

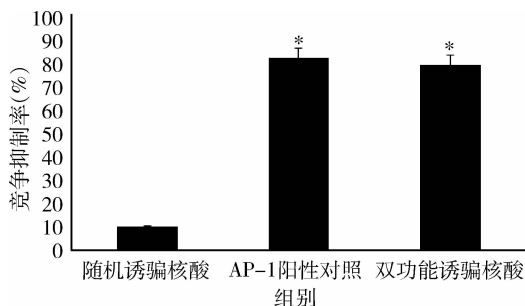


图1 诱骗核酸对 AP-1 DNA 结合活性的抑制作用
与随机诱骗核酸组比较, * $P < 0.05$

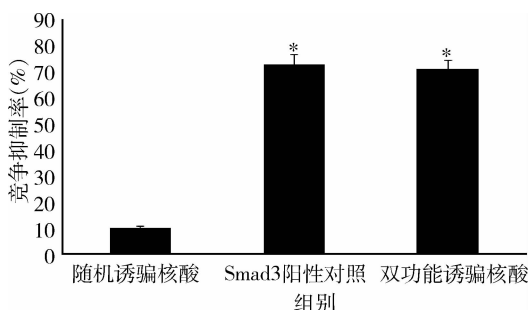


图2 诱骗核酸对 Smad3 DNA 结合活性的抑制作用
与随机诱骗核酸组比较, * $P < 0.05$

酸处理组的细胞数量都有所减少 ($P < 0.05$), 其中双功能诱骗核酸组的细胞数量相较于随机诱骗核酸组降低更加明显 ($P < 0.01$), 详见图 3。

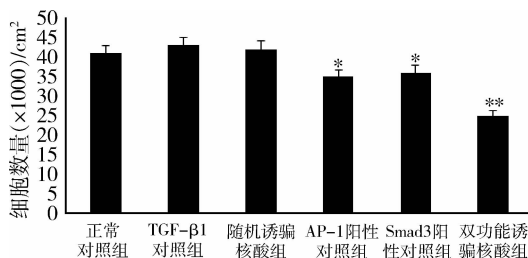


图3 细胞计数检测细胞数量
与随机诱骗核酸组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 诱骗寡核苷酸对 L929 细胞增殖的影响: 随机诱骗寡核苷酸相比, AP-1、Smad3 阳性对照诱骗寡核苷酸以及 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸均对 L929 细胞的生长均有明显的抑制作用 ($P < 0.01$), 其中以 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸的抑制作用最强 (图 4)。

4. 诱骗核酸对 L929 细胞表达纤维化介质的抑制作用: TGF-β1 能显著诱导 FN、PAI-1、c-fos、Collα2、TGF-β1、CTGF 纤维化介质的表达。与随机诱骗核酸相比, AP-1、Smad3 阳性对照诱骗寡核苷酸

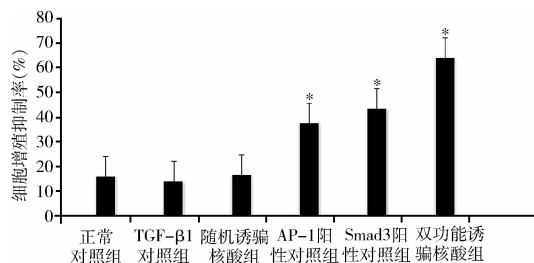


图4 诱骗核酸对 L929 细胞增殖抑制情况
与随机诱骗核酸组比较, * $P < 0.05$

以及 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸均能显著降低 TGF-β1 诱导 L929 细胞表达这些纤维化介质的效应, 其中以 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸的抑制作用最强 ($P < 0.05$, 图 5)。

