384.3	asp-18	CTSE	head neurons, intestine, nervous system, pharynx
F21F8.3	asp-5	CTSE	OLL, PVD neurons, head mesodermal cell, intestine, pharyngeal muscle cell, germ line
Y39B6A.24	asp-17	CTSE	DA neurons, VA neurons, dopaminergic neurons, intestine
Y39B6A.20	asp-1	CTSE	head mesodermal cell, intestine, pharyngeal muscle cell
F59D6.3	asp-8	CTSE	Cephalic sheath, head mesodermal cell, intestine
K10C2.3	asp-14	CTSE	intestine, head mesodermal cell
F21F8.4	asp-12	CTSE	intestine
F59D6.2	asp-7	CTSE	Cephalic sheath
Y39B6A.23	asp-16	CTSE	\
Y39B6A.22	asp-15	CTSE	\
Y40H7A.10	\	CTSF	intestine

表格接下页

续表：在线虫体内筛选出的 40 种同源物

name	gene name	orthology	express in
F41E6.6	tag-196	CTSF	body wall muscle, coelomocyte, intestine, head neurons, pharynx, tail neurons, vulva, VNC
R09F10.1	\	CTSF	intestine, pharyngeal muscle cell
K02E7.10	\	CTSK	hypodermis, intestine, somatic gonad precursor
Y71H2AM.25	\	CTSK	\
T03E6.7	cpl-1	CTSL, VTSV	neurons, intestine, pharyngeal gland cell, cuticle, eggshell, gonadal sheath cell, hypodermis, muscle cell, uterus, vulva
M04G12.2	cpz-2	CTSZ	OLL, PVD neurons, head mesodermal cell, intestine, pharyngeal muscle cell
F32B5.8	cpz-1	CTSZ	AFD neurons, gonad, hypodermis, cuticle, intestine, pharynx, vulva

这些基因的多样性和广泛表达不仅表明组织蛋白酶家族在秀丽隐杆线虫的多个组织中发挥着重要作用，而且暗示了它们在不同组织中可能具有不同的功能和调控机制。我们进一步的研究分析揭示了这些基因在不同组织中的表达水平存在显著差异。

接下来我们使用热图展示了不同基因在年轻（D1 和年老（D8）秀丽隐杆线虫不同组织中的表达水平（图4.1）。热图中的每行代表基因，每列代表年轻和年老线虫组织，不同的颜色代表基因表达水平的高低，颜色越红表示基因表达水平越高，颜色越蓝代表基因表达水平越低。通过观察热图，我们可以发现以下几点——

首先，基因在不同组织中的表达水平存在显著差异。例如，某些基因在神经元中的表达水平较高；而另一些基因在肠道或咽部的表达水平较高。这表明不同的组织蛋白酶基因在不同的线虫组织中具有不同的功能和调控机制。

其次，某些基因在特定组织中表现出明显的高表达。例如，部分基因在头部中胚层细胞、体壁肌和头部神经元中表现出较高的表达水平，而在其他组织中的表达则相对较低。这种表达模式可能与该部分基因在这些组织衰老过程中的特定功能相关。

还有，这些组织蛋白酶在老年线虫的各个神经中，有的增加有的减少，这表示组织蛋白酶家族的成员并非通过统一的基因表达调控机制来调控，并且可能发挥不同的作用。

此外，热图中还显示了某些基因在多个组织中普遍表达，但表达水平均相对较低。这可能表明这些基因在维持组织的基本功能方面具有基础性的作用，但在特定组织中不发挥主要功能。

总的来说, 这张热图揭示了组织蛋白酶家族基因在秀丽隐杆线虫不同组织中的表达式, 为研究这些基因在衰老过程中的功能提供了重要的数据。通过进一步分析这些基因的表达水平在衰老过程中的变化, 我们可以更好地理解这些基因在组织屏障功能维持和衰老相关病理变化中的作用。

