用于皮肤护理的寡聚核酸

技术领域

本发明属于核酸技术领域，具体来讲，涉及基因激活相关的寡聚核酸分子及其在皮肤护理中的应用。

背景技术

皮肤是由表皮、真皮和皮下组织组成的重要器官，覆盖身体的整个表面，为身体提供屏障功能。真皮位于表皮下方以支撑皮肤结构，由乳头状和网状真皮组成，并且填充有称为细胞外基质的生物结构。皮肤的细胞外基质是由包括胶原蛋白、弹性纤维、糖蛋白、糖胺聚糖和蛋白多糖等组成的复杂大分子网络，起结构支架作用并参与细胞代谢调节。细胞外基质蛋白主要是由真皮中的成纤维细胞合成和分泌的，超过 70%的蛋白质是胶原蛋白，它为皮肤提供强度。构成真皮细胞外基质的其他纤维包括弹性纤维，主要由在微纤维上聚合的原弹性蛋白组成。细胞外基质和参与其降解的酶的产生在很大程度上受成纤维细胞的控制，并且合成和降解之间的平衡是保持皮肤稳态的基础。

胶原蛋白

胶原蛋白为细胞外基质成分，对于维持皮肤的弹性和水分，防止细菌或病毒的感染，皮肤病，过敏原等异物的进入起重要作用。 在皮肤老化过程中，不但胶原蛋白和弹性蛋白纤维的合成速率降低，而且其降解速率也迅速增加。 这两种老化过程的结果是真皮中纤维量的大量减少，引起皮肤性质的改变，导致诸如斑点、皱纹、皮肤下垂和粗糙等皮肤衰老表现。

人体皮肤表达的胶原蛋白主要有 I、III、IV、V、VI、VII、XIV、XVII 及 XVIII 型胶原，其中主要是 I 型及 III 型胶原，占正常成人皮肤干重的 80%。两种胶原均为纤维状结构。I 型胶原占总体胶原的 80%，是真皮的主要成分，具有非常强的促进角质形成细胞黏附和迁移的功能。III 型胶原也是真皮细胞外基质的一种主要成分，占真皮胶原的 10%。COL1A1、COL1A2、和 COL3A1 基因分别编码 I 型 α1 链胶原蛋白、I 型 α2 链胶原蛋白和 III 型 α1 链胶原蛋白。

有很多关于增加皮肤胶原蛋白的物质如植物提取物，多肽等材料的报道，但大多数材料效果并不理想，而且制造成本高。因此如果有一种能够促进细胞产生并分泌胶原蛋白的方法将有可能成为抗皮肤衰老、美容的有效手段。

水通道蛋白

水通道蛋白（AQP）为细胞膜上的水通道分子，负责输送水和其他小分子以维持细胞的液体稳态。人细胞中有 13 个 AQP 家族成员（AQP0~AQP12），并且在各种器官中表达。根据 AQP 的特性可分为三类：第一类为能透水的 AQP0 至 AQP6，第二类为能透水、甘油和尿素的 AQP3 和 AQP7，第三类为能透水和中性物质的 AQP9 和 AQP10，其中分布于皮肤的主要是 AQP3。 AQP3 不仅能转运水，而且也能转运尿素和甘油等物质进出皮肤，是维持皮肤

水合作用的一个关键因素，因此是一种有肌肤锁水保湿能力的基因（Schrader 等，Skin Pharmacol Physiol 2012；25 (4): 192-9）

皮肤的质量和正常功能与表皮的不同层的含水量密切相关。在正常表皮中，增殖层含有约 70%的水、角质层含有 10%至 15%的水。角质层的保湿是三个因素的结果：来自真皮的水供应，水向外部环境的损失以及角质层固定水分子的能力。皮肤功能随着衰老而降低，这与皮肤含水量的降低有关。紫外线可导致 AQP3 表达下调从而损伤皮肤的屏障功能。与年轻的未损伤的皮肤相比，老化的人皮肤显示出 AQP3 表达的降低，继而导致皮肤的多种缺陷，保湿功能不足，屏障功能受损，伤口愈合时间延长及弹性的降低（Li 等， Australasian Journal of Dermatology. 2010 May;51(2):106-12，Hammam 等, Advances in Environmental Biology. 2016 Jan;10(1):237-49）。因此，皮肤中 AQP3 的增加导致表皮的更好的保湿（Dumas 等，Journal of drugs in dermatology 2007 Jun;6(6 Suppl):s20-4）。

AQP9 也是一种重要的水通道分子，主要在皮肤角质细胞也就是皮肤的最外层表达，且随着年龄增加而降低（Karlsson 等，Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013, 430, 993–998），这提示 AQP9 可能在皮肤的抗衰老方面起很重要的作用。

然而，迄今为止，尚未见到能够特异激活内源性水通道基因的方法的报道。有鉴于此，本发明提供了激活 AQP3、AQP9 等水通道基因的方法以及其应用于改善皮肤状况的组合物和方法。

弹性蛋白

弹性蛋白或称弹性纤维是一种细胞外基质蛋白，其与皮肤的弹性直接相关，由皮肤真皮中的成纤维细胞产生。除了在皮肤中的作用，弹性纤维还为动脉、肺、肌腱和韧带等组织提供结构支持。在皮肤老化过程中，弹性蛋白纤维的合成速率降低, 降解水平显著提高，使皮肤出现老化特征如细纹，皱纹，老年斑和皮肤松弛等。在人类细胞中，弹性蛋白由 ELN（elastin）基因编码。

透明质酸

透明质酸（HA）又称玻璃酸，是一种糖胺聚糖酸，广泛存在于动物的各种组织细胞间质中。皮肤所有的层均含有透明质酸，但主要集中于真皮乳头层及基底膜带。很多细胞类型都能产生 HA，皮肤 HA 主要由真皮成纤维细胞产生，由 HA 合成酶合成。哺乳动物细胞有 3 个高度同源的透明质酸合成酶（HAS）基因，包括 HAS1、HAS2 和 HAS3。HA 的特点是高黏度，同时具有很好的润滑作用。HA 在皮肤中通过筛管样作用及屏障作用调节水平衡，为皮肤提供弹力及抗剪切力，还通过结合其他细胞外基质成分维持皮肤的完整性。同时，HA 在水溶液中分子链之间形成疏松的网状结构，能够结合保持大量的水，即具有较强的保水作用。HA 不仅与保持水分、保持细胞之间的间隔、细胞生长因子和营养成分的保存及扩散有关，还与细胞的分裂与分化、移动等有关，与皮肤润湿和柔韧性有关。促进透明质酸合成酶基因等的表达具有润湿作用和皮肤美化作用。人体皮肤中透明质酸的浓度随着老化而降低，这导致皮肤失去弹性并降低保水性（ Biochem Biophys Acta 279,265-275， Carbohydr Res 159,127-136， Int J Dermatol 33， 119-122）。

人皮肤中的透明质酸的量会随着老化而减少，有研究认为皮肤中的透明质酸量的减少是伴随老化的肌肤弹性降低和水分含量减少的直接原因之一（Fleischmajer 等，Biochem Biophys Acta 1972；279：265-275)。HA 在临床和化妆护肤方面的应用正是基于其高黏度和保水性质。因此，注射外源性透明质酸进入皮肤已经成为热门的美容方法。能够促进皮肤细胞产生内源性透明质酸的方法则代表一种更安全有效的美容手段。

微纤维相关蛋白 2（MFAP2）

MFAP2, 亦称 MAGP-1 (微纤维缔合性糖蛋白 1)，是细胞外基质中富含甘氨酸的酸性蛋白，对弹性纤维组装起关键作用。随着年龄和光暴露的增加，人皮肤中 MFAP2 基因和蛋白质水平的降低，引起功能性 MFAP2 纤维网络的丧失和真皮中缺乏结构支持。同时，毛囊及毛孔区域周围的 MFAP2 蛋白也有降低，引起毛囊周围结构支持丧失，皮肤脆弱、下垂和毛孔增大。除了为皮肤弹性纤维形成提供结构支持外，MFAP2 作为关键因子通过调节 TGF-β 信号传导途径参与调整血管完整性、伤口愈合和身体脂肪在适当部位沉积。

随着生活水平的提高，人们对能够外用于皮肤以改善皮肤健康和外观的产品的需求也日益增加。消费者希望利用这些产品来减轻或延缓自然老化或因环境因素导致的皮肤老化的皮肤外观，如皮肤干燥、无光泽、细纹、皱纹、弹性丧失、松垂、缺乏弹性、缺乏饱满度、色斑、脱屑异常、毛孔粗大等。目前市场上的护肤品已知可改善皮肤外观，但效果有限。迄今为止，市场上还没有任何一种安全有效的方法能够在基因水平通过特异地增加一个或者多个基因表达来增加基因的内源性蛋白的表达来达到改善皮肤状况和抗皮肤衰老目的。

因此，本发明提供了可施用于皮肤的小核酸分子，这种分子可以通过特异性激活与皮肤生理和病理相关基因的表达来达到安全有效地改善皮肤状况和减轻皮肤衰老的效果。

发明内容

为解决上述问题，本发明提供了基于 RNA 激活过程的小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子，其通过激活/上调胶原蛋白基因、水通道蛋白基因、弹性蛋白基因、透明质酸基因、微纤维相关蛋白基因中的一种或多种的转录，提高相应内源性蛋白质的表达量来改善皮肤状态。

在本发明的一个方面，提供了小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子，其激活或者上调细胞中 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因中至少一种基因的表达。本发明的小激活核酸分子的一条链与任一上述基因的启动子区的长度为 16-35 个核苷酸的片段具有至少 75%以上的同源性或互补性，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性。更具体地，对于 AQP3 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:249-263 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 AQP9 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:264-276 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，

或约 99%的同源性或互补性；对于 ELN 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:277-286 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 COL1A1 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:287-294 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 COL1A2 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:295-306 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 COL3A1 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:307-317 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 HAS1 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:318-326 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 HAS2 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:327-340 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 HAS3 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:341-357 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性；对于 MFAP2 基因，本发明的小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:358-372 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，或约 99%的同源性或互补性。

在本发明中，所述小激活核酸分子包含正义核酸片段和反义核酸片段，所述正义核酸片段和反义核酸片段含有互补区域，互补区域能形成双链核酸结构，该双链结构核酸分子通过 RNA 激活机制促进上述基因在细胞中的表达。小激活核酸的正义核酸片段和反义核酸片段可以存在于两条不同的核酸链上，也可以存在于同一条核酸链上。当正义核酸片段和反义核酸片段分别位于两条链上时，本发明的小激活核酸分子的至少一条链具有长度为 0-6 个核苷酸的 3’突出端，例如具有 0、1、2、3、4、5、6 个核苷酸的 3’突出端，优选情况下两条链都具有长度为 2 个或 3 个核苷酸的 3’突出端，突出端的核苷酸优选为 dT。当正义核酸片段和反义核酸片段存在于同一条核酸链上时，优选情况下本发明的小激活核酸分子为发夹型单链核酸分子，其中正义核酸片段和反义核酸片段的互补区域形成双链核酸结构。上述小激活核酸分子中，正义核酸片段和反义核酸片段的长度为 16-35 个核苷酸，可以为 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 或 35 个核苷酸。

在一个实施方案中，本发明的针对 AQP3 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:1-15 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:125-139 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 AQP9 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:16-28 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID

NO:140-152 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 ELN 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:29-38 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:153-162 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 COL1A1 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:39-46 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:163-170 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 COL1A2 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:47-58 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:171-182 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 COL3A1 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:59-69 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:183-193 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 HAS1 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:70-78 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:194-202 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 HAS2 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:79-92 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:203-216 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 HAS3 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:93-109 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:217-233 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性；本发明的针对 MFAP2 基因的小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:110-124 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:234-248 的任一核苷酸序列具有至少 75%，例如至少约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%，约 99%或约 100%的同源性或同一性。

具体地，本发明的针对 AQP3 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:1-15 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:1-15 的任一核苷酸序列组成，并且其反义

链包括或选自 SEQ ID NO:125-139 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:125-139 的任一核苷酸序列组成；本发明针对 AQP9 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:16-28 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:16-28 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:140-152 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:140-152 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 ELN 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:29-38 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:29-38 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:153-162 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:153-162 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 COL1A1 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:39-46 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:39-46 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:163-170 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:163-170 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 COL1A2 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:47-58 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:47-58 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:171-182 的任一核苷酸序列，或由选自 SEQ ID NO:171-182 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 COL3A1 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:59-69 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:59-69 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:183-193 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:183-193 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 HAS1 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:70-78 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:70-78 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:194-202 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:194-202 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 HAS2 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:79-92 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:79-92 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:203-216 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:203-216 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 HAS3 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:93-109 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:93-109 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:217-233 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:217-233 的任一核苷酸序列组成；本发明的针对 MFAP2 基因的小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:110-124 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:110-124 的任一核苷酸序列组成，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:234-248 的任一核苷酸序列，或者由选自 SEQ ID NO:234-248 的任一核苷酸序列组成。

本文所述小激活核酸分子中所有的核苷酸都可以为天然的或未经化学修饰的核苷酸，也可以是包括至少有一个化学修饰的核苷酸，所述化学修饰包括例如选自如下修饰中的一种或其组合：

（1）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中核苷酸的磷酸二酯键的修饰；

（2）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的核糖的 2'-OH 的修饰；

（3）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的碱基的修饰；

（4）所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的至少一个核苷酸为锁核酸。

所述化学修饰为本领域技术人员所公知，所述磷酸二酯键的修饰是指对磷酸二酯键中的

氧进行修饰，包括硫代磷酸修饰和烷化磷酸盐修饰。两种修饰都能稳定 saRNA 结构，保持碱基配对的高特异性和高亲和力。

所述核糖修饰是指对核苷酸戊糖中 2'-OH 的修饰，即，在核糖的羟基位置引入某些取代基，例如，2'-氟代修饰， 2'-氧甲基修饰， 2'-氧亚乙基甲氧基修饰， 2,4'-二硝基苯酚修饰，锁核酸(LNA)， 2'-氨基修饰， 2'-脱氧修饰。

所述碱基修饰是指对核苷酸的碱基进行修饰，例如，5'-溴尿嘧啶修饰， 5'-碘尿嘧啶修饰，N-甲基脲嘧啶修饰，2,6—二氨基嘌呤修饰。

这些修饰可以增加所述小激活核酸分子的生物可利用性，提高与靶序列的亲和性，增强在细胞内抵抗核酸酶水解的能力。

此外，为了促进小激活核酸分子进入细胞，可以在以上修饰的基础上，在小激活核酸分子的正义链或反义链的末端引入胆固醇等亲脂性的基团以利于通过由脂质双分子层构成的细胞膜及核膜与细胞核内的基因启动子区发生作用。

本发明提供的小激活核酸分子在与细胞接触后可有效激活或上调细胞中所述基因的表达，优选情况下表达至少上调 10%。

本发明的小激活核酸分子可以可操作地连接于载体，优选地，所述载体包括质粒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体。

本发明的一个方面提供了分别编码本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子的核酸。在一个实施方式中，本发明的小核酸分子为小激活 RNA（saRNA）分子。在一个实施方式中，所述核酸是 DNA 分子。

本发明的一个方面提供了包含本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的一种或多种或包含分别编码本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子的核酸中的一种或多种的细胞。在一个实施方式中，所述细胞是哺乳动物细胞，优选地是人类细胞。上述细胞可以是离体的，如细胞系或细胞株等，也可以存在于哺乳动物体中，如人体中。