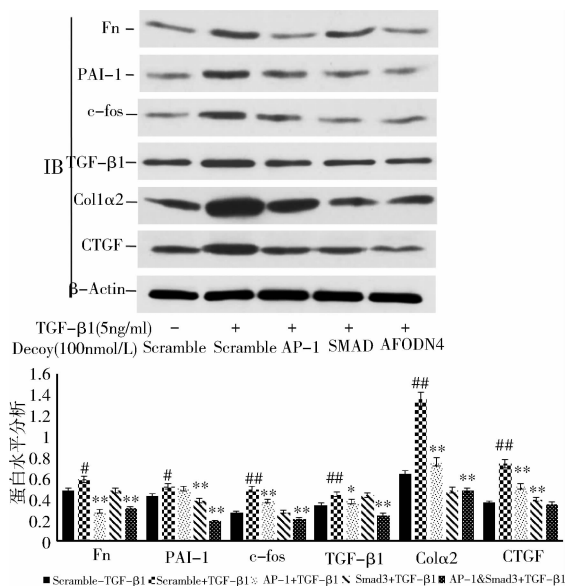


图5 Western blot 检测 L929 成纤维细胞纤维介质的表达
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 是指转染随机诱骗核酸后用 TGF-β1 刺激和转染随机诱骗核酸后并未用 TGF-β1 刺激组相比较的统计结果; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 是指转染 AP-1、Smad3 和双功能诱骗核酸后用 TGF-β1 刺激与转染随机诱骗核酸后用 TGF-β1 刺激组相比较的统计结果

讨 论

Smad 信号通路和 AP-1 信号通路是两条与伤口愈合、瘢痕形成和组织纤维化关系最为密切的信号通路, 它们的过度活化诱导了成纤维细胞的过度增殖, 最终导致病理性瘢痕的形成^[6]。Smad 信号通路主要参与 TGF-β 诱导的应答反应, 而 AP-1 是伤口愈合和瘢痕形成过程中信号放大效应的始动者, 其可被 TGF-β 活化, 而活化的 AP-1 又可上调 TGF-β 的表达, 由此放大伤口愈合的信号^[7-10]。

Decoy ODNs 指双链的脱氧寡核苷酸, 转染入细胞, 竞争性抑制转录因子与顺式作用元件的结合, 干扰转录因子的 DNA 结合活性及其后续基因的表达^[11]。由于该策略具有以下优点: ①潜在的药物靶点(转录因子); ②诱骗 ODNs 的合成相对简单且可靶向特异的组织; ③不必弄清转录因子靶分子的精确分子结构; ④诱骗 ODNs 可阻断与同一顺式作用元件结合的多种转录因子的效应, 且也可阻断同一转录因子所调控的多个靶基因的表达, 其作用能力比反义 ODNs 更强。因此国外众多学者一致认为该策略可作为治疗某些人类疾病的一种有效的手段。目前, 有关单独靶向 Smad 或者 AP-1 的“诱骗”策略, 已应用于探讨 Smad 和 AP-1 在癌症、心血管和肾脏等相关疾病中的作用机制, 以及对这些疾病的治疗性研究, 体外实验和动物试验结果已显示出确切的结果。

本研究以伤口愈合和瘢痕形成相关基因调控的关键环节为突破口, 应用转录因子“诱骗”策略设计并合成可同时与 Smad3 和 AP-1 结合, 并具有同时抑制两种转录因子转录活性的双功能诱骗寡核苷酸。通过 ELISA 方法检测诱骗核酸对 AP-1/Smad3 与其顺式作用元件结合的竞争抑制作用。与随机诱骗核酸对照相比, 双功能诱骗药物既能明显抑制 AP-1 的 DNA 结合活性, 又能抑制 Smad3 的 DNA 结合活性, 而 AP-1 阳性对照核酸仅能抑制 AP-1 的 DNA 结合活性, 对 Smad3 的 DNA 结合活性则无抑制作用。与此相似, Smad3 阳性对照核酸仅能抑制 Smad 的 DNA 结合活性, 而对 AP-1 的 DNA 结合活性则无抑制作用。说明笔者设计合成的诱骗寡核苷酸是成功的。

笔者通过脂质体介导的 DNA 转染技术将 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸和 AP-1 阳性、Smad3 阳性、Scramble 诱骗寡核苷酸序列导入了 L929 成纤维细胞株内, 通过细胞计数检测了细胞数量的变化同时也检测了转染后 TGF- β 1 诱导的细胞增殖率的变化, 发现 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸和 AP-1 阳性、Smad3 阳性诱骗寡核苷酸组无论是细胞数量还是细胞增殖抑制率明显高于 Scramble 组, 其中以 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸组最为明显, 增殖抑制率高达 70%。