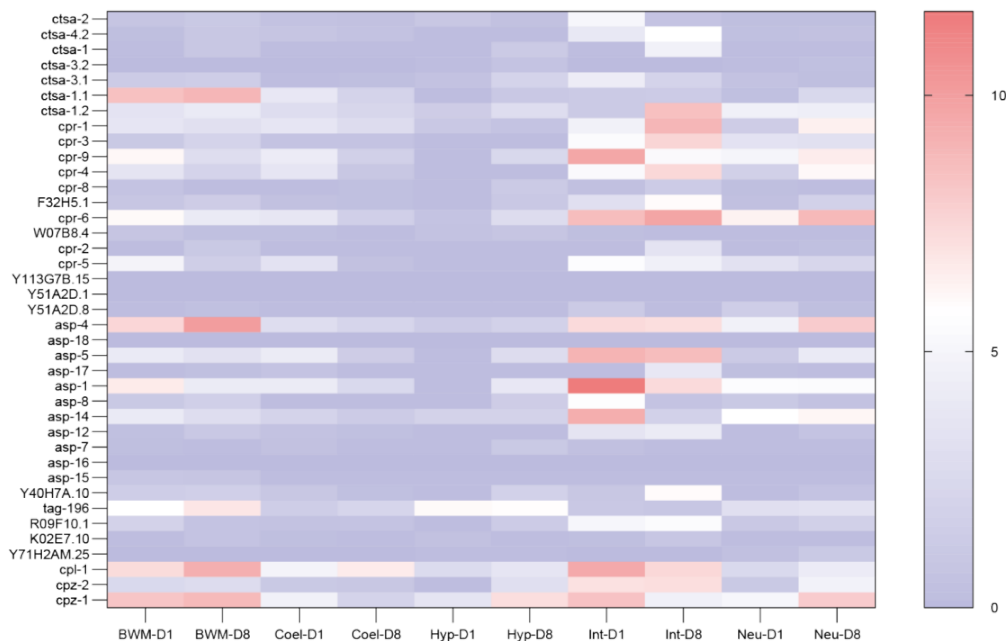


图 4.1 组织蛋白酶同源物在秀丽隐杆线虫不同组织中的表达热图

4.2 线虫肠道屏障实验结果

在筛选出 40 种组织蛋白酶同源物并分析了它们在秀丽隐杆线虫不同组织中的表达模式后, 我们进一步探讨了这些基因在衰老相关屏障功能退变中的作用。为了验证这些基因是否参与了线虫肠道屏障功能的调控, 我们设计了一系列 RNAi 实验, 通过特异性敲低目标基因的表达, 观察其对线虫肠道屏障完整性的影响。接下来, 我们将详细阐述这些 RNAi 实验的结果, 揭示这些基因在肠道屏障功能维持和衰老过程中的具体作用。

Smurf Assay 实验是一种评估肠道屏障功能的方法, 用于检测肠道通透性的变化。该实验通过向线虫饲喂含有蓝色染料的细菌, 观察染料在肠道中的扩散情况, 可以直观地评估线虫肠道屏障的完整性。若染料扩散至肠道外边, 则说明肠道屏障被破坏。

在我们的研究中, 我们利用 **Smurf Assay** 实验评估了通过 RNAi 敲低组织蛋白酶同源物后线虫肠道屏障功能的变化。通过观察蓝色染料在体腔中的扩散情况, 我们能够直观地评估这些基因对肠道屏障功能的影响。接下来, 我将详细描述这些实验结果, 揭示这些基因在肠道屏障功能维持中的具体作用。

图4.2(a) 展示了 **Smurf Assay** 实验的结果示意图。左侧图中, luc2 是对照组, 即表达一种在线虫中不存在的乱序序列, 不对任何线虫基因进行敲除; cpr-3 为经过 RNAi 实验敲低 cpr-3 基因后的线虫。通过观察蓝色染料的扩散情况, 可以发现当我们敲低 cpr-3 基

因的表达量后，Smurf 染料（蓝色）扩散至肠道外侧的比例明显降低，表明该基因在线虫衰老过程中起到一定破坏线虫肠道屏障的作用。

图4.2(b) 为 Smurf Assay 实验的定量结果示意图。横坐标代表了不同的被敲低的组织蛋白酶基因，纵坐标代表该基因被敲低后线虫出现肠漏的比例。柱状图的高低反映了肠漏比例的大小，肠漏比例越低，柱子越矮，表明该基因表达的组织蛋白酶越有可能参与降解线虫的胞间连接蛋白，破坏线虫肠道屏障。