本发明的另一方面提供了组合物或制剂，其包含干预选自下组的至少一种基因的表达与功能的激动剂：人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和 MFAP2 基因。在一个实施方式中，本发明的组合物或制剂所包含的激动剂可以是上述小激活核酸分子中的一种或多种，或分别编码本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子的核酸中的一种或多种。在另一实施方式中，本发明的组合物或制剂可以包含载体，例如化妆品/护肤品/美容产品可接受的载体。在进一步的实施方式中，化妆品/护肤品/美容产品可接受的载体可以包括例如水性载体、脂质体、高分子聚合物或多肽。在更进一步的实施方式中，水性载体可以包括例如无 RNA 酶水。

本发明的另一方面提供了组合物（如药物组合物）或制剂，该组合物或制剂包含上述小

激活核酸分子或分别编码本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子的核酸以及（任选地）载体。在一个实施方案中，所述载体可以包括化妆品/护肤品/美容产品可接受的载体。在一个实施方案中，所述化妆品/护肤品/美容产品可接受的载体可以包括或选自水性载体、脂质体、高分子聚合物或多肽。在一个实施方式中，本发明的水性载体可以例如包括无 RNA 酶的水或无 RNA 酶缓冲液。

本发明的组合物或制剂可以含有 1-150 nM，例如 1-100 nM，例如 50 nM，例如 1-50 nM，例如 1-10 nM、1-20 nM、1-30 nM、1-40 nM，例如 10-100 nM、10-50nM、20-30nM、20-40nM、20-50 nM、20-60nM、20-70nM、20-80nM、20-90nM、20-100nM 的上述小激活核酸分子或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸。

本发明的组合物或制剂可以包括本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种，或者任意两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种的组合。例如，本发明的组合物可以包括靶向 AQP3 启动子区的小激活分子与靶向 AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 ELN 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 AQP9 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 COL1A1 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；或者靶向 COL1A2 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合，等等。

具体地，本发明的组合物或制剂可以包括例如，针对 AQP3 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:1-15 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:125-139 的任一核苷酸序列），和/或针对 AQP9 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:16-28 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:140-152 的任一核苷酸序列），和/或针对 ELN 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:29-38 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:153-162 的任一核苷酸序列），和/或针对 COL1A1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:39-46 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:163-170 的任一核苷酸序列），和/或针对 COL1A2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:47-58 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:171-182 的任一核苷酸序列），和/或针对 COL3A1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:59-69 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID

NO:183-193 的任一核苷酸序列），和/或针对 HAS1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:70-78 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:194-202 的任一核苷酸序列），和/或针对 HAS2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:79-92 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:203-216 的任一核苷酸序列），和/或针对 HAS3 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:93-109 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:217-233 的任一核苷酸序列），和/或针对 MFAP2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:110-124 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:234-248 的任一核苷酸序列）。

本发明提供了干预选自下组的至少一种基因的表达与功能的激动剂在制备皮肤护理组合物中的应用：人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和 MFAP2 基因。在一个实施方式中，激动剂可以包括上述小激活核酸分子中的一种或多种，或分别编码本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子的核酸中的一种或多种。本发明的另一方面涉及上文所述的小激活核酸分子、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸或包含上述小激活核酸分子或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的组合物在制备用于激活/上调与皮肤状态相关的基因（例如 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和/或 MFAP2 基因）在细胞中表达的试剂或制剂中的应用。

本发明还涉及激活/上调与皮肤状态相关的基因例如 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和/或 MFAP2 基因在细胞中的表达的方法，该方法包括给细胞施用上文所述的小激活核酸分子中的一种或多种、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸中的一种或多种、或包含上述小激活核酸分子的一种或多种或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的一种或多种的组合物。

上述小激活核酸分子、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸或包含上述小激活核酸分子或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的组合物可以被直接导入细胞中，也可以是将编码该小激活核酸分子的核苷酸序列导入细胞后在细胞内产生；所述细胞优选为哺乳动物细胞，更优选为人类细胞。上述细胞可以是离体的，如细胞系或细胞株等，也可以存在于哺乳动物体中，如人体中。该人体是皮肤出现松弛、衰老、细纹、干纹、皱纹、缺水等状况的人员，并且所述小激活核酸分子、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸或包含上述小激活核酸分子或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的组合物被施以足够的量以实现皮肤状况的改善。

本发明另一方面提供了一种分离的上述基因（例如，AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和/或 MFAP2 基因中的一种或多种）的小激活核酸分子的作用位点，该位点具有上述任一基因（例如，AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和/或 MFAP2 基因）的启动子区上任意连续的 16-35 个核苷酸序列。优选情况下，对于 AQP3 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:249-263 的任一核苷酸序列；对于 AQP9 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:264-276 的任一

核苷酸序列；对于 ELN 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:277-286 的任一核苷酸序列；对于 COL1A1 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:287-294 的任一核苷酸序列；对于 COL1A2 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:295-306 的任一核苷酸序列；对于 COL3A1 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:307-317 的任一核苷酸序列；对于 HAS1 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:318-326 的任一核苷酸序列；对于 HAS2 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:327-340 的任一核苷酸序列；对于 HAS3 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:341-357 的任一核苷酸序列；对于 MFAP2 基因，其小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子的作用位点包括或选自 SEQ ID NO:358-372 的任一核苷酸序列。

在一个方面，本发明提供了护理皮肤的方法，包括给个体施用本发明的小激活核酸分子的一种或多种、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的一种或多种或包含上述小激活核酸分子的一种或多种或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的一种或多种的组合物。所述个体可以是哺乳动物，例如人。在一个实施方式中，在应用本发明的护理皮肤的方法进行皮肤护理后，个体的皮肤的弹性提高，皱纹减少或消除，皮肤含水量增加，皮肤紧致。

在另一方面，本发明还提供了改善皮肤状况的方法，包括给个体施用本发明的小激活核酸分子的一种或多种、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的一种或多种或包含本发明的小激活核酸分子的一种或多种或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的一种或多种的组合物。所述个体可以是哺乳动物，例如人。在一个实施方式中，所述皮肤状况包括皮肤出现松弛、衰老、细纹、干纹、皱纹、缺水等状况。在一个实施方式中，改善皮肤状况包括但不限于，增加或恢复皮肤弹性，改善皮肤松弛、提高皮肤含水量、减少或消除皮肤皱纹，防止细纹和干纹的出现等。

仍然另一方面，本发明还提供了激活/上调人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和 MFAP2 基因中的一个或多个在细胞中的表达的方法，包括给所述细胞施用本发明的小激活核酸分子中的一种或多种、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸中的一种或多种，或包含上述小激活核酸分子的一种或多种或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的一种或多种的组合物。

本发明所述的方法包括给细胞施用本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种。例如，本发明的方法可以包括施用靶向 AQP3 启动子区的小激活分子与靶向 AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 ELN 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八

种、或九种的组合；靶向 AQP9 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 COL1A1 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 COL1A2 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合，等等。

本发明所述的上述方法可以包括将本发明的小激活核酸分子中的一种或多种、编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸中的一种或多种，或包含上述小激活核酸分子的一种或多种或编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸的一种或多种的组合物直接导入细胞中。

具体地，本发明的方法可以包括例如将如下中的一种或多种直接导入细胞中：针对 AQP3 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:1-15 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:125-139 的任一核苷酸序列），和/或针对 AQP9 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:16-28 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:140-152 的任一核苷酸序列），和/或针对 ELN 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:29-38 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:153-162 的任一核苷酸序列），和/或针对 COL1A1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:39-46 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:163-170 的任一核苷酸序列），和/或针对 COL1A2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:47-58 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:171-182 的任一核苷酸序列），和/或针对 COL3A1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:59-69 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:183-193 的任一核苷酸序列），和/或针对 HAS1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:70-78 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:194-202 的任一核苷酸序列），和/或针对 HAS2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:79-92 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:203-216 的任一核苷酸序列），和/或针对 HAS3 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:93-109 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:217-233 的任一核苷酸序列），和/或针对 MFAP2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:110-124 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:234-248 的任一核苷酸序列）。

如前面所述，术语“上述小激活核酸分子中的一种或多种”指代本发明所述的靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种。例如，靶向 AQP3 启动子区的小激活分子与靶向 AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 ELN 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2

基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 AQP9 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 COL1A1 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合；靶向 COL1A2 启动子区的小激活分子与靶向 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子区的小激活核酸分子中的任意一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、或九种的组合，等等。

具体地，术语“上述小激活核酸分子中的一种或多种”指代如下中的一种或多种的组合：针对 AQP3 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:1-15 的任一核苷酸序列，其其反义链包括或选自 SEQ ID NO:125-139 的任一核苷酸序列）、针对 AQP9 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:16-28 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:140-152 的任一核苷酸序列）、针对 ELN 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:29-38 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:153-162 的任一核苷酸序列）、针对 COL1A1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:39-46 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:163-170 的任一核苷酸序列）、针对 COL1A2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:47-58 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:171-182 的任一核苷酸序列）、针对 COL3A1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:59-69 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:183-193 的任一核苷酸序列）、针对 HAS1 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:70-78 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:194-202 的任一核苷酸序列）、针对 HAS2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:79-92 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:203-216 的任一核苷酸序列）、针对 HAS3 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:93-109 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:217-233 的任一核苷酸序列）、针对 MFAP2 基因的小激活核酸分子（其正义链包括或选自 SEQ ID NO:110-124 的任一核苷酸序列，其反义链包括或选自 SEQ ID NO:234-248 的任一核苷酸序列）。

同样地，对于术语“编码本发明所述的小激活核酸分子的核酸中的一种或多种”具有是所述的类似含义。

在一个实施方式中，在上述方法中，本发明的小激活核酸分子是在编码该小激活核酸分子的核苷酸序列导入所述细胞后在细胞内产生的。在本发明的方法中，所述细胞可以是人类细胞。

本发明的有益效果

本发明提供的激活/上调基因表达的小激活核酸分子例如小激活 RNA（saRNA）分子，其能够高效、特异地上调内源性基因（例如 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和/或 MFAP2 基因中的一种或多种）的表达，同时具有较低的毒副作

用，可以使皮肤恢复或增加皮肤弹性，改善皮肤松弛、提高皮肤含水量、减少或消除皮肤皱纹，防止细纹和干纹的出现，可用于制备改善皮肤状态和/或护理皮肤的制剂或制品例如护肤品等。

附图说明

图 1 为靶向 AQP3 的 saRNA 在正常人表皮角质形成细胞中激活 AQP3 mRNA 表达。用所示 saRNA（终浓度为 10 nM）转染正常人表皮角质形成细胞（NHEK）细胞。72 小时后收集细胞用 Qiagen RNeasy 试剂盒提取 RNA，反转录后用 7500FAST 实时 PCR 系统对 AQP3 进行 qPCR 扩增，同时扩增 HPRT1 和 GAPDH 基因并以其平均值作为内参。y 轴为每个 saRNA 处理样本所致的 AQP3 mRNA 表达改变在用内参基因校正后相对于对照处理（Mock）的改变值（平均值±SEM， n=2）。dsControl 和 siAQP3 分别为无关序列双链 RNA 及小干扰 RNA 对照。图中柱状图上的数字代表相对于对照处理（Mock）的 AQP3 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2）

图 2 为靶向 AQP3 的 saRNA 在正常人表皮角质形成细胞中激活 AQP3 蛋白表达。用所示 saRNA（终浓度为 10 nM）转染 NHEK 细胞。72 小时后收集细胞用蛋白印迹法分析 AQP3 蛋白的量，同时检测微管蛋白作为蛋白上样量的内参。对照处理（Mock）为空白处理对照，dsControl 和 siAQP3 分别为无关序列双链 RNA 对照及小干扰 RNA 对照。用 Image Lab（BIO-RAD, Chemistry Doc^{tm} MP 成像系统)分析蛋白印迹条带的强度并在图中表示为相对于对照处理(Mock)的改变倍数值。

图 3 为靶向 AQP9 的 saRNA 在人 NHEK 细胞中激活 AQP9 mRNA 表达。用图中所示的 saRNA（50 nM）转染 NHEK 细胞 72 小时，用 RT-qPCR 分析 AQP9 基因在转染细胞中的 mRNA 表达。同时扩增 GAPDH 作为内参基因。柱状图代表相对于对照处理（Mock）的 AQP9 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2 ）。siAQP9 为靶向 AQP9 的 siRNA。

图 4 为 ELN saRNA 在人成纤维细胞中激活 ELN mRNA 表达。用图中所示的 saRNA（50 nM）转染正常人原代成纤维细胞 NHDF 和 Hs27 细胞 72 小时。用 RT-qPCR 分析 ELN 基因的 mRNA 表达。同时扩增 GAPDH 或/和 HPRT1 作为内参基因。(A) ELN saRNA 在 Hs27 细胞中的初步筛选实验结果。图中柱状图上的数字代表相对于对照处理（Mock）的 ELN mRNA 表达的改变倍数。（B）和（C)分别为转染所示的 saRNA 至 NHDF 与 Hs27 细胞所致的 ELN mRNA 表达改变。ELN/HPRT1 和 ELN/GAPDH 分别为 ELN 的表达值用内参基因 HPRT1 和 GAPDH 矫正的结果（平均值±SEM，n=2）。*, P<0.05, ***, P<0.0003, ****, P<0.0001

图 5 为 ELN saRNA 在人成纤维细胞中激活 ELN 蛋白表达。用图中所示的 saRNA（50 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时。用蛋白印迹法分析 ELN 蛋白表达。同时检测 GAPDH 蛋白水平作为内参。对照处理（Mock）为空白处理对照，dsControl 为无关序列双链 RNA 对照。用 Image Lab（BIO-RAD, Chemistry Doc^{tm} MP 成像系统)分析蛋白印迹条带的强度并在图中表示为相对于对照处理(Mock)的改变倍数值。A) ELN saRNA 在 Hs27 细胞中的免疫印迹结果。B）为转染所示的 saRNA 至 Hs27 细胞所致的 ELN 蛋白质表达的相对改变倍数。

图 6 为靶向 COL1A1 的 saRNA 在人成纤维细胞 Hs27 中激活 COL1A1 mRNA 表达。用图中所

示的 saRNA（50 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时。用 RT-qPCR 分析 COL1A1 基因的 mRNA 表达，同时扩增 GAPDH 作为内参基因。图中柱状图上的数字代表相对于对照处理（Mock）的 COL1A1 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2）

图 7 为靶向 COL1A2 的 saRNA 在人成纤维细胞中激活 COL1A2 mRNA 表达。用图中所示的 saRNA（50 nM）转染人成纤维细胞（NHDF 细胞）72 小时。用 RT-qPCR 分析 ELN 基因的 mRNA 表达。同时扩增内参基因 GAPDH 作为内参基因。图中柱状图上的数字代表相对于对照处理（Mock）的 COL1A2 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2） 。

图 8 为靶向 COL3A1 的 saRNA 在人成纤维细胞中激活 COL3A1 mRNA 表达。用图中所示的 saRNA（10 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时，用 RT-qPCR 分析 COL3A1 基因在转染细胞中的 mRNA 表达。同时扩增 GAPDH 作为内参基因。柱状图代表相对于对照处理（Mock）的 COL3A1 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2 ）。siCOL3A1 为 COL3A1 的 siRNA。

图 9 为靶向 HAS1 的 saRNA 在人成纤维细胞中激活 HAS1 mRNA 表达。用图中所示的 saRNA（10 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时，用 RT-qPCR 分析 HAS1 基因在转染细胞中的 mRNA 表达。同时扩增 GAPDH 作为内参基因。柱状图代表相对于对照处理（Mock）的 HAS1 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2 ）。siHAS1 为 HAS1 的 siRNA。

图 10 为靶向 HAS2 的 saRNA 在人成纤维细胞中激活 HAS2 mRNA 表达。用图中所示的 saRNA（10 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时，用 RT-qPCR 分析 HAS2 基因在转染细胞中的 mRNA 表达。同时扩增 GAPDH 作为内参基因。柱状图代表相对于对照处理（Mock）的 HAS2 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2 ）。siHAS2 为 HAS2 的 siRNA。