在 L929 成纤维细胞中持续活化的 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸组和 AP-1 阳性、Smad3 阳性诱骗寡核苷酸组是通过下调纤维介质的表达来抑制细胞的增殖^[12-15]。本实验在蛋白水平上检测了

相关纤维介质的表达情况, 发现转染 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸组和 AP-1 阳性、Smad3 阳性组与 Scramble 组相比 FN、PAI-1、c-fos、Coll α 2、TGF- β 1、CTGF 等纤维化介质的表达均受到高效抑制, 但 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸组的抑制作用更强。而未用 TGF- β 1 诱导和 TGF- β 1 诱导的细胞同时转染 Scramble 诱骗寡核苷酸, 明显的看到 TGF- β 1 诱导组 FN、PAI-1、c-fos、Coll α 2、TGF- β 1、CTGF 等纤维化介质的表达明显增高。通过本研究初步证实这种双功能诱骗寡核苷酸可以减少细胞数量并且可以高效抑制 FN、PAI-1、c-fos、Coll α 2、TGF- β 1、CTGF 等纤维化介质的表达, 从而抑制 L929 成纤维细胞的生长、增殖。

目前, 同时针对 Smad3 和 AP-1 这两条信号通路的抑制剂国内外均未见报道。本研究应用转录因子“诱骗”策略设计并合成了 Smad3 和 AP-1 双重抑制剂, 并证实其能高效抑制 L929 成纤维细胞的生长、增殖, 为进一步研发并制备高效抗病理性瘢痕和组织纤维化的药物奠定了理论基础。

参考文献

- 肖刚, 王智园, 谭敏胡, 等. 转化生长因子 TGF- β 1 对病理性瘢痕中成纤维细胞增殖及凋亡水平的影响[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(13): 2242-2245
- 庞久玲, 马征, 刘军, 等. Smad3 和转化生长因子-1 在瘢痕疙瘩、增生性瘢痕及正常皮肤中的表达: 48: 40: 40 例标本病理检测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(11): 1927-1930
- 肇阅, 张荣明. 病理性瘢痕治疗的研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(36): 114-115
- Kose O, Waseem A. Keloids and hypertrophic scars: are they two different sides of the same coin? [J]. Dermatol Surg, 2008, 34(3): 336-346
- Ranzato E, Martinotti S, Volante A, et al. Platelet lysate modulates MMP-2 and MMP-9 expression, matrix deposition and cell-to-matrix adhesion in keratinocytes and fibroblasts [J]. Exp Dermatol, 2011, 20(4): 308-313
- Xia W, Kong W, Wang Z, et al. Increased CCN2 transcription in keloid fibroblasts requires cooperativity between AP-1 and SMAD binding sites [J]. Ann Surg, 2007, 246(5): 886-895
- 杨平, 吴志宏, 黄静, 等. 氧化苦参碱通过 TGF- β -Smad 信号通路调控人增生性瘢痕成纤维细胞增殖及功能[J]. 中国美容整形外科杂志, 2010, 21(9): 557-559
- Sethi A, Jain A, Zode GS, et al. Role of TGF β 1/Smad signaling in gremlin induction of human trabecular meshwork extracellular matrix proteins [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(8): 5251-5259
- 贾效伟, 刘秉慈, 叶萌, 等. 活化蛋白-1 和细胞周期蛋白在石英诱导的细胞周期改变中的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29(11): 812-815