通过这一实验结果，我们筛选出了多个能够显著影响线虫肠道屏障功能的组织蛋白酶，这些基因在维持肠道屏障功能和衰老过程中都发挥着重要的作用。

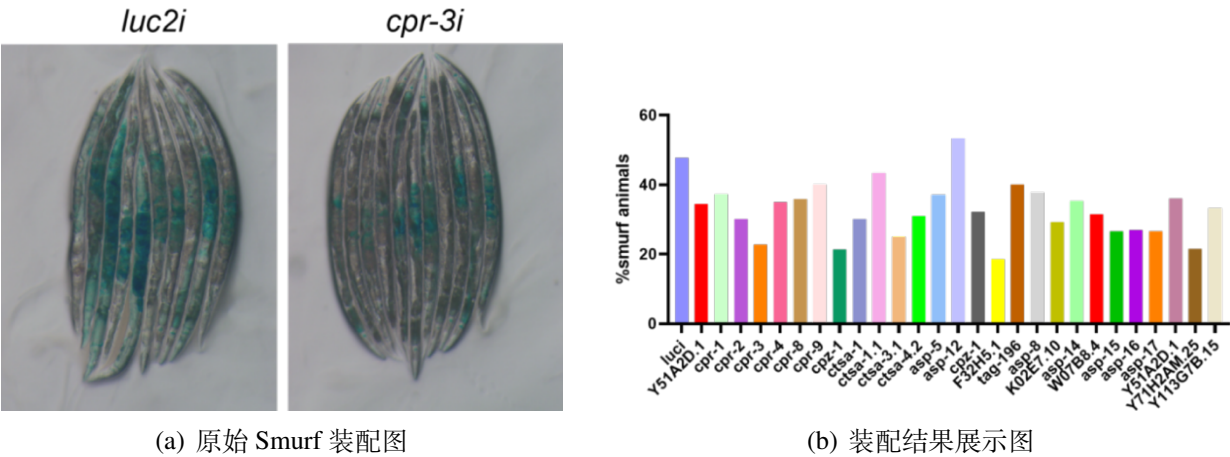


图 4.2 线虫肠道屏障的 smurf assay 实验及定量结果

为了验证这些基因是否参与了线虫表皮屏障功能的调控,我们同样设计了一系列 RNAi 实验，以观察目的基因对线虫表皮屏障完整性的影响。

4.3 线虫表皮屏障实验结果

为了清楚展示组织蛋白酶对表皮屏障的破坏作用，我们使用绿色荧光标记 HMR-1 的线虫株。在 488nm 波长荧光的激发下我们能够通过荧光共聚焦显微镜观察到线虫 HMR-1 的表达和分布，从而代表表皮屏障的状态。当绿色荧光信号连续且紧密时，就代表这个线虫的表皮屏障较为完整；但当点状绿色荧光信号之间的缝隙过大时，就代表其表皮屏障受到了破坏。基于此原理，我们的实验结果如下——

图4.3左侧展示了荧光显微镜下线虫表皮屏障的实验结果示意图。左侧图中，*luc2* 为对照组，即未进行 RNAi 实验的线虫；右侧为经过 RNAi 实验敲低目标基因 *cpr-1* 后的线虫。通过观察线虫 HMR-1-GFP 的荧光信号分布，我们可以发现当敲低某些组织蛋白酶后，线虫表皮屏障的 HMR-1 分布更加连续且密集，空隙率显著降低，表明这些基因在衰老过程中对线虫表皮屏障的破坏具有重要作用。

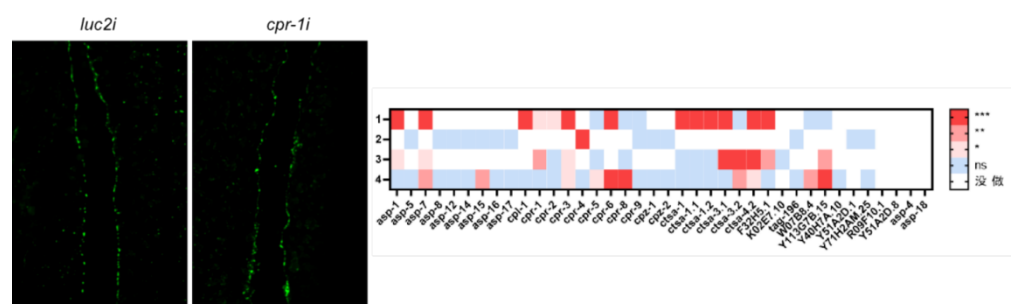


图 4.3 四十种同源物在线虫体不同组织中的表达水平

图4.3右侧为 RNAi 实验的定量结果示意图。横坐标代表了不同的被敲低的组织蛋白酶基因，纵轴是做实验的次数，不同的色块代表该基因被敲低后线虫表皮屏障空隙率降低的统计显著性，颜色越红的色块统计显著性越大，表示该基因在被敲低后，它的表皮屏障空隙率越低，这个基因也越有可能讲解 HMR-1。通过这一热图，我们可以直观地看到哪些基因的敲低显著改善了线虫表皮屏障的完整性。