图 11 为 HAS3 saRNA 在人成纤维细胞中激活 HAS3 mRNA 表达。 用图中所示的 saRNA（10 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时，用 RT-qPCR 分析 HAS3 基因在转染细胞中的 mRNA 表达。同时扩增 GAPDH 作为内参基因。柱状图代表相对于对照处理（Mock）的 HAS3 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2 ）。siHAS3 为 HAS3 的 siRNA。

图 12 为靶向 HAS1、HAS2 和 HAS3 的 saRNA 在 Hs27 成纤维细胞中促进细胞产生透明质酸。Hs27 细胞用所示的 saRNA 在 50 nM 的终浓度转染 72 小时，收集细胞的培养基用 ELISA 法检测培养基中的透明质酸的含量。图示为相对于对照（Mock）处理的透明质酸含量的改变（两次实验结果的平均值±SD）。虚线指示 Mock 处理的值。

图 13 为靶向 MFAP2 的 saRNA 在人成纤维细胞中激活 MFAP2 mRNA 表达。用图中所示的 saRNA（10 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时，用 RT-qPCR 分析 MFAP2 基因在转染细胞中的 mRNA 表达。同时扩增 GAPDH 作为内参基因。柱状图代表相对于对照处理（Mock）的 MFAP2 mRNA 表达的改变倍数（平均值±SEM，n=2 ）。siMFAP2 为 MFAP2 的 siRNA。

具体实施方式

在本发明中，相关术语采用如下定义：

如本文所用的术语“互补”是指两条寡核苷酸链彼此形成碱基对的能力。碱基对通常由反向平行的寡核苷酸链中的核苷酸之间通过氢键形成。互补寡核苷酸链可以 Watson-Crick 方

式碱基配对（例如，A-T，A-U，C-G），或以允许形成双链体的任何其他方式（例如 Hoogsteen 型或者反向 Hoogsteen 型碱基配对）进行碱基配对。

互补包括完全互补和不完全互补两种情况。完全互补或 100%互补是指双链寡核苷酸分子的双链区中来自第一条寡核苷酸链的每个核苷酸可以与第二条寡核苷酸链相应位置的核苷酸形成氢键而没有“错配”的情况。不完全互补是指两条链的核苷酸单元不能全部互相氢键结合的情况。例如，对于两条双链区为 20 个核苷酸长度的寡核苷酸链，如果每条链上只有两个碱基对可以彼此氢键结合，则寡核苷酸链展现出 10%的互补性。在同一实例中，如果每条链上的 18 个碱基对可以彼此氢键结合，则寡核苷酸链展现出 90%的互补性。实质互补是指至少约 75%，约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%或 99%的互补。

如本文所用的术语“寡核苷酸”是指核苷酸的聚合物，并且包括但不限于 DNA，RNA 或 DNA/RNA 杂交体的单链或双链分子，包括规则地和不规则地交替的脱氧核糖基部分和核糖基部分的寡核苷酸链，以及这些种类的寡核苷酸的修饰和以及天然存在的或非天然存在的骨架。本发明中所述的用于激活靶基因转录的寡核苷酸为小激活核酸分子。

如本文所用的术语“寡核苷酸链”和“寡核苷酸序列”可互换，是指 35 个以下碱基的短链核苷酸的总称（包括脱氧核糖核酸 DNA 或核糖核酸 RNA 内的核苷酸）。在本发明中，寡核苷酸链的长度可以是 16 至 35 个核苷酸的任一长度。

如本文所用的术语“基因”是指编码一条多肽链或转录一条功能 RNA 所需的全部核苷酸序列。“基因”可以是对于宿主细胞而言内源的或完全或部分重组的基因（例如，由于引入编码启动子的外源寡核苷酸和编码序列或将邻近内源编码序列的异源启动子导入宿主细胞）。例如，术语“基因”包括可以由外显子和内含子组成的核酸序列。编码蛋白质的序列是，例如，包含在起始密码子和终止密码子之间的开放阅读框中的外显子内的序列，如本文所用，“基因”可以指包括例如基因调控序列例如启动子，增强子和本领域已知的控制另一基因的转录，表达或活性的所有其他序列，无论另一基因是否包含编码序列或非编码序列。在一种情况下，例如，“基因”可以用于描述包含调控序列例如启动子或增强子的功能性核酸。重组基因的表达可以通过一种或多种异源调节序列来控制。

如本文所用的术语“靶基因”可以是天然存在于生物体中的核酸序列、转基因、病毒或细菌序列、染色体或染色体外和/或瞬时或稳定转染或掺入细胞和/或其染色质。靶基因可以为蛋白质编码基因，也可为非蛋白编码基因（例如微小 RNA 基因、长链非编码 RNA 基因）。靶基因通常含有启动子序列，设计与启动子序列具有同一性（也称同源性）的小激活核酸分子可以实现对靶基因的正向调控，表现为靶基因表达的上调。“靶基因启动子序列”是指靶基因的非编码序列，在本发明中涉及“与靶基因启动子序列互补”中靶基因启动子序列是指该序列的编码链，亦称非模板链，即为与该基因编码序列为同一序列的核酸序列。“靶点序列”是指靶基因启动子序列中小激活核酸分子的正义寡核苷酸链或反义寡核苷酸与之同源或互补的序列片段。

如本文所用，术语“正义链”、“正义寡核苷酸链”可互换，小激活核酸分子的正义寡核苷酸链是指小激活核酸分子双链体中含与靶基因的启动子序列的编码链具有同一性的第一核

酸链。

如本文所用，术语“反义链”、“反义寡核苷酸链”可互换，小激活核酸分子的反义寡核苷酸链是指小激活核酸分子双链体中与正义寡核苷酸链互补的第二核酸链。

如本文所用的术语“编码链”是指靶基因中不能进行转录的那一条 DNA 链，该链的核苷酸序列与转录生成的 RNA 的序列一致（在 RNA 中是以 U 取代了 DNA 中的 T）。本发明中所述的靶基因启动子双链 DNA 序列的编码链是指与靶基因 DNA 编码链在同一条 DNA 链上的启动子序列。

如本文所用的术语“模板链”是指靶基因的双链 DNA 中与编码链互补的另一条链，可作为模板转录为 RNA 的那条链，该链与转录的 RNA 碱基互补（A-U，G-C）。在转录过程中，RNA 聚合酶与模板链结合，并沿着模板链的 3'→5'方向移动，按照 5'→3'方向催化 RNA 的合成。本发明中所述的靶基因启动子双链 DNA 序列的模板链是指与靶基因 DNA 模板链在同一条 DNA 链上的启动子序列。

如本文所用的术语“启动子”是指通过与蛋白质编码或 RNA 编码核酸序列在位置上关联而对它们的转录发挥调控作用的序列。通常，真核基因启动子包含 100~5,000 个碱基对，尽管此长度范围并不意味着限制本文所用的术语“启动子”。虽然启动子序列一般位于蛋白质编码或者 RNA 编码序列的 5'端，但启动子序列也可存在于外显子及内含子序列中。

如本文所用的术语“转录起始位点”是指在基因的模板链上标志转录起始的核苷酸。转录起始位点可出现于启动子区的模板链上。一个基因可以有多于一个的转录起始位点。

如本文所用的术语“同一性”或“同源性”是指小激活 RNA 的其中一条寡核苷酸链（正义链或者反义链）与靶基因的启动子序列的某一区域的编码链或者模板链存在的相似性。在本文中，所述“同一性”或“同源性”可以是至少约 75%，约 79%，约 80%，约 85%，约 90%，约 95%或 99%。

如本文所用的术语“突出”、“overhang”、“悬垂”可互换，是指寡核苷酸链末端（5'或 3'）非碱基配对核苷酸，其是由延伸超出双链寡核苷酸内的其中一条链的另一条链产生的。延伸超出双链体 3'和/或 5'端的单链区域被称为突出。

如本文所用，术语“基因激活”或“激活基因” 或“基因上调”或“上调基因”可互换，是指通过测量基因转录水平、mRNA 水平、蛋白水平、酶活性、甲基化状态、染色质状态或构型、翻译水平、或其在细胞或生物系统中的活性或状态来测定某一核酸转录、翻译或表达或活性的增加。这些活动或状态可以直接或间接的测定。此外，“基因激活”、“激活基因”、“基因上调”、“上调基因”是指与核酸序列相关的活性增加，而不管发生这种激活的机制如何，例如其作为调节序列发挥调控作用、被转录成 RNA，被翻译为蛋白质并增加蛋白质的表达。

如本文所用，术语“小激活 RNA”、“saRNA”、“小激活核酸分子”可互换，是指能够促进基因表达的核酸分子，并且可以由包含与靶基因的非编码核酸序列（例如启动子、增强子等）具有序列同一性的核苷酸序列的第一核酸片段（反义链，也称反义寡核苷酸链）和包含与第一核酸片段互补的核苷酸序列的第二核酸片段（正义链，也称有义链或正义寡核苷酸链）

组成，其中所述第一核酸片段和第二核酸片段形成双链体。小激活核酸分子也可以由合成的或者载体表达的可形成双链区发夹结构的单链 RNA 分子组成，其中第一区域包含与基因的启动子靶序列具有序列同一性的核苷酸序列，第二区域包含的核苷酸序列与第一区域互补。小激活核酸分子的双链体区域长度通常为约 10 至约 50 个碱基对、约 12 个至约 48 个碱基对、约 14 个至约 46 个碱基对、约 16 个至约 44 个碱基对、约 18 个至约 42 个碱基对、约 20 个至约 40 个碱基对、约 22 个至约 38 个碱基对、约 24 个至约 36 个碱基对、约 26 个至约 34 个碱基对、约 28 个至约 32 个碱基对、通常约 10 个、约 15 个、约 20、约 25、约 30、约 35、约 40、约 45、约 50 个碱基对。此外，术语“saRNA”、“小激活 RNA”和“小激活核酸分子”还含有除核糖核苷酸部分之外的核酸，包括但不限于修饰的核苷酸或类似物。

如本文所用，术语“热点”是指长度至少为 30 bp 的基因启动子区域，在这些区域，呈现出功能性小激活核酸分子靶点的聚集，即靶向这些热点区域的小激活核酸分子至少 30%能够诱导靶基因 mRNA 表达达到 1.2 倍或以上。

如本文所用，术语“合成”是指寡核苷酸的合成方式，包括任何能够合成 RNA 的方式，例如化学合成、体外转录、载体表达等。

本发明提供的小激活核酸分子的制备方法包括序列设计和序列合成。

所述小激活核酸分子序列的合成可以采用化学合成的方法，或者委托专门从事核酸合成的生物技术公司合成。

一般来说，所述化学合成的方法包括以下四个过程：（1）寡聚核糖核苷酸的合成；（2）脱保护；（3）纯化分离；（4）脱盐及退火。

例如，本发明所述 saRNA 化学合成的具体步骤如下：

（1）寡聚核糖核苷酸的合成

在自动 DNA/RNA 合成仪（例如，Applied Biosystems EXPEDITE8909）上设定合成 1 微摩尔的 RNA，同时设定每个循环的偶联时间为 10-15 分钟，起始物为固相连接的 5’-O-对二甲氧基三苯甲基-胸苷支持物，第一个循环在固相支持物上连接一个碱基，然后在第 n 次（19≥n≥2）循环中，在第 n-1 次循环所连接的碱基上连接一个碱基，重复此循环直至完成全部核酸序列的合成。

（2）脱保护

将连接有 saRNA 的固相支持物加入到试管中，并在此试管中加入 1 毫升的乙醇/氨水溶液(体积比为 1：3)，然后密封，置于 25-70℃温箱中，孵育 2-30 小时，过滤含有 saRNA 的固相支持物的溶液并收集滤液，用双蒸水淋洗固相支持物 2 次（每次 1 毫升）并收集滤液，合并收集洗脱液，在真空条件下干燥 1-12 小时。然后，加入 1 毫升四丁基氟化铵的四氢呋喃溶液（1M），室温放置 4-12 小时，再加入 2 毫升正丁醇，高速离心收集沉淀即得到 saRNA 单链的粗产物。

（3）纯化分离

将得到的 saRNA 的粗产物溶解于 2 毫升浓度为 1 摩尔/毫升的乙酸铵水溶液中，然后通

过高压液相色谱反相 C18 柱进行分离，得到纯化的 saRNA 单链产物。

（4）脱盐及退火

用体积排阻凝胶过滤法去除盐份，将正义链和反义链的寡聚核糖核酸单链按相同摩尔比混合在 1-2 毫升的缓冲液中（10 mM Tris，pH＝7.5-8.0，50 mM NaCl），将此溶液加热至 95℃，然后缓缓将此溶液冷却至室温，得到含有 saRNA 的溶液。

下面结合具体实施例及附图，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press，1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例一 靶向基因启动子的小激活核酸分子设计与合成

从 UCSC 基因组数据库（genome.ucsc.edu）获得靶基因（表 1）从转录起始位点（TSS）到上游-500 或者-1000 bp 的正义启动子序列，以此序列为模板，从 TSS 到最上游选取大小为 19 bp 的靶点，要求靶点必须满足以下特征：1）GC 含量在 35%~65％之间；2）不含有 5 个或者多于 5 个的连续同一核苷酸，如“AAAAA”；3)不含多于 3 个的二核苷酸重复序列，如“CTCTCTCT”；4）不含多于 3 个的三核苷酸重复序列，如“ACTACTACTACT”。在满足上述标准的基础上，优选满足以下特征的靶点作为候选 saRNA 的靶点：1）靶点区域位于基因启动子从-100 到 -500 bp 或从-100 到 -1000 bp 区间；2）靶点对应的 saRNA 双链体具有不对称热力学稳定性，即 3’端的热动力学稳定性低于 5’端。

表 1. 靶向皮肤相关基因的 saRNA 的设计

基因	设计 saRNA 用启动子序列长度 (bp)	候选 saRNA 数量
AQP3	1000	20
AQP9	500	20
ELN	1000	12
COL1A1	500	11
COL1A2	500	12
COL3A1	500	20
HAS1	500	12
HAS2	500	20
HAS3	500	10
MFAP2	500	20

使用的上述各基因启动子序列具体如下：

AQP3 启动子序列（1000bp）(SEQ ID NO:373)

-1000 gtggaggttg cagggagccg agatcacgcc attgcactcc acctaggcga
-950 cagagagaga ctccgtctaa aaaaaaaaaa gagacagact cttccttggc
-900 tgggggtaag tcagatggga gaggagaggg ttaaaaacag ctgggactca
-850 gcctgctggc aaacatgtgg catgtggcat gtcggggcaa ctgcagctca
-800 gcctctggag ccatgtgagc aatgcacgca ggtacacgtg tgacaagcta
-750 ggtcacctag ccatgttcaa caggcatgtg cacagccacg aggaatgccc

-700 agccgtacaa ttaggcacac aggacatccg ccatgtgtag acacagctgt
-650 ggacatagct ggccaggaca tgcgacacac gacgtgctca tagcacaggg
-600 agaagggccc atgaagtctg gttggaactc agcacgtgtg tctgtgtgcc
-550 cacctgagtc tggactgctg cccctctgac actagctgtc cccttgaagg
-500 gtcggtgcct tatctgtcct gacagaagag acagtgttgc ttctcacttg
-450 gggctcgcag cctcctcctc ctgcctcgaa ctgaggatct gttgggtcca
-400 gtcatcctgg agagatgcgg ccagtttctt tctgacaggt ctcctcctgc
-350 ccgcaaggaa gtggggtgat cacagggcgc aggtggtctc tatgacagct
-300 gcatcctctc cagccatggc cctgaaccct gcctataatc ccaccattgg
-250 ctctcagatc tgcctaagcc tctcagcccc cttgacgtcc cctcccttaa
-200 gcgccctccg aaggccaccc gtccctcaaa gctcctcaca ctccatgccc
-150 gcagctccct ccacccggcg tccgcaccag cctcccagcc gaggtggggc
-100 gggggcgagg gggcgcgcac tcctcggcgc tccgggactg cagggcgggg
-50 ctgcagggcg ggcggggccc gtgtctccag cgctcctata aagggagcca