- 10 Jurzak M, Adamczyk K. Influence of genistein on c - Jun, c - Fos and Fos - B of AP - 1 subunits expression in skin keratinocytes, fibroblasts and keloid fibroblasts cultured in vitro [J]. Acta Pol Pharm, 2013, 70(2): 205 - 213
- 11 徐晓云, 李冬斌, 李彬, 等. NF - κ B“诱骗”寡核苷酸对 LPS 诱导的 SW480 细胞 IL - 1 β 表达的影响 [J]. 疑难病杂志, 2012, 11(1): 38 - 40
- 12 姚恒, 李世荣, 刘剑毅. 三七总苷对人增生性瘢痕成纤维细胞 TGF - β 1 和细胞周期的作用 [J]. 中国实用美容整形外科杂志, 2005, 16(4): 243 - 245
- 13 程悦, 王代红, 张耀全, 等. PTEN 编码蛋白对 TGF - β 1 刺激大鼠肾成纤维细胞分泌 ColIV、FN 的抑制作用 [J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(7): 719 - 721
- 14 李海剑, 刘章锁, 刘书真, 等. 罗格列酮对高糖条件下大鼠肾脏成纤维细胞 TGF - β 1 和 PAI - 1 mRNA 表达的影响 [J]. 郑州大学学报, 2007, 42(1): 47 - 49
- 15 周莹, 熊丽霞, 董蕙, 等. 白细胞介素 13 对瘢痕成纤维细胞增生及转录因子 c - fos 表达的影响 [J]. 南昌大学学报, 2012, 52(12): 23 - 26

(收稿日期: 2013 - 09 - 21)

(修回日期: 2013 - 10 - 26)

17 β - 雌二醇作为扩充液对大隐静脉保护作用的研究

殷巍 王亮 张丽晶 员建平

摘要 目的 本研究从扩充液的角度对比研究 17 β - 雌二醇作为扩充液与其他传统扩张液对大隐静脉内皮细胞的保护作用, 探讨其在临床上应用的价值, 选择对冠状动脉旁路移植术中对大隐静脉损伤最小的扩充液, 并且能最大限度的保护静脉壁血管内皮细胞和血管内膜的完整性, 在临床应用上能提高冠状动脉旁路移植术后大隐静脉桥血管的远期通畅率。方法 筛选 21 例行冠状动脉旁路移植术 (CABG) 的患者, 取术前未进行扩充的大隐静脉, 留下进行冠状动脉旁路移植剩余的血管分割成 3 段, 每段长约 2cm 为 3 组, 用不同的扩充液扩充每段分割好的大隐静脉, A 组 17 β - 雌二醇组 ($n = 21$); B 组罂粟碱组 ($n = 21$) 和 C 组自体血液肝素混合组 ($n = 21$), 比较各组扩充液扩充后血管的损伤情况。结果 应用 17 β - 雌二醇作为扩充液扩充后的血管通过光镜、血管免疫组化及电镜结果观察损伤最小, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 在临床中选取 17 β - 雌二醇其作为桥血管扩充液应用于冠状动脉旁路移植术中, 可更好地保持术后远期的通畅性。

关键词 冠状动脉旁路移植术 扩充 血管

[中图分类号] R973 [文献标识码] A

Investigation on Perspective Effect of 17 β - estradiol as the Distention Solution on Saphenous Vein. Yin Wei, Wang Liang, Zhang Lijing, et al. Cardiovascular Surgery of Baotou City Century Hospital, Inner Mongolia 014040, China

Abstract Objective This investigation compare study of 17 β - estradiol as the distention solution and other traditional distention solution the distention solution with the perspective of on saphenous vein endothelial cells, exploring its application in the clinical value, choice for coronary artery bypass grafting of great saphenous vein (GSV) to distention the smallest liquid damage, and to maximize the protection of vein endothelial cells (VEC) and vascular intimal integrity. For the clinical applications can improve after coronary artery bypass grafting great saphenous vein graft patency rate of the long - term. **Methods** Twenty one cases of coronary artery bypass grafting (CABG) patients were screened, choosing the remaining saphenous vein before coronary artery bypass grafting is separated into three sections, each 2 cm long into three groups. A group of 17 β - estradiol group ($n = 21$); B group of papaverine group ($n = 21$) and C group autologous blood mixed heparin group ($n = 21$), the expansion of liquid in each group varies. Each group a different solution to expand the expansion of comparison. **Results** Gsv's injury that were distention by 17 β - estradiol were observed by using light and electro - microscopy and immunohistochemistry. There were significant difference in the three groups ($P < 0.05$). **Conclusion** 17 β - estradiol to distention solution can theoretically maintain long patency of the Gsv graft after surgery.