这一实验我们同样也筛选出了多个能够显著影响线虫表皮屏障功能的组织蛋白酶同源物。

4.4 实验结论汇总

通过以上两个实验，我们分别筛选出了一些具有破坏线虫组织屏障功能的组织蛋白酶。我们取这两个线虫组织屏障实验筛选出的几种基因的交集，我们便可以得到以下几个基因：asp-1；cpl-1;cpr1;cpr-3;cpr-4;cpr-6;ctsa-1.1（图4.4）。这些基因的发现为我们理解生物体在衰老过程中组织屏障功能退变的分子机制提供了全新的视角。我们的研究表明，这些组织蛋白酶通过降解细胞间的连接蛋白，破坏了线虫肠道和表皮屏障的完整性，在衰老过程中发挥了关键作用。通过进一步研究这些基因的功能和调控机制，我们可以更深入地了解衰老过程中组织屏障功能的衰退现象，并探索延缓这一过程的可能性。这些研究成果不仅为线虫的衰老研究提供了宝贵的实验数据，也为人类衰老相关疾病的研究和治疗提供了新的思路 and 方向。

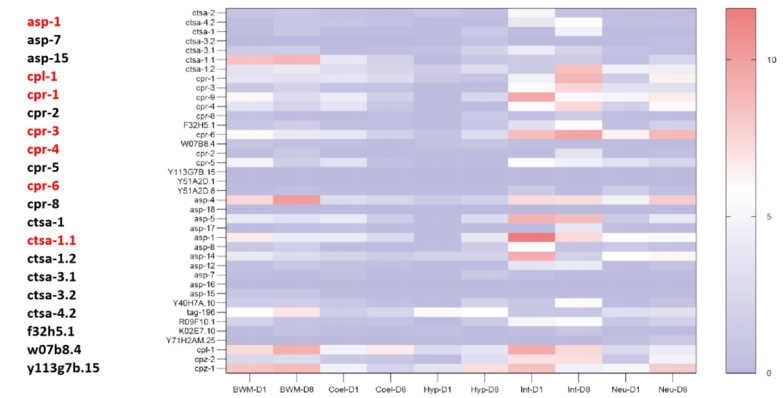


图 4.4 筛选出的具有破坏细胞间连接蛋白的组织蛋白酶基因

4.5 总结

本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物，系统性地探讨了组织蛋白酶家族在屏障衰老过程中的作用与机制。通过基因组数据库筛选和功能注释分析，我们鉴定了 40 种组织蛋白酶家族的同源基因，并分析了它们在秀丽隐杆线虫不同组织中的表达模式。实验结果表明，这些基因在神经、咽部、肠道和体壁肌等组织中呈现差异性表达，且部分基因在特定组织中表现出显著的高表达，暗示了其在组织屏障功能维持中的重要作用。

为了验证这些基因在衰老相关屏障功能退变中的作用，我们设计了一系列 RNAi 实验，通过特异性敲低目标基因的表达，观察其对线虫肠道和表皮屏障完整性的影响。Smurf Assay 实验结果显示，敲低某些组织蛋白酶同源基因后，线虫肠道屏障的通透性显著降低，表明这些基因在肠道屏障功能的破坏中发挥了重要作用。荧光共聚焦显微镜观察和分析进一步表明，当敲低这些基因后，线虫表皮屏障的 HMR-1 蛋白分布更加连续且密集，空隙率显著降低，这些现象也说明了组织蛋白酶同源基因在表皮屏障功能的破坏中同样具有重要作用。综合实验结果，我们筛选出了 7 个关键基因：asp-1、cpl-1、cpr-1、cpr-3、cpr-4、cpr-6 和 ctsa-1.1，本研究不仅验证了既往关于 CPR-6 蛋白的研究结论，还扩展了组织蛋白酶家族在衰老过程中的功能谱系。通过揭示组织蛋白酶家族成员在维持组织稳态和应对环境压力中的作用，本研究为理解衰老相关病理变化提供了新的视角。鉴于线虫 HMR-1 蛋白与人类连接蛋白的同源性，后续研究可将这些靶点转化到哺乳动物模型中，为临床应用提供直接依据。此外，本研究还为延缓组织屏障功能衰退、改善老年相关疾病提供了创新疗法的可能性，未来研究人员有望结合基因编辑技术和 RNA 干扰疗法等，实现对衰老过程的精准干预。