AQP9 启动子序列（500bp）(SEQ ID NO:374)
-500 tattttcaaa ctggaatgct tcttcagaag aaacccaaac tggaatgttt
-450 cttcagaaga aacttcagaa gtcaccaaaa aggtgactcc tccatctttc
-400 tgattcttgg atcctaaagt atcttcagca agtgaagccc agtttcataa
-350 ccgaagaggt gactccatct gtcctacaga cttgcagtgt gaagcttgca
-300 atggtttctc tgtatgttaa tttctccatc tctaggatgg cctatgtggt
-250 tcttactaac ctcagagtgg tatcatgaag ccactgaaat gataccagaa
-200 gaaaacaaga gtgattaatc ttctaggatg ataaatctat attttcttca
-150 aattcttcat tttgcataaa aacctttttc agaaaagaat gttaacattg
-100 gatatatcta cacctgattt gacagttcca aactacaccc caaccaccca
-50 cttctgaatg agaagaaaaa aaaatcagaa gcctgcaatt gtgtaacatg

ELN 启动子序列（1000bp）(SEQ ID NO:375)
-1000 tcctattctc taggtctcac atttcttctc ctctagcagt agtgggaagt
-950 gaggggtggg ggacacgacc ctcccctgtt ccatcccaca ctccaacccc
-900 caaaatcccc cagggtcccc gtccagctca gtcctggggg cagaaatgca
-850 gagttctcca ggaacgtggt cccagctgtt tcagtgcagg ccgccccctc
-800 ctggccacca gcggaatgtc agccttccca gaggggccgg gagaacagca
-750 gtcgagaagc tcccagactg gtgtgggcgc tagctgtgct cagcgtgggg
-700 atgggaggtg acccagtgat aatgggaagc tgggctgcct gtcagtctgc
-650 gggggggctcc cacctccctg ttccccccaca gggcacctgg ggatccagcc
-600 tgatttttac cagaccctgc ggcctgcatg gggctgggta tagggctgtg
-550 accttgaccc atgcagaata gaaccctgtg tgtcgggatc ctccatgtgc
-500 tccagatgcc cctggggaca gcaccaacat ggccttaact cccaagccat
-450 tcccctgcct ctaacccccct ggcatctgca ggcatccacc ccagacccac
-400 ccaacacctc ctccccagct tcaggcgcta ggcagagacc ttggcccctg
-350 cagaatgcag ccctgtccag ggtcccctac cttcccccca gatcccctcc
-300 agagcaatac caacccgggc ctaccttcca ggccattcaa cctgcagccc
-250 cccggcctct gtagacatcg caccccccaa accccagac ctgcccaatg
-200 cctcccctcc ccagctttgg gcagaacctg tctctagcca gacctggggg
-150 tgttggggag tctggagggc cggggtgggg gctgaggcgc gggacagctg
-100 gcccgtatcc tcacactggg cccgggggccc agccggaggg gcgggggcct
-50 ggccactcgg gccttggctg gggctgggat ttttggcctg gccgccaggc

COL1A1 启动子序列（500bp）(SEQ ID NO:376)

-500 gttttggaga ggtcctcagc atgcctcttt atgcccctcc cttagctctt
-450 gccaggatat cagagggtga ctggggcaca gccaggagga ccccctcccc
-400 aacaccccca acccttccac ctttggaagt ctccccaccc agctccccag
-350 ttccccagtt ccacttcttc tagattggag gtcccaggaa gagagcagag
-300 gggcaccccc acccactggt tagcccacgc cattctgagg acccagctgc
-250 acccctacca cagcacctct ggcccaggct gggctggggg gctggggagg
-200 cagagctgcg aagaggggag atgtggggtg gactcccttc cctcctcctc
-150 cccctctcca ttccaactcc caaattgggg gccgggccag gcagctctga
-100 ttggctgggg cacgggcggc cggctccccc tctccgaggg gcagggttcc
-50 tccctgctct ccatcaggac agtataaaag gggcccgggc cagtcgtcgg

COL1A2 启动子序列（500bp）(SEQ ID NO:377)

-500 atgagcctca gcaaaggcaa gctaggaggt cgaaggactt ccccaggtga
-450 ctcggtctag tctagagttc gcaaagccta tcctccctgt agccgggtgc
-400 caagcagcct cgagcctgct ccccagccca cctgccaaca aaaggcgccc
-350 tccgactgca acccagcccc ccacagacag gacccgcccc ttcccgaagt
-300 cataagacaa agagagtgca tcactgctga aacagtgggc gcacacgagc
-250 cccaaagcta gagaaaagct ggacgggggct gggggcgggg tgcaggggtg
-200 gaggggcggg gaggcgggct ccggctgcgc cacgctatcg agtcttccct
-150 ccctccttct ctgcccccte cgctcccgct ggagccctcc accctacaag
-100 tggcctacag ggcacaggtg aggcgggact ggacagctcc tgctttgatc
-50 gccggagatc tgcaaattct gcccatgtcg gggctgcaga gcactccgac

COL3A1 启动子序列（500bp）(SEQ ID NO:378)

-500 tgatatttgc ctgaaactta acttctagga cccagggtgg gtggatgagt
-450 cgaaggggca tacggtggca tttctttccg tgagtctctt acagtctcct
-400 atttaaattg agttaggatt acttctggca aaatcccaac ataaaaatct
-350 tctaggaaga tcagttctgt aaattagaca tactagataa atgggcatca
-300 agcagttttt caaaattatg cagttgttaa cttcataagg ggaaataaaa
-250 atgtatgcat ttacattgta tgtattaaaa caaggcagag catttctata
-200 cgttcctaag ttatacaaac atatatgtaa gagtgaaata tgtaaaaaaa
-150 cttttacata agcagatgca tacaaactcc agatgtgctc tttttcttac
-100 tgtgggttgt gtcttctata agggaaaaag aaatatttat catttctttt
-50 actgctgagg ggatgggtgc ggctctcata tttcagaaag gggctggaaa

HAS1 启动子序列（500bp）(SEQ ID NO:379)

-500 agagaagtgg agaggaagaa agggatggag agaaagacag aaacttggag
-450 aaatgtggta atggggagag agatgagggt accaacaaag agatgaggag
-400 aaatagtggg ttagggagaa agaaagggat ggagggaaat acagggatag
-350 gggatgggggg gatgaggggga acccccaaaa tgcaagtgag gtggaagaga
-300 aaaatcaggg gagacaaggg acgagagggg ggaggaagag agaagaagac
-250 atagaggagg gagggagagg agggggagtg atggcagaga ggactagagg
-200 aggggcgcgg gtagacatgg gggcctggga agggaggccc gtctggctga
-150 gggggggtggg agtaatagcg ggaagcgggt ggagctgccc ggctgggccg
-100 tgacctcaga gcccctggcc cagcttagcc tgactgacgt cagcgctcgc
-50 tcccgccccc gcctgcgctg gtcttcaaat gacccccctc cagctctctg

HAS2 启动子序列（1000bp）(SEQ ID NO:380)

-1000 ggagtggtgg ggggaggagt aaccaaaaaa cgaactctac ccagccttgg
-950 ggcattgtga aaacgacgag gaaaggccat ctccaagcaa gacatatttg
-900 tcctcgtcaa ctttgcagaa ggcttgcaaa aagcaaaagc cagttaagcc
-850 atttccttca agatggctaa atataagtcc tccagaaaac aatttttatt
-800 attttatttt taatgcgcgc tgtttgagta tgtttacgtt aggggaccag
-750 attgagcaaa aatatacata taattacttt tctatgtttt ccgcccaccc
-700 acggcagaaa cctctttatg agaaaggctt tgacacttga cgtcagctca
-650 gaaacttttg agttggcggg aagaaagggt taacaagtgg tggaccagcg
-600 cgatcttttt agagtcccag ccggctgtcg aaggctccag gtacacacac
-550 acacgcacac acttacacac acacacacac acgtgcacac acccctccca
-500 actgttcctc cttgggtcgg ttacttagct gaagggcacc atttggcttt
-450 aaaacaaatt acttcagcgc cacagggagt ttatcgcttg gagggaactt
-400 gtaacgcggg agttcaggga aatccaagag gcgagggctc ccacctccgc
-350 cgccagagga aagtaaggaa tcaggtggtg gccccctatg tgtcttgcat
-300 ttctctgcac acgttagcaa tcaagttaat tgaattcatt ggagtttaga
-250 accggcctgt agctcagaga aggctttgaa tggccaattt ctctctctcc
-200 ctctcccccc ccccgcctcc cgctcgcccg cccgcccgcg ctcccagttc
-150 cctccccctca gggttcccca gtccacacct ccctctccac ttccctcacc
-100 ccccccactcc ctccgccgcc ctattaaaac acccaccagc tcacttgtta
-50 agacccccct aagttggagg aggcagaagg gcaacaacgg cggggaagga

HAS3 启动子序列（500bp）(SEQ ID NO:381)

-500 gtggtgcgat ttcagctcac tgcaacctcc acctgcgggg ttcaagcgat
-450 tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg attacgggca tggtgcccgt
-400 aacgccgaaa gtgctgagat tacaggcttg agccacggcg cccggccact
-350 catttttaa aaactagtta ttaattataa tttctcttca agttttcctg
-300 agatgtaaaa actcatcgcc ttcagctggt tctaaacttc ttgtctctgc
-250 taacaactct ccccccctcct cgatctcacc ccaccccagt gcaccccaac
-200 tcacttcatc tcactttact cgagtctagc actatctttt agggacctga
-150 aaactactgt cgataaggtc agttgggaat ttaggaggtc atggatgtcg
-100 gaaataaagg tgtgaaaaag aagaggagga attgttttgg ctttaagaca
-50 ccggaacctc caaggttcct acaaaaccgt ttgcagcttt tgcaaaccgc

MFAP2 启动子序列（500bp）(SEQ ID NO:382)

-500 ggacatttgt gggacacata ggctgggtca gggctgaaag aggtgctggt
-450 tatggccggg ggcagggact catgcctgta atcccaacag cccaggagga
-400 tgagacagga ggaatgcttg aggccaaaat ttcgaggccg gaagttccag
-350 acgagcctgg gcaacacagc aagaccctgt ctctagaaaa ggaaagaaag
-300 aaccgctggt tgtggaagcc agccatggcc cagagctcag cagtgtagga
-250 gaggagggtg cgggcctgag agaggcagca ggcttggctg gagaggcaga
-200 aggaaaacca aggcaggaga gtgtcctgga agctgggaga aggcagaggg
-150 agatcgaggc ttactttctg gctgaggggc ctagggtgag tcactttggg
-100 aggcttgatt tcctcctctg tgaaatgggc aacacaccta cccttgccca
-50 cctcaccccc ctcaccccgt cgacgtcgag tgaggagcag ctgtgaggag

在确定 saRNA 的靶点序列后，生成 saRNA 双链体序列，步骤如下：1）基于靶点的 DNA 序列生成长度为 19 个核苷酸的 saRNA 的正义链核糖核苷酸序列。该核糖核苷酸序列与靶点序列完全一致，除了其中的“T”被替换成“U”；2）以 saRNA 的正义链为模板生成与正义链互补的长度为 19 个核苷酸的 saRNA 的反义链核糖核苷酸序列；3)分别在正义链和反义链序列的 3’末端加上 2 个脱氧胸腺核苷“dTdT”，最后所得 saRNA 双链体的正义和反义链的长度均为 21 个核苷酸。

基于这些候选序列，化学合成相应的双链小激活 RNA。其中，该实验中使用的双链小激活 RNA 的正义和反义链的长度均为 21 个核苷酸，所述双链 saRNA 的第一核糖核酸链（正义链）的 5’区域的 19 个核苷酸与启动子靶点序列具有 100%的同一性，其 3’末端含有 dTdT 序列；第二核糖核酸链的 5’区域的 19 个核苷酸与第一核糖核酸链序列完全互补，其 3’末端含有 dTdT 序列。将前述双链 saRNA 的两条链以同等量的摩尔数混合，退火后形成双链 saRNA。

实施例二 针对水通道蛋白基因、弹性蛋白基因、胶原蛋白基因、透明质酸基因和微纤维相关蛋白基因的活性 saRNA 筛选

（1）细胞培养和转染

正常人原代成纤维细胞 Hs27 和 NHDF 购自北京北纳创联生物技术研究院，产品号分别为 BNCC341921 和 BNCC340692。正常人表皮角质形成细胞（NHEK）购至北京北纳创联生物技术研究院（产品号:BNCC340593）。细胞培养在高糖 DMEM 培养基（Gibco）中；所有培养基含有 10%胎牛血清（Gibico）和 1%青霉素/链霉素（Gibco）。细胞在 5%CO_2，37℃条件下培养。细胞以每孔 5×10^6 细胞接种在 6 孔板中，使用 RNAiMAX 转染试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA)，按照其反向转染方法以 10 nM 的终浓度（除非另有说明）转染 saRNA 到细胞中，转染持续时间为 72 小时（除非另有说明）。对照处理包括 Mock（为省略核酸双链体的转染处理）、无关对照核酸双链体（dsControl）处理。其中 dsControl 正义链及反义链的序列分别为 5’-ACUACUGAGUGACAGUAGATT-3’（SEQ ID No: 383）和 5’-UCUACUGUCACUCAGUAGUTT-3’（SEQ ID No: 384），它们与人基因组已知序列无明显同源性。

（2）RNA 提取及 RT-qPCR

使用 RNeasy Plus Mini 试剂盒（Qiagen）按照其说明书提取细胞总 RNA。使用含有 gDNA Eraser（Takara，Shlga，Japan）的 PrimeScript RT 试剂盒将 RNA（1 μg）反转录为 cDNA。RT-qPCR 采用 ABI 7500 快速实时 PCR 系统（Applied Biosystems）和 SYBR Premix Ex Taq II（Takara，Shlga，日本）试剂，每个样本重复 3 个复孔扩增，反应条件为：95℃ 3 秒，60℃ 30 秒，扩增 40 个循环。以 HPRT1 或者 GAPDH 为内参基因。所用引物序列列于表 2 中。