Key words Coronary artery bypass grafting; Expansion; Vascular

冠状动脉旁路移植术 (coronary artery bypass graft, CABG) 是目前国际公认的最有效的治疗冠心

病方法之一, 在冠状动脉旁路移植术中, 自体大隐静脉因其解剖位置表浅, 易于游离, 取材方便且有足够的长度, 能够方便地使病变冠状动脉远端的血管与主动脉或其分支连接等优点仍然是目前最常用的桥血

AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸对 L929 成纤维细胞增殖及纤维化介质表达的影响

亓俊华 聂 刚 徐 祥 黄 宏 刘晓萍 王晓慧 吴 梅

摘 要 目的 探讨 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸对 L929 成纤维细胞增殖及纤维化介质表达的影响。方法 设计并合成 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸、AP-1, Smad3 阳性对照诱骗寡核苷酸及随机诱骗寡核苷酸, 然后通过脂质体分别转染进入 L929 成纤维细胞内。分别通过 ELISA 法、细胞计数、ATP 生物荧光法及免疫印迹法检测合成的诱骗寡核苷酸及其对 L929 细胞增殖及纤维化介质表达的影响。结果 与随机诱骗核酸对照相比, 双功能诱骗核苷酸既能明显抑制 AP-1 的 DNA 结合活性, 又能抑制 Smad3 的 DNA 结合活性 ($P < 0.01$)。与随机诱骗寡核苷酸相比, AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸、AP-1, Smad3 阳性对照诱骗核酸均能抑制 TGF- β 诱导的 L929 细胞的增殖并且降低其表达 FN、PAI-1、c-fos、Coll α 2、TGF- β 1、CTGF 等纤维化介质, 其中以 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸的作用最为显著。结论 设计并合成的 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸可以有效地抑制 L929 成纤维细胞的增殖和纤维化介质的表达。

关键词 AP-1 Smad3 诱骗寡核苷酸 L929 成纤维细胞

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Study on the Influence of a Dual AP-1 and Smad3 Decoy ODN on the Proliferation of L929 Fibroblast. Qi Junhua, Nie Gang, Xu Xiang, et al. Department of Histology and Embryology, Medical College of Qingdao University, Shandong 266071, China

Abstract Objective To explore the effect of the dual AP-1 and Smad decoy oligodeoxynucleotide on the proliferation and expression of fibrotic mediators in L929 fibroblasts. **Methods** The dual AP-1 and Smad3 decoy oligonucleotide, AP-1 and Smad3 positively controlled decoy oligonucleotide, and random decoy oligonucleotide were designed and synthesized. Then they were transfected into L929 fibroblasts via lipofectamine. The dual AP-1 and Smad3 decoy oligonucleotides was detected by ELISA. The effect of decoy oligonucleotides on the proliferation of L929 cells was detected by cell counting, ATP bioluminescence assay, and the effect on the expression of fibrotic mediators was detected by Western blot. **Results** Compared with random decoy oligonucleotide, the dual AP-1 and Smad3 decoy oligonucleotide could inhibit both the DNA binding activities of AP-1 and Smad3. ($P < 0.01$). Compared with random decoy oligonucleotide, both the dual AP-1 and Smad3 decoy oligonucleotide and the positive control of AP-1 and Smad3 decoy oligonucleotide inhibited the proliferation of the L929 fibroblasts stimulated by TGF- β and inhibited the expression of fibrotic mediators such as FN, PAI-1, c-fos, Coll α 2, TGF- β 1, CTGF. Such effects were stronger among the group of the dual AP-1 and Smad3 decoy oligonucleotide, when compared with those of the positive control group of AP-1 and Smad3 decoy oligonucleotide. **Conclusion** The dual AP-1 and Smad decoy oligodeoxynucleotide was successfully designed and synthesized, which could effectively inhibit the proliferation of fibroblast and the expression of fibrotic mediators.