第五章 总结和期望

本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物，深入探讨了组织蛋白酶家族在体内屏障衰老过程中的作用与机制。通过该实验，我们不仅验证了既往关于 CPR-6 组织蛋白酶的研究结论，还扩展了组织蛋白酶家族在衰老过程中的功能谱系。我们成功鉴定了 40 种线虫体内组织蛋白酶同源物，并通过 smurf assay 实验和观察 HMR-1 蛋白的分布筛选出了能够显著破坏肠道和表皮屏障完整性的关键基因。这些基因的表达水平与线虫衰老过程中的屏障功能衰退呈现显著相关性，证实了组织蛋白酶家族通过降解细胞间连接蛋白破坏组织屏障的分子机制。这一发现为理解衰老相关病理变化提供了新的视角。

但是在进行 RNAi 实验的过程中，我们发现一些基因被敲低之后，线虫的存活率显著下降，这可能是由于这几种基因是线虫中较为重要的基因。但至于为什么如此重要的基因依旧会在线虫衰老的过程中破坏线虫的组织屏障，它们在线虫中的具体作用还有待研究。

本次实验为后续工作提供了多个值得深入探索的方向。比如，我们可以进一步探索这些蛋白酶与其他衰老相关信号通路的交互作用，这可能揭示更复杂的衰老调控网络。此外，鉴于线虫 HMR-1 蛋白与人类连接蛋白的同源性，后续研究我们可将发现的靶点转化到哺乳动物模型中去，为临床应用提供直接依据。

在应用层面，本研究的成果可能成为延缓组织屏障功能衰退、改善老年相关疾病的创新疗法。同时，结合基因编辑技术和 RNA 干扰疗法，我们有望实现对衰老过程的精准干预。

最后，实验的成功离不开实验团队成员的协作与创新。我们期待未来能将更多的基础研究成果转化为临床应用。随着未来研究的深入，组织蛋白酶家族在衰老医学中的潜力将被进一步挖掘，为人类健康事业开辟新的篇章。

参考文献

- [1] 上皮细胞间紧密连接功能的研究进展 - 中国知网 [Z]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=04fY48Ac_vw7l-jfN1StPUJYf869rbaOkar_GKwMcT9lBgmh4ili_cmMo5RWGQ9248EkmtFazn6fRVUIXdWf5sfklR8_iLzXvKwDBXtLedkZsGKcSbSTxzVmd0NSne0a0-Vo91IBCcEubz_Ohqt1o5Dwqf9mb5ethJwaLK58PY_mpeQg7Qz-bg==&uniplatform=NZKPT&language=CHS.
- [2] Bloom S I, Islam M T, Lesniewski L A, et al. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence[J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(1):38–51.
- [3] Klompstra D, Anderson D C, Yeh J Y, et al. An instructive role for *C. elegans* E-cadherin in translating cell contact cues into cortical polarity[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(6):726–735.
- [4] López-Otín C, Blasco M A, Partridge L, et al. Hallmarks of aging: An expanding universe[J]. Cell, 2023, 186(2):243–278.
- [5] 衰老与电离辐射损伤的关系进展 - 中国知网 [Z]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=04fY48Ac_vxJwIIn5Ffmuen_Q3lcLWHG4SPkbl-XD92BjY3Cm830G4E7vmfSEOze7e9l-yo413a53nwCS8TCaTHamZB1F0q8CKhkkHvgcNJI0tuyyWxlHf4YnMZtUM2oWftZxFheXAOPeFTbh-rof9WQ8krXu7dUIBrRaeXy3qKSjzWjbZQWA==&uniplatform=NZKPT&language=CHS.
- [6] Olshansky S J, Willcox B J, Demetrius L, et al. Implausibility of radical life extension in humans in the twenty-first century[J]. Nat Aging, 2024, 4(11):1635–1642.
- [7] Jeayeng S, Thongsroy J, Chuaijit S. *Caenorhabditis elegans* as a Model to Study Aging and Photoaging[J]. Biomolecules, 2024, 14(10):1235.
- [8] Wang E, Jiang Y, Zhao C. Structural and physiological functions of *Caenorhabditis elegans* epidermis[J]. Heliyon, 2024, 10(19):e38680.
- [9] Nature V F, Pickett M A, Feldman J L. Persistent cell contacts enable E-cadherin/HMR-1- and PAR-3-based symmetry breaking within a developing *C. elegans* epithelium[J]. Developmental Cell, 2023, 58(19):1830–1846.e12.
- [10] Zhang Y, Li W, Li L, et al. Structural Damage in the *C. elegans* Epidermis Causes Release of STA-2 and Induction of an Innate Immune Response[J]. Immunity, 2015, 42(2):309–320.
- [11] Tan M W, Mahajan-Miklos S, Ausubel F M. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1999, 96(2):715–720.
- [12] Jako T, Pilar A, Jewett A, et al. Cysteine Cathepsins in Tumor-Associated Immune Cells[J]. Front. Immunol., 2019, 10:2037.
- [13] Wang H, Inoue A, Lei Y, et al. Cathepsins in the extracellular space: Focusing on non-lysosomal proteolytic functions with clinical implications[J]. Cellular Signalling, 2023, 103:110531.