表 2. RT-qPCR 分析使用的引物序列

基因	引物名称	序列 (5'-3')
AQP3	AQP3-OSqF2	CACTCTGGGCATCCTCATCG (SEQ ID NO:385)
	AQP3-OSqR2	GCGAAGTGCCAGATTGCATCATA (SEQ ID NO:386)
AQP9	AQP9-F	TCCTCAGAGAAGCCCCAAGA (SEQ ID NO:387)
	AQP9-R	AGCCACATCCAAGGACAATCA (SEQ ID NO:388)
COL1A1	COL1A1-OSqF2	CGGCTCAGAGTCACCCAC (SEQ ID NO:389)
	COL1A1-OSqR2	AAGTCCAGGCTGTCCAGGG (SEQ ID NO:390)
COL1A2	COL1A2-OSqF1	CAGCCGGAGATAGAGGACCA (SEQ ID NO:391)
	COL1A2-OSqR1	CAGCAAAGTTCCCACCGAGA (SEQ ID NO:392)
COL3A1	COL3A1-F	CCAGGAGCTAACGGTCTCAG (SEQ ID NO:393)
	COL3A1-R	CAGGGTTTCCATCTCTTCCA (SEQ ID NO:394)
ELN	ELN-OSqF1	TCCTGGTGGAGTTCCTGGAG (SEQ ID NO:395)
	ELN-OSqR1	CCGGGAACTGGCTTAAGAGG (SEQ ID NO:396)
HAS1	HAS1-F	TAGGAATAACCTCTTGCAGCAGT (SEQ ID NO:397)
	HAS1-R	GACCTGGAGGTGTACTTGGT (SEQ ID NO:398)
HAS2	HAS2-F	CAGAATCCAAACAGACAGTTC (SEQ ID NO:399)
	HAS2-R	TAAGGTGTTGTGTGTGACTGA (SEQ ID NO:400)
HAS3	HAS3-F	GGAAGGTTTTGCTGCCTTGG (SEQ ID NO:401)
	HAS3-R	GCACCGGCATCCTGCAA (SEQ ID NO:402)
MFAP2	MFAP2-F	CAACTTGGTCTCACAGTGGCT (SEQ ID NO:403)
	MFAP2-R	GTGTCAGAGAGGACAGCTGAAAA (SEQ ID NO:404)
HPRT1	HPRT1-F	ATGGACAGGACTGAACGTCTT (SEQ ID NO:405)
	HPRT1-R	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA (SEQ ID NO:406)
GAPDH	GAPDH-qF3	ATCACCATCTTCCAGGAGCGA (SEQ ID NO:407)
	GAPDH-qR3	TTCTCCATGGTGGTGAAGACG (SEQ ID NO:408)

（3）RT-qPCR 数据分析

对于同时扩增了 2 个内参基因的 RT-qPCR 数据分析，为了计算某个 saRNA 转染样本的目的基因相对于对照处理（mock）的表达值（Erel），用公式 1 代入目的基因及 2 个内参基因的 Ct 值计算。

$$E_{rel} = 2^{(CtTm-CtTs)} / ((2^{(CtR1m-CtR1s)} * 2^{(CtR2m-CtR2s)})^{(1/2)}) \quad \text{(公式 1)}$$

其中，CtTm 为来自对照处理（mock）样本的目的基因的 Ct 值，CtTs 为来自 saRNA 处理样本的目的基因的 Ct 值，CtR1m 为来自对照处理（mock）处理样本的内参基因 1 的 Ct 值, CtR1s 为来自 saRNA 处理样本的内参基因 1 的 Ct 值, CtR2m 为来自对照处理（mock）处理样本的内参基因 2 的 Ct 值, CtR2s 为来自 saRNA 处理样本的内参基因 2 的 Ct 值。

对于使用了 1 个内参基因的 RT-qPCR 数据分析，为了计算某个 saRNA 转染样本的目的基因相对于对照处理（mock）的表达值（Erel），用公式 2 代入目的基因及内参基因的 Ct 值计算。

$$E_{rel} = 2^{-(CtTs-CtRs)-(CtTm-CtRm)} \quad \text{(公式 2)}$$

其中，CtTm 为来自对照处理（mock）样本的目的基因的 Ct 值，CtTs 为来自 saRNA 处理样本的目的基因的 Ct 值，CtRm 为来自对照处理（mock）处理样本的内参基因的 Ct 值, CtRs 为来自 saRNA 处理样本的内参基因的 Ct 值。

（4）蛋白质印迹

收集细胞，用细胞裂解液(1×RIPA 缓冲液，CST，#9806)裂解。裂解液里加蛋白酶抑制剂 (Sigma, Lot#126M4015v)。BCA 法定量蛋白质样品，随后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳完成后将蛋白样品转移到 0.45 μm 的 PVDF 膜。用兔抗人 AQP3 多克隆抗体(Invitrogen，Cat # PA5-53257)、或兔抗 ELN 多克隆抗体（Invitrogen,Cat # PA5-63369）、或兔抗 ab-微管蛋白多克隆抗体(CST，#2148)或小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体（Sigma，G9295）对抗体对应的蛋白印迹进行检测，二抗用抗小鼠 IgG HRP-连接的抗体(CST，#7076)或抗兔 IgG HRP-连接的抗体(CST, #7074)。用 Image Lab (BIO-RAD, Chemistry Doctm MP 成像系统)扫膜检测信号。

（5）saRNA 对水通道蛋白基因的激活作用

由于人体表皮对于皮肤的保湿最为重要，AQP3 为皮肤细胞最主要的水通道分子。特异性激活 AQP3 对于表皮保湿和改善皮肤外观将提供有益的效果。为了证明靶向 AQP3 启动子的 saRNA 能够激活 AQP3 的表达，申请人设计并合成了 20 个针对 AQP3 启动子的 saRNA，并以 10 nM 的终浓度将这些 saRNA 转染正常人表皮角质形成（NHEK）细胞，转染 72 小时后，RT-qPCR 分析 AQP3 基因的 mRNA 表达，结果如图 1 所示。可以看出，这 20 个 saRNA 中共有 11 个至少增加 AQP3 mRNA 表达量 1.5 倍，其中有 6 个 saRNA 至少增加了 AQP3 mRNA 表达量 2 倍，包括 AQP3-4、AQP3-6、AQP3-7、AQP3-8、AQP3-11 和 AQP3-15；5 个至少增加 AQP3 mRNA 表达量 1.5 至 2 倍，包括 AQP3-3、AQP3-5、AQP3-14、AQP3-16 和 AQP3-19。

为了进一步验证 saRNA 介导的 AQP3 表达上调是否导致蛋白质水平的上调，选取其中 7 个 saRNA（AQP3-4、AQP3-5、AQP3-6、AQP3-7、AQP3-8、AQP3-11 和 AQP3-15）转染 NHEK 细胞，72 小时后，用蛋白印迹法分析 AQP3 的蛋白质表达，结果如图 2 所示。与 mRNA 表达结果一致，这些 saRNA 处理细胞均导致了 AQP3 蛋白水平的显著上调（与对照处理（Mock 比较），≥2 倍）。作为对照处理，AQP3 siRNA（siAQP3，正义链 5'-CCGGCAUCUUUGCUACCUATT-3'(SEQ ID NO:409)；反义链 5'-UAGGUAGCAAAGAUGCCGGTT-3'(SEQ ID NO:410)则下调了 AQP3 的蛋白质表达，符合预期。这些结果表明，靶向 AQP3 启动子的特异性 saRNA 能够在人原代培养的成纤维细胞中分别在 mRNA 水平和蛋白水平上调 AQP3 基因的表达。

AQP9 主要在皮肤角质细胞中表达。以 10 nM 的终浓度分别将 20 个靶向 AQP9 启动子的 saRNA 转染至 NHEK 细胞，72 小时后，RT-qPCR 分析 AQP9 基因的 mRNA 表达。如图 3 所示，与对照处理（Mock）比较，共有 10 个 saRNA 上调了 AQP9 基因的 mRNA 表达达到 1.5 倍以上，其中有 7 个（35%）saRNA（AQP9-2、AQP9-3、AQP9-8、AQP9-10、AQP9-11、AQP9-12、AQP9-15）上调了 AQP9 基因的 mRNA 表达达到 2 倍以上，3 个（15%）saRNA（AQP9-5、AQP9-14、AQP9-17）上调了 AQP9 的 mRNA 表达达到 1.5 至 2 倍。作为对照处理，AQP9 siRNA（siAQP9，正义链 5'-GCAGUUGCAAUGGCCAUUUTT-3'(SEQ ID NO:411)；反义链 5'-AAAUGGCCAUUGCAACUGCT-3'(SEQ ID NO:412)）则下调了 AQP9 mRNA 表达，符合预期。这些结果表明，靶向 AQP9 启动子的特异性 saRNA 能够在人原代培养的成纤维细胞中在 mRNA 水平上调 AQP9 基因的表达。

（6） saRNA 激活 ELN 基因表达

由 ELN 基因编码的弹性蛋白主要从皮肤真皮中的成纤维细胞产生。为了检测 saRNA 是否能够在成纤维细胞中激活 ELN 基因的表达，申请人设计并合成了 12 个靶向 ELN 启动子的 saRNA。将这些 saRNA 分别以 50 nM 的浓度转染至人原代成纤维细胞 Hs27。72 小时后，RT-qPCR 分析细胞中 ELN mRNA 的表达。结果显示有 4 个 saRNA（ELN-1、ELN-5、ELN-9、ELN-10）（约 33.3%）上调 ELN mRNA 表达超过 2 倍（图 4A）。为了验证该初步筛选结果，将 3 个 saRNA（ELN-1、ELN-5 和 ELN-10）以 50 nM 的终浓度分别转染至 NHDF 和 Hs27 细胞 72 小时，RT-qPCR 分析 ELN mRNA 表达。结果显示 ELN-5 和 ELN-10 在该 2 种细胞中均显著上调 ELN 的 mRNA 表达（图 4B 和图 4C）。ELN-1 在 2 种细胞中均诱导 ELN 表达超过 1.5 倍。作为对照处理，ELN siRNA（siELN，正义链 5'-GUCUCGCUGUGAUAGAUCATT-3'(SEQ ID NO:413)；反义链 5'-UGAUCUAUCACAGCGAGACTT-3'(SEQ ID NO:414)则下调了 ELN mRNA 表达，符合预期。

为了进一步在蛋白水平上验证 saRNA 上调 ELN 的表达，同样用 50 nM 的 saRNA 转染 Hs27 细胞 72 小时，提取蛋白质，分析 ELN 蛋白的表达水平。如图 5 所示，与 mRNA 表达结果一致，ELN-1、ELN-5、ELN-9 和 ELN-10 均不同程度地上调了 ELN 蛋白表达，尤其以 ELN-9 为甚。这些结果表明 ELN 基因的表达能够被靶向其启动子的本发明的特异性 saRNA 所激活，并导致其蛋白水平的上调。

（6）saRNA 激活胶原蛋白基因 COL1A1、COL1A2 和 COL3A1 表达

COL1A1 和 COL1A2 基因分别编码 I 型 a1 和 a2 链胶原蛋白，COL3A1 编码 III 型胶原 a1 链。胶原蛋白为真皮层细胞外基质主要成分，主要由成纤维细胞分泌。为了验证 COL1A1 和 COL1A2 基因的表达能否被 saRNA 所激活，申请人设计并筛选了 11 个靶向 COL1A1 基因启动子（COL1A1 saRNA）、12 个靶向 COL1A2 基因启动子（COL1A2 saRNA）和 20 个靶向 COL3A1 基因启动子（COL3A1 saRNA）的 saRNA（表 3）。首先，将 11 个 COL1A1 saRNA 转染至人成纤维细胞 Hs27，72 小时后，RT-qPCR 分析细胞中 AQP9 基因的 mRNA 表达。结果显示，在 50 nM 转染浓度下，有 2 个 saRNA (COL1A1-5 和 COL1A1-8)上调 COL1A1 的 mRNA 表达达到 2.0 倍，3 个 saRNA (COL1A1-2、COL1A1-3 和 COL1A1-4)上调 COL1A1 的 mRNA 表达达到 1.5 倍（图 6）。作为对照处理的 COL1A1 siRNA（siCOL1A1，正义链 5’-CAAUCACCUGCGUACAGAATT-3 ’ (SEQ ID NO:415)；反义链 5 ’ -UUCUGUACGCAGGUGAUUGTT-3’(SEQ ID NO:416)）则下调了 COL1A1 mRNA 表达，符合预期。

同样以 50 nM 的终浓度将 12 个 COL1A2 saRNA 分别转染至 NHDF 细胞，72 小时后，RT-qPCR 分析细胞中 COL1A2 mRNA 表达。结果显示全部 12 个 saRNA 均不同程度上调了 COL1A2 mRNA 的表达，其中 7 个（占 58.3%）saRNA（COL1A2-1、COL1A2-2、COL1A2-3、COL1A2-4、COL1A2-6、COL1A2-9、和 COL1A2-12)上调 COL1A2 mRNA 表达 2 倍以上（图 7）。而作为对照处理的 COL1A2 siRNA（siCOL1A2，正义链 5’-GCUGCUUGCAGUAACCUUATT-3 ’ (SEQ ID NO:417)；反义链 5 ’ -UAAGGUUACUGCAAGCAGCTT-3’(SEQ ID NO:418) ）则下调了 COL1A2 至 0.13 倍，符合预期。

以 10 nM 的终浓度将 20 个 COL3A1 saRNA 转染至 Hs27 细胞，72 小时后 RT-qPCR 分析细胞中 COL3A1 mRNA 表达，结果显示 5 个 saRNA（COL3A1-1、COL3A1-3、COL3A1-6、COL3A1-13 和 COL3A1-14）上调 COL3A1mRNA 的表达达到 2 倍以上（图 8）。作为对照处理的 COL3A1 siRNA（siCOL3A1，正义链 5’- GCUCUGCUUCAUCCCACUATT-3’(SEQ ID NO:419)；反义链 5’- UAGUGGGAUGAAGCAGAGCTT-3’(SEQ ID NO:420))则下调 COL3A1 表达，符合预期。

（7）saRNA 上调 HAS1、HAS2 和 HAS3 基因的表达

透明质酸（HA）由 3 个高度同源的透明质酸合成酶（HAS）基因 HAS1、HAS2 和 HAS3 编码。它们的区别在于其合成率的不同及其合成的 HA 蛋白有不同的链长。申请人针对 HAS1、HAS2 和 HAS3 基因，分别设计了靶向其各自启动子的 12、20、20 个 saRNA （表 3）。分别将这些 saRNA（终浓度为 10 nM）转染至 Hs27，细胞 72 小时后，RT-qPCR 分别分析 HAS1、HAS2 和 HAS3 mRNA 的表达。

如图 9 所示，与对照处理（Mock）组相比，在靶向 HAS1 启动子的 12 个 saRNA 中，2 个（16.7%）saRNA（HAS1-5 和 HAS1-9）上调 HAS1mRNA 表达超过 2 倍；5 个(41.7%) saRNA（HAS1-2、HAS1-3、HAS1-4、HAS1-6 和 HAS1-10）上调 HAS1mRNA 表达 1.5 至 2 倍。如

图 10 所示，在靶向 HAS2 启动子的 20 个 saRNA 中，7 个（35%）saRNA（HAS2-2、HAS2-7、HAS2-8、HAS2-9、HAS2-14、HAS2-18 和 HAS2-19）上调 HAS2 mRNA 表达超过 2 倍；3 个 (15%) saRNA（HAS2-1、HAS2-4 和 HAS2-17）上调 HAS2 mRNA 表达 1.5 至 2 倍。如图 11 所示，在靶向 HAS3 启动子的 20 个 saRNA 中，3 个（15%）saRNA（HAS3-6、HAS3-13 和 HAS3-14）激活 HAS3 表达超过 2 倍；12 个(60%) saRNA（HAS3-1、HAS3-2、HAS3-3、HAS3-7、HAS3-9、HAS3-11、HAS3-12、HAS3-15、HAS3-16、HAS3-18、HAS3-19 和 HAS3-20）上调 HAS 表达 1.5 至 2 倍。

作为对照处理的透明质酸编码基因的 siRNA 序列如下：

siHAS1，正义链 5’- CUGCAUCAGCGGUCCUCUATT-3’(SEQ ID NO:421)；反义链 5’- UAGAGGACCGCUGAUGCAGTT-3’(SEQ ID NO:422)

siHAS2，正义链 5’- CCAGACUACUUAAGGAAAUTT-3’(SEQ ID NO:423)；反义链 5’- AUUUCCUUAAGUAGUCUGGTT-3’(SEQ ID NO:424)

siHAS3，正义链 5’- CCUACAUGCUGGACAUCUUTT-3’(SEQ ID NO:425)；反义链 5’- AAGAUGUCCAGCAUGUAGGTT-3’ (SEQ ID NO:426)