Key words AP-1; Smad3; Decoy oligodeoxynucleotide; L929 fibroblasts

瘢痕形成是高等哺乳动物创伤愈合的自然结局, 但瘢痕异常增生则会导致病理性瘢痕产生^[1]。病理性瘢痕是创面过度修复和组织纤维化的结果, 增厚的

瘢痕组织不仅严重影响美观, 而且后期较易发生挛缩导致组织或器官移位变形, 引起不同程度的功能障碍^[2]。病理性瘢痕包括增生性瘢痕和瘢痕疙瘩两种, 其形成主要是由于不同原因所引起成纤维细胞的异常增殖和胶原纤维大量合成, 最终导致细胞外基质中胶原成分过度沉积^[4]。其中, 成纤维细胞又被认为是病理性瘢痕形成的关键效应细胞^[5]。对于病理性瘢痕的预防和治疗一直是临床上亟待解决的难题之一^[3]。

作者单位: 266071 青岛大学医学院组织胚胎学教研室 (亓俊华、刘晓萍、王晓慧); 325000 温州医科大学附属第一医院皮肤科 (聂刚); 400042 重庆, 第三军医大学野战外科研究所干细胞移植 & 细胞治疗中心 (徐祥、黄宏); 266071 青岛大学基础医学实验中心、人体显微结构学实验室 (吴梅)

通讯作者: 吴梅, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: mei_wu786@126.com

本研究以病理性瘢痕形成和组织纤维化的关键环节为突破口,试图设计并合成可同时抑制 Smad3 (small mothers against decapentaplegic 3) 和 AP-1 (activator protein 1) 两种转录因子转录活性的双功能诱骗寡核苷酸转染 L929 成纤维细胞,竞争抑制活化 AP-1 和 Smad3 与启动子区域的结合位点结合,进而抑制了 L929 成纤维细胞的生长、增殖,旨在为进一步研发并制备治疗病理性瘢痕和组织纤维化疾病的药物奠定基础。

材料与方法

1. 材料:L929 成纤维细胞购自 ATCC。脂质体转染试剂 LipofectamineTM2000(美国 Invitrogen 公司),96 孔酶联板(美国 Active Motif 公司的 TransAM™ Transcription factor assay kits),RPMI1640 培养基(Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青公司)。D-Hanks、胰酶、TGF-β1、BSA(Hyclone 公司)。Fn 抗体、TGF-β1 抗体、PAI-1 抗体、c-fos 抗体、Col1α2 抗体、CTGF 抗体和 β-actin 抗体、二抗(Cell Signaling 公司)。随机诱骗核苷酸序列、AP-1 阳性诱骗核苷酸序列、Smad3 阳性诱骗核苷酸序列及 AP-1 和 Smad3 双功能诱骗核苷酸序列由华大基因合成

2. 方法:(1) 诱骗寡核苷酸的设计和合成:应用美国 PE 公司 391 型 DNA 合成仪,以亚磷酸胺固相合成法合成所设计的硫代诱骗核苷酸。随机诱骗寡核苷酸序列正义链:5'-GACGCAAGCAGTAGCTATTGCTCAGTCTACCATC-3',反义链:5'-GATGGTAGACTGAGCAATAGCTACTGCTTGCCTC-3';AP-1 阳性对照诱骗寡核苷酸序列正义链:5'-GTGTCTGACTCATGTACTGTCTTACCTCATGTC-3',反义链:5'-GACATGAGGTAAGACAGTACATGAGTCAGACAC-3';Smad3 阳性对照诱骗寡核苷酸序列正义链:5'-GTCTGAGCCAGACATAGTGATGCAGACATACTC-3',反义链:5'-GAGTATGTCTGCATCACTATGTCTGGCTCAGAC-3';AP-1 和 Smad3 双功能诱骗寡核苷酸序列正义链:5'-GAGCCAGACATGAGTCATGTCTGCATTACCTCAC-3',反义链:5'-GTGA GGTAAATG-CAGACATGACTCATGTCTGGCTC-3'。以上序列全硫代修饰,由上海博亚公司合成并纯化。各对链溶于无菌 TE 溶液,分别退火形成双链,4℃ 保存。(2) ELISA 法:提取细胞核抽提物,加入完全结合缓冲液中稀释,然后依次加入 96 孔酶联板中混匀,室温孵育 1h。注以 3 复孔进行各种样品的检测实验分为:空白对照组、随机诱骗核酸组、AP-1 阳性诱骗核酸组、Smad3 阳性诱骗核酸组和双功能诱骗核酸组。以 1:500 稀释度稀释 c-fos 抗体或 Smad3 抗体,后以 100 微升/孔加入稀释的抗体,室温孵育 1h;洗脱液洗涤;以 1:1000 稀释度稀释羊抗兔 IgG-HRP 二抗,后以 100 微升/孔加入稀释的二抗,室温孵育 1h;洗脱液洗涤 4 次;以 100 微升/孔加入底物反应液,室温孵育 2~20min,待阳性对照液变深蓝色后,以 100 微升/孔加入终止液终止反应;于 450nm 和 655nm 双波长检测 OD 值,然后计算