- [14] Teuscher A C, Statzer C, Goyala A, et al. Longevity interventions modulate mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis in *C. elegans*[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1):276.
- [15] Mello C C, Conte D. Revealing the world of RNA interference[J]. *Nature*, 2004, 431(7006):338–342.
- [16] Tabara H, Sarkissian M, Kelly W G, et al. The *rde-1* Gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. elegans*[J]. *Cell*, 1999, 99(2):123–132.

致 谢

相聚于秋，离别在夏，我的大学生活即将落幕。总觉得来日方长，毕业遥遥可及，终于也到我执笔于此。以为谈及这四年我会行云流水滔滔不绝，可真到下笔时，却只有百感交集。回望漫漫求学路，并非皆是坦途，但一路前行，一路成长，无论喜悦还是悲伤，所有经历，于我都是生命的馈赠，所有相遇，于我都是独家的珍宝。这四年来目光所及之处，皆是回忆，我度过了人生中最青春的年华。万般不舍，心怀感激。

涓涓恩师情，深深印于心。所谓大学者，非谓有大楼之谓也，有大师之谓也。我要向大学期间遇到的所有课程教师以及辅导员老师表达我的感谢。任课老师的课程有趣而充实，让我在大学期间受益匪浅，我从他们非凡的专业知识和各个领域独特的见解中获得的视野将对我未来的生活和事业具有永恒的意义。辅导员老师的悉心照顾让我在学习上没有了后顾之忧。从知识到校园生活，让我从一张小白纸逐渐变成了写满知识的书本。

家人之爱，永记于心。感谢父母二十多年来的悉心培养，感谢父母一直在背后默默支持我，正是因为你们的支持和付出，才能让我圆满的完成求学之路。失意时给予我鼓励，任性时给予我宽容，难过时耐心听我吐露心声，你们是我前进路上最大的底气，唯有万般努力才能成为你们的骄傲，你们永远平安、健康、快乐是我最大的心愿。非常感谢我的朋友们，我可爱的室友，感恩相遇，有你们的存在使我这四年并不枯燥，感恩知己，我们一起努力，一起进步，虽然最终我们都会天各一方，但是希望你们能够前程似锦，以梦为马，不负韶华。能够陪伴在我身边的朋友们，希望你们无论之后是在哪里生活、哪里工作，我们也许很难见面，但是唯有爱意不减。

最后我要特别感谢我的指导老师沈义栋老师和金卫林老师，以及我的班主任，张文华老师。桃李不言，这三位老师有着严谨的教学态度，严密的逻辑思维，丰富的学科知识，以及负责任的工作态度，让我在学习和做人方面都受益匪浅。在整个论文的定题、修改过程中也少不了他们的细心审查。我将牢记老师的教诲，不管是对于这个课题，还是对于做人的态度，我将奋力拼搏，修改错误，超越之前的自己。

道阻且长，行则将至。最后，我想感谢我自己。你走的很慢但一直前行；你真诚待人，也被人真诚相待。希望在未来，仍对世界保持好奇心，满怀期待地去热爱生活，砖一瓦不断建立自己的内心秩序，寻找自治的生活方式。我将带着春天的印记远航，尽情播撒梦想的种子，去启山去躬耕，去摇撻开拓，让夏无尽，让秋丰盈，让此生硕果

毕业论文（设计）成绩表

导师评语

建议成绩_____

指导教师（签字） 李己林

答辩委员会意见

答辩委员会负责人（签字）_____

成绩_____

学院（盖章）_____

年 月 日