如图 9-11 所示，上述 siRNA 分别抑制了相应基因的表达，符合预期。

（8）saRNA 激活 MFAP2 表达

MFAP2 基因编码一种微纤维相关蛋白，在细胞外基质的弹性纤维组装中起关键作用。为了能够激活 MFAP2 基因的表达，申请人设计了 20 个靶向 MFAP2 基因启动子的 saRNA（表 3），用这些 saRNA（10 nM）转染 Hs27 细胞 72 小时。通过 RT-qPCR 分析 MFAP2 基因的表达。如图 13 所示，8 个（40%）saRNA 上调 MEAP2 mRNA 的表达超过 2 倍，包括 MEAP2-1、MEAP2-3、MEAP2-7、MEAP2-8、MEAP2-14、MEAP2-17、MEAP2-18 和 MEAP2-19；3 个（15%）saRNA 上调 MEAP2 mRNA 的表达 1.5 至 2 倍，它们为 MEAP2-6、MEAP2-16 和 MEAP2-20 。作为对照的 MFAP2 siRNA (siMFAP2) 序列为：正义链 5’- CCCACUAUAGCGACCAGAUTT-3 ’ (SEQ ID NO:427) ；反义链 5’- AUCUGGUCGCUAUAGUGGGT-3’(SEQ ID NO:428)。如图 13 所示，上述 siMFAP2 抑制了 MFAP2 基因的表达，符合预期。

表 3. 活性 saRNA 序列及其活性靶点序列

saRNA	活性 saRNA 靶点序列 (5'-3')	正义序列 (5'-3')	反义序列 (5'-3')
AQP3-2	GCAGGTACACGTGTGACAA (SEQ ID NO:249)	GCAGGUACACGUGUGACAATT (SEQ ID NO:1)	UUGUCACACGUGUACCUGCTT (SEQ ID NO:125)
AQP3-3	CACTAGCTGTCCCCTTGAA (SEQ ID NO:250)	CACUAGCUGUCCCCUUGAATT (SEQ ID NO:2)	UUCAAGGGGACAGCUAGUGTT (SEQ ID NO:126)
AQP3-4	TTGAAGGGTCGGTGCCTTA (SEQ ID NO:251)	UUGAAGGGUCGGUGCCUUATT (SEQ ID NO:3)	UAAGGCACCGACCCUUCAATT (SEQ ID NO:127)
AQP3-5	CCCTGAACCCTGCCTATAA (SEQ ID NO:252)	CCCUGAACCCUGCCUAUAATT (SEQ ID NO:4)	UUAUAGGCAGGGUUCAGGGTT (SEQ ID NO:128)
AQP3-6	GGCTCTCAGATCTGCCTAA (SEQ ID NO:253)	GGCUCUCAGAUCUGCCUAATT (SEQ ID NO:5)	UUAGGCAGAUCUGAGAGCCTT (SEQ ID NO:129)
AQP3-7	TTGACGTCCCCTCCCTTAA (SEQ ID NO:254)	UUGACGUCCCCUCCCUUAATT (SEQ ID NO:6)	UUAAGGGAGGGGACGUCAATT (SEQ ID NO:130)
AQP3-8	TGAAGGGTCGGTGCCTTAT (SEQ ID NO:255)	UGAAGGGUCGGUGCCUUAUTT (SEQ ID NO:7)	AUAAGGCACCGACCCUUCATT (SEQ ID NO:131)
AQP3-9	CTTATCTGTCCTGACAGAA (SEQ ID NO:256)	CUUAUCUGUCCUGACAGAATT (SEQ ID NO:8)	UUCUGUCAGGACAGAUAAGTT (SEQ ID NO:132)
AQP3-10	TGGCTCTCAGATCTGCCTA (SEQ ID NO:257)	UGGCUCUCAGAUCUGCCUATT (SEQ ID NO:9)	UAGGCAGAUCUGAGAGCCATT (SEQ ID NO:133)
AQP3-11	GTGCCTTATCTGTCCTGAC (SEQ ID NO:258)	GUGCCUUAUCUGUCCUGACTT (SEQ ID NO:10)	GUCAGGACAGAUAAGGCACTT (SEQ ID NO:134)
AQP3-14	TCTCTATGACAGCTGCATC (SEQ ID NO:259)	UCUCUAUGACAGCUGCAUCTT (SEQ ID NO:11)	GAUGCAGCUGUCAUAGAGATT (SEQ ID NO:135)
AQP3-15	TGACACTAGCTGTCCCCTT (SEQ ID NO:260)	UGACACUAGCUGUCCCCUUTT (SEQ ID NO:12)	AAGGGGACAGCUAGUGUCATT (SEQ ID NO:136)
AQP3-16	GTCCTGACAGAAGAGACAG (SEQ ID NO:261)	GUCCUGACAGAAGAGACAGTT (SEQ ID NO:13)	CUGUCUCUUCUGUCAGGACTT (SEQ ID NO:137)
AQP3-17	ACCCTGCCTATAAATCCCAC (SEQ ID NO:262)	ACCCUGCCUAUAAAUCCCACTT (SEQ ID NO:14)	GUGGGAUUUAUAGGCAGGGUTT (SEQ ID NO:138)
AQP3-19	GGTCTCTATGACAGCTGCA (SEQ ID NO:263)	GGUCUCUAUGACAGCUGCATT (SEQ ID NO:15)	UGCAGCUGUCAUAGAGACCTT (SEQ ID NO:139)
AQP9-1	CTGGAATGCTTCTTCAGAA (SEQ ID NO:264)	CUGGAAUGCUUCUUCAGAATT (SEQ ID NO:16)	UUCUGAAGAAGCAUUCCAGTT (SEQ ID NO:140)

AQP9-2	ATGGCCTATGTGGTTCTTA (SEQ ID NO:265)	AUGGCCUAUGUGGUUCUUATT (SEQ ID NO:17)	UAAGAACCACAUAGGCCAUTT (SEQ ID NO:141)
AQP9-3	CCTGATTTGACAGTTCCAA (SEQ ID NO:266)	CCUGAUUUGACAGUUCCAATT (SEQ ID NO:18)	UUGGAACUGUCAAAUCAGGTT (SEQ ID NO:142)
AQP9-5	GGTGACTCCATCTGTCCTA (SEQ ID NO:267)	GGUGACUCCAUCUGUCCUATT (SEQ ID NO:19)	UAGGACAGAUGGAGUCACCTT (SEQ ID NO:143)
AQP9-8	CCATCTCTAGGATGGCCTA (SEQ ID NO:268)	CCAUCUCUAGGAUGGCCUATT (SEQ ID NO:20)	UAGGCCAUCCUAGAGAUGGTT (SEQ ID NO:144)
AQP9-10	TGCAGTGTGAAGCTTGCAA (SEQ ID NO:269)	UGCAGUGUGAAGCUUGCAATT (SEQ ID NO:21)	UUGCAAGCUUCACACUGCATT (SEQ ID NO:145)
AQP9-11	TGGTATCATGAAGCCACTG (SEQ ID NO:270)	UGGUAUCAUGAAGCCACUGTT (SEQ ID NO:22)	CAGUGGCUUCAUGAUACCATT (SEQ ID NO:146)
AQP9-12	GACTCCTCCATCTTTCTGA (SEQ ID NO:271)	GACUCCUCCAUCUUUCUGATT (SEQ ID NO:23)	UCAGAAAGAUGGAGGAGUCTT (SEQ ID NO:147)
AQP9-14	GCAATGGTTTCTCTGTATG (SEQ ID NO:272)	GCAAUGGUUUCUCUGUAUGTT (SEQ ID NO:24)	CAUACAGAGAAAACCAUUGCTT (SEQ ID NO:148)
AQP9-15	GCCTATGTGGTTCTTACTA (SEQ ID NO:273)	GCCUAUGUGGUUCUUACUATT (SEQ ID NO:25)	UAGUAAGAACCACAUAGGCTT (SEQ ID NO:149)
AQP9-17	CCACTTCTGAATGAGAAGA (SEQ ID NO:274)	CCACUUCUGAAUGAGAAGATT (SEQ ID NO:26)	UCUUCUCAUUCAGAAGUGGTT (SEQ ID NO:150)
AQP9-19	GTCCTACAGACTTGCAGTG (SEQ ID NO:275)	GUCCUACAGACUUGCAGUGTT (SEQ ID NO:27)	CACUGCAAGUCUGUAGGACTT (SEQ ID NO:151)
AQP9-20	GCCCAGTTTCATAACCGAA (SEQ ID NO:276)	GCCCAGUUUCAUAACCGAATT (SEQ ID NO:28)	UUCGGUUAUGAAACUGGGCTT (SEQ ID NO:152)
ELN-1	GACCTTGACCCATGCAGAA (SEQ ID NO:277)	GACCUUGACCCAUGCAGAATT (SEQ ID NO:29)	UUCUGCAUGGGUCAAGGUCTT (SEQ ID NO:153)
ELN-2	GATCCCTCCCAGAGCAATA (SEQ ID NO:278)	GAUCCCUCCCAGAGCAAUATT (SEQ ID NO:30)	UAUUGCUCUGGGAGGGAUCTT (SEQ ID NO:154)
ELN-4	CCTTGACCCATGCAGAATA (SEQ ID NO:279)	CCUUGACCCAUGCAGAAUATT (SEQ ID NO:31)	UAUUCUGCAUGGGUCAAGGTT (SEQ ID NO:155)
ELN-5	CAGCACCAACATGGCCTTA (SEQ ID NO:280)	CAGCACCAACAUGGCCUUATT (SEQ ID NO:32)	UAAGGCCAUGUUGGUGCUGTT (SEQ ID NO:156)
ELN-6	ATGCAGAGTTCTCCAGGAA (SEQ ID NO:281)	AUGCAGAGUUCUCCAGGAATT (SEQ ID NO:33)	UUCCUGGAGAACUCUGCAUTT (SEQ ID NO:157)
ELN-7	GGAGGTGACCCAGTGATAA (SEQ ID NO:282)	GGAGGUGACCCAGUGAUAATT (SEQ ID NO:34)	UUAUCACUGGGUCACCUCCTT (SEQ ID NO:158)
ELN-8	GACCCAGTGATAATGGGAA (SEQ ID NO:283)	GACCCAGUGAUAAUGGGAATT (SEQ ID NO:35)	UUCCCAUUAUCACUGGGUCTT (SEQ ID NO:159)
ELN-9	TGACCCATGCAGAATAGAA (SEQ ID NO:284)	UGACCCAUGCAGAAUAGAATT (SEQ ID NO:36)	UUCUAUUCUGCAUGGGUCATT (SEQ ID NO:160)

ELN-10	ACAGCACCAACATGGCCTT (SEQ ID NO:285)	ACAGCACCAACAUGGCCUUTT (SEQ ID NO:37)	AAGGCCAUGUUGGUGCUGUTT (SEQ ID NO:161)
ELN-11	TACCTTCCAGGCCATTCAA (SEQ ID NO:286)	UACCUUCCAGGCCAUUCAATT (SEQ ID NO:38)	UUGAAUGGCCUGGAAGGUATT (SEQ ID NO:162)
COL1A1-1	CCCAGTTCCACTTCTTCTA (SEQ ID NO:287)	CCCAGUUCCACUUCUUCUATT (SEQ ID NO:39)	UAGAAGAAGUGGAACUGGGTT (SEQ ID NO:163)
COL1A1-2	TCTCCATTCCAACTCCCAA (SEQ ID NO:288)	UCUCCAUUCCAACUCCCAATT (SEQ ID NO:40)	UUGGGAGUUGGAAUGGAGATT (SEQ ID NO:164)
COL1A1-3	CTTAGCTCTTGCCAGGATA (SEQ ID NO:289)	CUUAGCUCUUGCCAGGAUATT (SEQ ID NO:41)	UAUCCUGGCAAGAGCUAAGTT (SEQ ID NO:165)
COL1A1-4	CTCCATTCCAACTCCCAAA (SEQ ID NO:290)	CUCCAUUCCAACUCCCAAATT (SEQ ID NO:42)	UUUGGGAGUUGGAAUGGAGTT (SEQ ID NO:166)
COL1A1-5	TCTTTATGCCCCTCCCTTA (SEQ ID NO:291)	UCUUUAUGCCCCUCCCUUATT (SEQ ID NO:43)	UAAGGGAGGGGCAUAAAGATT (SEQ ID NO:167)
COL1A1-8	CTCTTTATGCCCCTCCCTT (SEQ ID NO:292)	CUCUUUAUGCCCCUCCCUUTT (SEQ ID NO:44)	AAGGGAGGGGCAUAAAGAGTT (SEQ ID NO:168)
COL1A1-9	AACCCTTCCACCTTTGGAA (SEQ ID NO:293)	AACCCUUCCACCUUUGGAATT (SEQ ID NO:45)	UUCCAAAGGUGGAAGGGUUTT (SEQ ID NO:169)
COL1A1-11	AGATTGGAGGTCCCAGGAA (SEQ ID NO:294)	AGAUUGGAGGUCCCAGGAATT (SEQ ID NO:46)	UUCCUGGGACCUCCAAUCUTT (SEQ ID NO:170)
COL1A2-1	TGAGCCTCAGCAAAGGCAA (SEQ ID NO:295)	UGAGCCUCAGCAAAGGCAATT (SEQ ID NO:47)	UUGCCUUUGCUGAGGCUCATT (SEQ ID NO:171)
COL1A2-2	GGTGACTCGGTCTAGTCTA (SEQ ID NO:296)	GGUGACUCGGUCUAGUCUATT (SEQ ID NO:48)	UAGACUAGACCGAGUCACCTT (SEQ ID NO:172)
COL1A2-3	GCCCTTTCCCGAAGTCATA (SEQ ID NO:297)	GCCCUUUCCCGAAGUCAUATT (SEQ ID NO:49)	UAUGACUUCGGGAAAGGGCTT (SEQ ID NO:173)
COL1A2-4	AGAGTGCATCACTGCTGAA (SEQ ID NO:298)	AGAGUGCAUCACUGCUGAATT (SEQ ID NO:50)	UUCAGCAGUGAUGCACUCUTT (SEQ ID NO:174)
COL1A2-5	GAGCCCCAAAGCTAGAGAA (SEQ ID NO:299)	GAGCCCCAAAGCUAGAGAATT (SEQ ID NO:51)	UUCUCUAGCUUUGGGGCUCTT (SEQ ID NO:175)
COL1A2-6	CCTCAGCAAAGGCAAGCTA (SEQ ID NO:300)	CCUCAGCAAAGGCAAGCUATT (SEQ ID NO:52)	UAGCUUGCCUUUGCUGAGGTT (SEQ ID NO:176)
COL1A2-7	CTAGTCTAGAGTTCGCAAA (SEQ ID NO:301)	CUAGUCUAGAGUUCGCAAATT (SEQ ID NO:53)	UUUGCGAACUCUAGACUAGTT (SEQ ID NO:177)
COL1A2-8	CCCTTTCCCGAAGTCATAA (SEQ ID NO:302)	CCCUUUCCCGAAGUCAUAATT (SEQ ID NO:54)	UUAUGACUUCGGGAAAGGGTT (SEQ ID NO:178)
COL1A2-9	TCCCGAAGTCATAAGACAA (SEQ ID NO:303)	UCCCGAAGUCAUAAGACAATT (SEQ ID NO:55)	UUGUCUUAUGACUUCGGGATT (SEQ ID NO:179)
COL1A2-10	GCCCCAAAGCTAGAGAAAA (SEQ ID NO:304)	GCCCCAAAGCUAGAGAAAATT (SEQ ID NO:56)	UUUUCUCUAGCUUUGGGGCTT (SEQ ID NO:180)