竞争抑制率,抑制百分数计算公式为:(空白对照 OD-诱骗核酸 OD)/空白对照 OD。(3) 细胞培养和转染:L929 细胞为本实验室冻存,速溶、离心、用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬,接种到培养瓶中,37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。次日换液,取对数生长期的细胞以 2×10^4 接种于 96 孔板上,培养 12h 后更换为无血清培养基,分别按照 0.6 微升/孔脂质体和终浓度为 100nmol/L 的诱骗核苷酸的条件转染 L929 成纤维细胞。实验分为以下几组:正常对照组、TGF-β1 对照组、随机诱骗核酸组、AP-1 阳性对照组、Smad3 阳性对照组和双功能诱骗核酸组。(4) 细胞计数:96 孔板接种细胞,转染 5h 后更换为完全培养基,除了正常对照组外,其他组同时加入终浓度为 5ng/ml TGF-β1 诱导细胞增殖,培养 72h 后各取 3 孔,0.25% 胰酶消化,制成细胞悬液,血细胞计数板计数,每孔计数 6 次。(5) ATP 生物荧光法:如上所述,培养 72h 后每孔加入 ATP 提取液 100μl,混匀后室温下放置 30min,取 50μl 细胞提取液于检测板中,加入荧光素-荧光素酶 50μl,混匀后置于荧光分析仪进行检测,测定每孔样品的荧光值。并计算细胞生长抑制率,作为诱骗核酸抑制 L929 细胞增殖的评价指标,细胞生长抑制率=(空白对照组荧光值-药物组荧光值)/空白对照组荧光值。(6) 免疫印迹实验:将 L929 细胞以 1×10^5 个/平板接种在 6cm 平板中,转染 5h 后更换为完全培养基,除非诱导随机诱骗核酸对照组外,其余同时加入终浓度 5ng/ml 的 TGF-β1 诱导细胞,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养 24h;收获细胞,离心后重悬细胞,用细胞裂解液裂解细胞,抽提蛋白,并进行 PAGE 电泳,用抗 Fn 抗体(1:1000)、抗 TGF-β1 抗体(1:1000)、抗 PAI-1 抗体(1:500)、抗 c-fos 抗体(1:500)、抗 Col1α2 抗体(1:1500)、抗 CTGF 抗体(1:2000)和抗 β-actin 抗体(1:2000)进行免疫印迹实验。

3. 统计学方法:数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. ELISA 法检测诱骗核酸对 AP-1/Smad3 与其顺式作用元件结合的竞争抑制:与随机诱骗核酸对照相比,双功能诱骗药物既能明显抑制 AP-1 的 DNA 结合活性,又能抑制 Smad3 的 DNA 结合活性($P < 0.01$)。然而 AP-1 阳性对照核酸仅能抑制 AP-1 的 DNA 的结合活性($P < 0.01$),而对 Smad3 的 DNA 结合活性则无抑制作用。于此相似,Smad3 阳性对照核酸仅能抑制 Smad3 的 DNA 结合活性($P < 0.01$),而对 AP-1 的 DNA 结合活性则无抑制作用(图 1、图 2)。

2. 诱骗核苷酸对 L929 细胞数量的影响:TGF-β1 处理组于正常对照组相比细胞数量有所增加,但是和随机诱骗核酸组相比没有明显的变化。与随机诱骗寡核酸相比,AP-1、Smad3 阳性对照诱骗寡核