COL1A2-11	AGCCCACCTGCCAACAAAA (SEQ ID NO:305)	AGCCCACCUGCCAACAAAATT (SEQ ID NO:57)	UUUUGUUGGCAGGUGGGCUTT (SEQ ID NO:181)
COL1A2-12	TCCCCAGCCCACCTGCCAA (SEQ ID NO:306)	UCCCCAGCCCACCUGCCAATT (SEQ ID NO:58)	UUGGCAGGUGGGCUGGGGATT (SEQ ID NO:182)
COL3A1-1	CTGGCAAAATCCCAACATA (SEQ ID NO:307)	CUGGCAAAAUCCCAACAUATT (SEQ ID NO:59)	UAUGUUGGGAUUUUGCCAGTT (SEQ ID NO:183)
COL3A1-3	CTGTGGGTTGTGTCTTCTA (SEQ ID NO:308)	CUGUGGGUUGUGUCUUCUATT (SEQ ID NO:60)	UAGAAGACACAACCCACAGTT (SEQ ID NO:184)
COL3A1-4	TCTGGCAAAATCCCAACAT (SEQ ID NO:309)	UCUGGCAAAAUCCCAACAUTT (SEQ ID NO:61)	AUGUUGGGAUUUUGCCAGATT (SEQ ID NO:185)
COL3A1-6	TTCTGGCAAAATCCCAACA (SEQ ID NO:310)	UUCUGGCAAAAUCCCAACATT (SEQ ID NO:62)	UGUUGGGAUUUUGCCAGAATT (SEQ ID NO:186)
COL3A1-10	AACTCCAGATGTGCTCTTT (SEQ ID NO:311)	AACUCCAGAUGUGCUCUUUTT (SEQ ID NO:63)	AAAGAGCACAUCUGGAGUUTT (SEQ ID NO:187)
COL3A1-11	TGTGGGTTGTGTCTTCTAT (SEQ ID NO:312)	UGUGGGUUGUGUCUUCUAUTT (SEQ ID NO:64)	AUAGAAGACACAACCCACATT (SEQ ID NO:188)
COL3A1-12	GGGTTGTGTCTTCTATAAG (SEQ ID NO:313)	GGGUUGUGUCUUCUAUAAGTT (SEQ ID NO:65)	CUUAUAGAAGACACAACCCTT (SEQ ID NO:189)
COL3A1-13	CGGCTCTCATATTTCAGAA (SEQ ID NO:314)	CGGCUCUCAUAUUUCAGAATT (SEQ ID NO:66)	UUCUGAAAUAUGAGAGCCGTT (SEQ ID NO:190)
COL3A1-14	TGCGGCTCTCATATTTCAG (SEQ ID NO:315)	UGCGGCUCUCAUAUUUCAGTT (SEQ ID NO:67)	CUGAAAUAUGAGAGCCGCATT (SEQ ID NO:191)
COL3A1-15	GATGAGTCGAAGGGGCATA (SEQ ID NO:316)	GAUGAGUCGAAGGGGCAUATT (SEQ ID NO:68)	UAUGCCCCUUCGACUCAUCTT (SEQ ID NO:192)
COL3A1-18	AGGAAGATCAGTTCTGTAA (SEQ ID NO:317)	AGGAAGAUCAGUUCUGUAATT (SEQ ID NO:69)	UUACAGAACUGAUCUUCCUTT (SEQ ID NO:193)
HAS1-1	CAAGTGAGGTGGAAGAGAA (SEQ ID NO:318)	CAAGUGAGGUGGAAGAGAATT (SEQ ID NO:70)	UUCUCUUCCACCUCACUUGTT (SEQ ID NO:194)
HAS1-2	ATAGTGGGTTAGGGAGAAA (SEQ ID NO:319)	AUAGUGGGUUAGGGAGAAATT (SEQ ID NO:71)	UUUCUCCCUAACCCACUAUTT (SEQ ID NO:195)
HAS1-3	AGAAAGGGATGGAGGGAAA (SEQ ID NO:320)	AGAAAGGGAUGGAGGGAAATT (SEQ ID NO:72)	UUUCCCUCCAUCCCUUUCUTT (SEQ ID NO:196)
HAS1-4	AAGTGAGGTGGAAGAGAAA (SEQ ID NO:321)	AAGUGAGGUGGAAGAGAAATT (SEQ ID NO:73)	UUUCUCUUCCACCUCACUUTT (SEQ ID NO:197)
HAS1-5	GAGAAGTGGAGAGGAAGAA (SEQ ID NO:322)	GAGAAGUGGAGAGGAAGAATT (SEQ ID NO:74)	UUCUUCCUCUCCACUUCUCTT (SEQ ID NO:198)
HAS1-6	GATGGAGAGAAAAGACAGAA (SEQ ID NO:323)	GAUGGAGAGAAAAGACAGAATT (SEQ ID NO:75)	UUCUGUCUUUUCUCUCCAUCTT (SEQ ID NO:199)
HAS1-8	GAGATGAGGGTACCAACAA (SEQ ID NO:324)	GAGAUGAGGGUACCAACAATT (SEQ ID NO:76)	UUGUUGGUACCCUCAUCUCTT (SEQ ID NO:200)

HAS1-9	GTGGGTTAGGGAGAAAGAA (SEQ ID NO:325)	GUGGGUUAGGGAGAAAGAATT (SEQ ID NO:77)	UUCUUUCUCCCUAACCCACTT (SEQ ID NO:201)
HAS1-10	GTGAGGTGGAAGAGAAAAAA (SEQ ID NO:326)	GUGAGGUGGAAGAGAAAAAATT (SEQ ID NO:78)	UUUUUCUCUUCCACCUCACTT (SEQ ID NO:202)
HAS2-1	AGGGCACCATTTGGCTTTA (SEQ ID NO:327)	AGGGCACCAUUUGGCUUUATT (SEQ ID NO:79)	UAAAGCCAAAUGGUGCCCUTT (SEQ ID NO:203)
HAS2-2	TTCCTCCTTGGGTCGGTTA (SEQ ID NO:328)	UUCCUCCUUGGGUCGGUUATT (SEQ ID NO:80)	UAACCGACCCAAGGAGGAAATT (SEQ ID NO:204)
HAS2-4	GCCAGAGGAAAGTAAGGAA (SEQ ID NO:329)	GCCAGAGGAAAGUAAGGAATT (SEQ ID NO:81)	UUCCUUACUUUCCUCUGGCTT (SEQ ID NO:205)
HAS2-7	TGCACACGTTAGCAATCAA (SEQ ID NO:330)	UGCACACGUUAGCAAUCAATT (SEQ ID NO:82)	UUGAUUGCUAACGUGUGCATT (SEQ ID NO:206)
HAS2-8	AAGGCTTTGAATGGCCAAT (SEQ ID NO:331)	AAGGCUUUGAAUGGCCAAUTT (SEQ ID NO:83)	AUUGGCCAUUCAAAGCCUUTT (SEQ ID NO:207)
HAS2-9	TTGAGTTGGCGGGAAGAAA (SEQ ID NO:332)	UUGAGUUGGCGGGAAGAAATT (SEQ ID NO:84)	UUUCUUCCCGCCAACUCAATT (SEQ ID NO:208)
HAS2-12	ATCGCTTGGAGGGAACTTG (SEQ ID NO:333)	AUCGCUUGGAGGGAACUUGTT (SEQ ID NO:85)	CAAGUUCCCUCCAAGCGAUTT (SEQ ID NO:209)
HAS2-13	GGAGTTCAGGGAAATCCAA (SEQ ID NO:334)	GGAGUUCAGGGAAAUCCAATT (SEQ ID NO:86)	UUGGAUUUCCCUGAACUCCTT (SEQ ID NO:210)
HAS2-14	CCCCTATGTCTTGCATT (SEQ ID NO:335)	CCCCUAUGUCUUGCAUUTT (SEQ ID NO:87)	AAUGCAAGACACAUAGGGGTT (SEQ ID NO:211)
HAS2-15	CCTATGTCTTGCATTTC (SEQ ID NO:336)	CCUAUGUCUUGCAUUUCTT (SEQ ID NO:88)	GAAAUGCAAGACACAUAGGTT (SEQ ID NO:212)
HAS2-16	GCACACGTTAGCAATCAAG (SEQ ID NO:337)	GCACACGUUAGCAAUCAAGTT (SEQ ID NO:89)	CUUGAUUGCUAACGUGUGCTT (SEQ ID NO:213)
HAS2-17	GTAGCTCAGAGAAGGCTTT (SEQ ID NO:338)	GUAGCUCAGAGAAGGCUUUTT (SEQ ID NO:90)	AAAGCCUUCUCUGAGCUACTT (SEQ ID NO:214)
HAS2-18	TAGCTCAGAGAAGGCTTTG (SEQ ID NO:339)	UAGCUCAGAGAAGGCUUUGTT (SEQ ID NO:91)	CAAAGCCUUCUCUGAGCUATT (SEQ ID NO:215)
HAS2-19	GCTCAGAGAAGGCTTTGAA (SEQ ID NO:340)	GCUCAGAGAAGGCUUUGAATT (SEQ ID NO:92)	UUCAAAGCCUUCUCUGAGCTT (SEQ ID NO:216)
HAS3-1	GGAACCTCCAAGGTTCCTA (SEQ ID NO:341)	GGAACCUCCAAGGUUCCUATT (SEQ ID NO:93)	UAGGAACCUUGGAGGUUCCTT (SEQ ID NO:217)
HAS3-2	TCGCCTTCAGCTGGTTCTA (SEQ ID NO:342)	UCGCCUUCAGCUGGUUCUATT (SEQ ID NO:94)	UAGAACCAGCUGAAGGCGATT (SEQ ID NO:218)
HAS3-3	GAGGTCATGGATGTCGGAA (SEQ ID NO:343)	GAGGUCAUGGAUGUCCGGAATT (SEQ ID NO:95)	UUCCGACAUCCAUGACCUCTT (SEQ ID NO:219)
HAS3-6	ACCTCCAAGGTTCCTACAA (SEQ ID NO:344)	ACCUCCAAGGUUCCUACAATT (SEQ ID NO:96)	UUGUAGGAACCUUGGAGGUTT (SEQ ID NO:220)

HAS3-7	ACTTCTTGTCTCTGCTAAC (SEQ ID NO:345)	ACUUCUUGUCUCUGCUAACTT (SEQ ID NO:97)	GUUAGCAGAGACAAGAAGUTT (SEQ ID NO:221)
HAS3-9	ACTCGAGTCTAGCACTATC (SEQ ID NO:346)	ACUCGAGUCUAGCACUAUCTT (SEQ ID NO:98)	GAUAGUGCUAGACUCGAGUTT (SEQ ID NO:222)
HAS3-10	GGACCTGAAAACTACTGTC (SEQ ID NO:347)	GGACCUGAAAACUACUGUCTT (SEQ ID NO:99)	GACAGUAGUUUUCAGGUCCTT (SEQ ID NO:223)
HAS3-11	GGGAATTTAGGAGGTCATG (SEQ ID NO:348)	GGGAAUUUAGGAGGUCAUGTT (SEQ ID NO:100)	CAUGACCUCCUAAAUUCCCTT (SEQ ID NO:224)
HAS3-12	TGGCTTTAAGACACCGGAA (SEQ ID NO:349)	UGGCUUUAAGACACCGGAATT (SEQ ID NO:101)	UUCCGGUGUCUUAAAGCCATT (SEQ ID NO:225)
HAS3-13	AACCTCCAAGGTTCCTACA (SEQ ID NO:350)	AACCUCCAAGGUUCCUACATT (SEQ ID NO:102)	UGUAGGAACCUUGGAGGUUTT (SEQ ID NO:226)
HAS3-14	CCTCCAAGGTTCCTACAAA (SEQ ID NO:351)	CCUCCAAGGUUCCUACAAATT (SEQ ID NO:103)	UUUGUAGGAACCUUGGAGGTT (SEQ ID NO:227)
HAS3-15	TCAGCTGGTTCTAAACTTC (SEQ ID NO:352)	UCAGCUGGUUCUAAACUUCTT (SEQ ID NO:104)	GAAGUUUAGAACCAGCUGATT (SEQ ID NO:228)
HAS3-16	GCTGGTTCTAAACTTCTTG (SEQ ID NO:353)	GCUGGUUCUAAACUUCUUGTT (SEQ ID NO:105)	CAAGAAGUUUAGAACCAGCTT (SEQ ID NO:229)
HAS3-17	CTCACTTTACTCGAGTCTA (SEQ ID NO:354)	CUCACUUUACUCGAGUCUATT (SEQ ID NO:106)	UAGACUCGAGUAAAGUGAGTT (SEQ ID NO:230)
HAS3-18	GATAAGGTCAGTTGGGAAT (SEQ ID NO:355)	GAUAAGGUCAGUUGGGAAUTT (SEQ ID NO:107)	AUUCCCAACUGACCUUAUCTT (SEQ ID NO:231)
HAS3-19	TGGGAATTTAGGAGGTCAT (SEQ ID NO:356)	UGGGAAUUUAGGAGGUCAUTT (SEQ ID NO:108)	AUGACCUCCUAAAUUCCCATT (SEQ ID NO:232)
HAS3-20	GTCATGGATGTCGGAAATA (SEQ ID NO:357)	GUCAUGGAUGUCGGAAAUATT (SEQ ID NO:109)	UAUUUCCGACAUCCAUGACTT (SEQ ID NO:233)
MFAP2-1	GAGGAATGCTTGAGGCCAA (SEQ ID NO:358)	GAGGAAUGCUUGAGGCCAATT (SEQ ID NO:110)	UUGGCCUCAAGCAUUCCUCTT (SEQ ID NO:234)
MFAP2-2	CCTGTCTCTAGAAAAAGGAA (SEQ ID NO:359)	CCUGUCUCUAGAAAAAGGAATT (SEQ ID NO:111)	UUCCUUUUUCUAGAGACAGGTT (SEQ ID NO:235)
MFAP2-3	AGACCCTGTCTCTAGAAAA (SEQ ID NO:360)	AGACCCUGUCUCUAGAAAAATT (SEQ ID NO:112)	UUUUUCUAGAGACAGGGUCUTT (SEQ ID NO:236)
MFAP2-6	AAGACCCTGTCTCTAGAAA (SEQ ID NO:361)	AAGACCCUGUCUCUAGAAATT (SEQ ID NO:113)	UUUCUAGAGACAGGGUCUUTT (SEQ ID NO:237)
MFAP2-7	TGATTTCCTCCTCTGTGAA (SEQ ID NO:362)	UGAUUUCCUCCUCUGUGAATT (SEQ ID NO:114)	UUCACAGAGGAGGAAAUCATT (SEQ ID NO:238)
MFAP2-8	CAAGACCCTGTCTCTAGAA (SEQ ID NO:363)	CAAGACCCUGUCUCUAGAATT (SEQ ID NO:115)	UUCUAGAGACAGGGUCUUGTT (SEQ ID NO:239)
MFAP2-9	TGGAGAGGCAGAAGGAAAA (SEQ ID NO:364)	UGGAGAGGCAGAAGGAAAATT (SEQ ID NO:116)	UUUUCCUUCUGCCUCUCCATT (SEQ ID NO:240)

MFAP2-10	TCCTCTGTGAAATGGGCAA (SEQ ID NO:365)	UCCUCUGUGAAAUGGGCAATT (SEQ ID NO:117)	UUGCCCAUUUCACAGAGGATT (SEQ ID NO:241)
MFAP2-14	AGAGGGAGATCGAGGCTTA (SEQ ID NO:366)	AGAGGGAGAUCGAGGCUUATT (SEQ ID NO:118)	UAAGCCUCGAUCUCCCUCUTT (SEQ ID NO:242)
MFAP2-15	GTCACTTTGGGAGGCTTTGA (SEQ ID NO:367)	GUCACUUUGGGAGGCUUGATT (SEQ ID NO:119)	UCAAGCCUCCCAAAGUGACTT (SEQ ID NO:243)
MFAP2-16	GATTTCCTCCTCTGTGAAA (SEQ ID NO:368)	GAUUUCCUCCUCUGUGAAATT (SEQ ID NO:120)	UUUCACAGAGGAGGAAAUCTT (SEQ ID NO:244)
MFAP2-17	CTGAAAGAGGTGCTGGTTA (SEQ ID NO:369)	CUGAAAGAGGUGCUGGUUATT (SEQ ID NO:121)	UAACCAGCACCUCUUUCAGTT (SEQ ID NO:245)
MFAP2-18	CTCATGCCTGTAATCCCAA (SEQ ID NO:370)	CUCAUGCCUGUAAUCCCAATT (SEQ ID NO:122)	UUGGGAUUACAGGCAUGAGTT (SEQ ID NO:246)
MFAP2-19	GACCCTGTCTCTAGAAAAG (SEQ ID NO:371)	GACCCUGUCUCUAGAAAAGTT (SEQ ID NO:123)	CUUUUCUAGAGACAGGGUCTT (SEQ ID NO:247)
MFAP2-20	GAGGCAGAAGGAAAACCAA (SEQ ID NO:372)	GAGGCAGAAGGAAAACCAATT (SEQ ID NO:124)	UUGGUUUUCCUUCUGCCUCTT (SEQ ID NO:248)

实施例四 saRNA 促进细胞分泌透明质酸

为了分析 saRNA 是否会促进细胞生成透明质酸，选用能够上调 HAS1、HAS2 和 HAS3 mRNA 表达的 saRNA 分别转染 Hs27 细胞，72 小时后，收集细胞培养基，使用透明质酸 DuoSet 试剂盒（R&D Systems,产品号：DY3614-05）检测细胞培养基中的透明质酸含量。该试剂盒能够检测所有 3 个透明质酸基因编码的透明质酸蛋白。用多功能微孔板检测仪（Infinite M200 Pro，Tecan）在 450 nm 波长读取样品的光密度值。使用已知浓度的透明质酸在 450 nm 波长读取样品的光密度值产生标准曲线。同时收集受测细胞，用 Pierce Protein Assay（Thermo Scientific）分别测量相应细胞的蛋白质总量。最后，根据标准曲线计算出透明质酸的含量并用每个处理样品的细胞的总蛋白量进行校正。

透明质酸产生促进率是以对照处理（Mock）细胞的透明质酸量作为 100%而进行计算，公式如下：

$$\text{透明质酸产生促进率}（\%）= X/M \times 100$$

上述计算式中，X 表示 saRNA 处理样品的透明质酸量，M 表示对照处理（Mock）样品的透明质酸量。检测结果显示与 RT-qPCR 结果一致，表明所检测的 saRNA 均不同程度地增加了细胞向培养基分泌透明质酸（图 12）。这些结果明确提示 saRNA 能够进入细胞激活 HAS 基因的表达而促进细胞分泌透明质酸进入细胞外环境。

实施例五 saRNA 促进成纤维细胞分泌胶原蛋白

（1） I 型胶原蛋白定量检测方法

为了检测细胞中 I 型胶原蛋白的合成量，使用原胶原 I 型 C-肽 ELISA 试剂盒（Takara，产品号：MK101）根据生产商提供的方法检测细胞培养液中的原胶原蛋白。所有培养液的量为 20 μl。使用已知浓度的原胶原蛋白配制标准品。用多功能微孔板检测仪（Infinite M200 Pro，Tecan）在 450 nm 波长读取已知浓度和待测样品的光密度值。同时收集细胞，用 Pierce Protein Assay（Thermo Scientific）测量相应细胞的蛋白质总量。根据标准曲线计算出胶原蛋白的含量并用每个处理样品的细胞的总蛋白量进行校正。I 型胶原蛋白产生促进率是以对照处理（Mock）细胞的 I 型胶原蛋白量作为 100%而进行计算，计算公式如下：

$$\text{I 型胶原蛋白产生促进率}（\%）= X/M \times 100$$

上述计算式中，X 表示 saRNA 处理样品的 I 型胶原蛋白量，M 表示对照处理（Mock）样品的 I 型胶原蛋白量。

（2）III 型胶原定量检测方法

为了检测细胞培养基中的 III 型胶原蛋白，用待测 saRNA 分别转染 6 孔板中培养的细胞，72 小时后，收集培养基，用 III 型胶原人胶原蛋白 III 型 α 1 (COL3A1) ELISA 试剂盒

（MyBioSource, Inc.，圣地亚哥，美国）根据生产商提供的方法进行检测。同时收集细胞，用 Pierce Protein Assay（Thermo Scientific）测量相应细胞的蛋白质总量。用多功能微孔板检测仪（Infinite M200 Pro，Tecan）在 450 nm 波长读取光密度值，根据标准曲线计算出胶原蛋白的含量并用每个处理样品的总蛋白量进行校正。

为了明确 saRNA 介导的胶原蛋白基因 COL1A1、COL1A2 和 COL3A1 激活是否导致功能性蛋白质的分泌，申请人用上述 ELISA 方法在 saRNA 转染的成纤维细胞培养液中检测了相应的胶原蛋白的含量。用 COL1A1 特异性 saRNA （COL1A1-2、COL1A1-5 和 COL1A1-8）以 20 nM 和 50 nM 终浓度分别转染 Hs27 和 NHDF 细胞，72 小时后，使用原胶原 I 型 C-肽 ELISA 试剂盒（Takara，产品号：MK101）检测细胞培养液中的 I 型原胶原蛋白的含量。如表 4 所示，COL1A1-2、COL1A1-5 和 COL1A1-8 处理的 Hs27 细胞和 NHDF 细胞其培养液中的 I 型胶原蛋白的含量均有增加，而且呈现剂效关系，而对照双链体 RNA（dsControl）则无明显作用。

表 4：COL1A1 saRNA 对 Hs27 和 NHDF 细胞分泌的 I 型原胶原蛋白量的影响

处理	浓度（nM）	相对对照（Mock）处理的变化（均值±SD）	
		Hs27	NHDF
dsControl	20	94.4%±4%	98.4%±4%
dsControl	50	95.8%±1%	97.0%±1%
COL1A1-2	20	123.5%±3%	127.3%±2%
COL1A1-2	50	143.4%±5%	134.3%±5%
COL1A1-5	20	148.5%±15%	134.1%±11%
COL1A1-5	50	169.1%±10%	145.6%±4%
COL1A1-8	20	122.5%±2%	114.8%±5%
COL1A1-8	50	132.7%±2%	140.8%±15%

用相同的 ELISA 试剂盒检测 COL1A2 特异性 saRNA （COL1A2-1、COL1A2-2、COL1A2-3、COL1A2-4、COL1A2-6、COL1A2-9 和 COL1A2-12）分别转染的成纤维细胞（Hs27 和 NHDF）培养液中的 I 型原胶原，发现在 50 nM 的转染浓度和 72 小时的转染时间，这些 saRNA 均增加了两种细胞分泌的原胶原蛋白，而对照双链体 RNA（dsControl）则无明显作用（表 5）。这些结果提示 saRNA 不仅上调胶原蛋白基因的 mRNA 表达，而且能够不同程度地增加细胞分泌的 I 型原胶原蛋白的量。

表 5：COL1A2 saRNA 对 Hs27 和 NHDF 细胞分泌的 I 型原胶原蛋白量的影响

处理	浓度（nM）	相对对照（Mock）处理的变化（均值±SD）	
		Hs27	NHDF
dsControl	50	94.4%±2%	96.5%±2%
COL1A2-1	50	188.5%±10%	206.8%±6%
COL1A2-2	50	249.2%±15%	208.9%±5%
COL1A2-3	50	126.2%±2%	119.2%±1%
COL1A2-4	50	166.1%±3%	116.6%±5%
COL1A2-6	50	186.0%±3%	129.8%±3%
COL1A2-9	50	119.4%±5%	151.2%±1%
COL1A2-12	50	120.4%±5%	128.3%±5%

用如上所述的 III 型胶原 人胶原蛋白 III 型 α 1 (COL3A1) ELISA 试剂盒检测 COL3A1 特异性 saRNA （COL3A1-1、COL3A1-3、COL3A1-6、COL3A1-13 和 COL3A1-14）分别转染的成纤维细胞（Hs27 和 NHDF）培养液中的 III 型原胶原，结果显示，在 50 nM 的转染浓度和 72 小时的转染时间，这些 saRNA 均增加了两种细胞分泌的原胶原蛋白，而对照双链体 RNA（dsControl）则无明显作用（表 6）。这些结果提示 saRNA 不仅上调 COL3A1 基因的 mRNA 表达，而且能够明显增加细胞分泌的 III 型原胶原蛋白的量。

表 6：COL3A1 saRNA 对 Hs27 和 NHDF 细胞分泌的 III 型原胶原蛋白量的影响

处理	浓度（nM）	相对对照（Mock）处理的变化（%）	
		Hs27	NHDF
dsControl	50	93.9%±1%	101.5%±3%
COL3A1-1	50	174.5%±16%	198.8%±21%
COL3A1-3	50	209.3%±19%	238.6%±25%
COL3A1-6	50	299.0%±18%	250.7%±6%
COL3A1-13	50	151.4%±2%	143.0%±1%
COL3A1-14	50	199.3%±4%	139.9%±6%

权 利 要 求 书

1. 小激活核酸分子，所述小激活核酸分子的一条片段与人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因启动子中任一长度为 16-35 个核苷酸的连续片段具有至少 75%的同源性或互补性，所述小激活核酸分子分别激活/上调所述 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因的表达。

2. 根据权利要求 1 所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子包含正义核酸片段和反义核酸片段，所述正义核酸片段和所述反义核酸片段含有互补区域，所述互补区域能形成双链核酸结构，该双链核酸能够分别激活或上调人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 或 MFAP2 基因在细胞中的表达。

3. 根据权利要求 2 所述的小激活核酸分子，所述的小激活核酸分子的正义核酸片段和反义核酸片段存在于两条不同的核酸链上。

4. 根据权利要求 2 所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子的正义核酸片段和反义核酸片段存在于同一条核酸链上，优选地为发夹型单链核酸分子，其中正义核酸片段和反义核酸片段的互补区域形成双链核酸结构。

5. 根据权利要求 3 所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子至少一条链具有长度为 0 至 6 个核苷酸的 3’突出端，优选地，所述小激活核酸分子的两条链都具有长度为 2-3 个核苷酸的 3'突出端。

6. 根据权利要求 1 所述的小激活核酸分子，所述的小激活核酸分子的正义核酸片段和反义核酸片段的长度分别为 16 至 35 个核苷酸。

7. 根据权利要求 4 所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子可操作地连接于载体，优选地，所述载体包括质粒载体、慢病毒载体、腺病毒载体或腺相关病毒载体。

8. 根据权利要求 1 所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子的一条链与选自 SEQ ID NO:249-372 的任一核苷酸序列具有至少 75%的同源性或互补性。

9. 根据权利要求 2 所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子的正义链与选自 SEQ ID NO:1-124 的任一核苷酸序列具有至少 75%的同源性，并且其反义链与选自 SEQ ID NO:125-248 的任一核苷酸序列具有至少 75%的同源性。

10. 根据权利要求 2 所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子的正义链包括或选自 SEQ ID NO:1-124 的任一核苷酸序列，并且其反义链包括或选自 SEQ ID NO:125-248 的任一核苷酸序列。

11. 根据权利要求 1-6 或 8-10 任一项所述的小激活核酸分子，所述小激活核酸分子包括至少

一个化学修饰的核苷酸。

12. 根据权利要求 11 所述的小激活核酸分子，其中所述化学修饰为如下修饰中的至少一种：

（1）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中连接核苷酸的磷酸二酯键的修饰；

（2）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的核糖的 2’-OH 的修饰；

（3）对所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的碱基的修饰；

（4）所述小激活核酸分子的核苷酸序列中的至少一个核苷酸为锁核酸。

13. 编码权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子的核酸。

14. 权利要求 13 所述的核酸，其特征在于所述核酸是 DNA 分子。

15. 包含权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子或权利要求 13 或 14 所述的核酸的细胞。

16.组合物，包含干预选自下组的至少一种基因的表达与功能的激动剂：人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和 MFAP2 基因。

17. 根据权利要求 16 所述的组合物，其中所述激动剂是权利要求 1-13 任一项所述的小激活核酸分子中的一种或多种或权利要求 12 或 13 所述的核酸中的一种或多种。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的组合物，其中所述组合物还包含化妆品/护肤品/美容产品可接受的载体。

19. 根据权利要求 18 所述的组合物，其中所述化妆品/护肤品/美容产品可接受的载体包括水性载体、脂质体、高分子聚合物或多肽。

20. 权利要求 19 所述的组合物，其中所述水性载体包括无 RNA 酶水。

21. 根据权利要求 18 所述的组合物，其中所述组合物含有 1-100 nM，优选地 1-50 nM 的所述小激活核酸分子。

22. 干预选自下组的至少一种基因的表达与功能的激动剂在制备皮肤护理组合物中的应用：人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和 MFAP2 基因。

23. 根据权利要求 22 所述的应用，其中所述激动剂包括权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子中的一种或多种或权利要求 12 或 13 所述的核酸中的一种或多种。

24. 权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子中的一种或多种、权利要求 13 或 14 所述的核酸中的一种或多种或权利要求 16-21 任一项所述的组合物在制备用于激活/上调人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和 MFAP2 基因中的一

个或多个在细胞中表达的制剂中的应用。

25. 根据权利要求 24 所述的应用，其中权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子中的一种或多种、权利要求 13 或 14 所述的核酸中的一种或多种或权利要求 16-21 任一项所述的组合物被直接导入所述细胞中。

26. 根据权利要求 24 所述的应用，其中所述的小激活核酸分子是在编码该小激活核酸分子的核苷酸序列导入所述细胞后在细胞内产生的。

27. 根据权利要求 24-26 任一项所述的应用，其中所述细胞是人类细胞。

28. 根据权利要求 24-26 任一项所述的应用，其中所述细胞存在于人体中。

29. 激活/上调人 AQP3、AQP9、ELN、COL1A1、COL1A2、COL3A1、HAS1、HAS2、HAS3 和 MFAP2 基因中的一个或多个在细胞中的表达的方法，包括给所述细胞施用权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子中的一种或多种、权利要求 13 或 14 所述的核酸中的一种或多种或权利要求 16-21 任一项所述的组合物。

30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子、权利要求 13 或 14 所述的核酸或权利要求 16-21 任一项所述的组合物被直接导入所述细胞中。

31. 根据权利要求 30 所述的方法，其中所述小激活核酸分子是在编码该小激活核酸分子的核苷酸序列导入所述细胞后在细胞内产生的。

32. 根据权利要求 29-31 任一项所述的方法，其中所述细胞是人类细胞。

33. 护理皮肤或改善皮肤状况的方法，包括给个体施用权利要求 1-12 任一项所述的小激活核酸分子中的一种或多种、权利要求 13 或 14 所述的核酸中的一种或多种或权利要求 16-21 任一项所述的组合物。

34. 根据权利要求 33 所述的方法，其中所述个体是哺乳动物，优选地，所述个体是人。

35. 权利要求 33 或 34 所述的方法，其中所述改善皮肤状况包括增加或恢复皮肤弹性、改善皮肤松弛、提高皮肤含水量、减少或消除皮肤皱纹，防止细纹和干纹的出现。

36.分离的小激活核酸分子靶位点，其中所述靶位点包括或选自 SEQ ID NO:249-372 的任一条序列上的任意连续 16-35 个核苷酸序列。

37. 根据权利要求 36 所述的小激活核酸分子靶位点，其中所述靶位点包括或选自 SEQ ID NO:249-372 的任一核苷酸序列。