论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201410171

Versican 基因 RNAi 慢病毒载体的构建及其对毛乳头细胞聚集性生长的干预作用

封明霞[1],伍津津[2],杨桂红[2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所:呼吸科[1],皮肤科[2])

[摘要] **目的** 构建 Versican 基因 RNAi 慢病毒载体并研究 Versican 对毛乳头细胞聚集性生长的干预作用。**方法** 根据人 Versican 基因序列,构建4个携带 RNAi 序列的慢病毒载体,利用293T细胞进行慢病毒包装。实验分为 Control 组(不做处理)、NC 组(用空慢病毒载体包装的病毒转染细胞)和 KD1、KD2、KD3、KD4 Versican RNAi 慢病毒感染组。应用 KD1、KD2、KD3、KD4 Versican RNAi 慢病毒及 NC 慢病毒感染 H1299 细胞,荧光显微镜下观察感染效率,应用 Real-time PCR 检测 Versican 的表达,筛选出感染效率和特异性最高的慢病毒载体进行下一步研究。用慢病毒感染毛乳头细胞后,用 Real-time PCR 检测 Versican 基因的表达,并用 Western blot 检测 Versican、ADAMTS4、p-c-JUN 蛋白的表达,应用光镜观察毛乳头的生长情况。**结果** 成功构建4种慢病毒载体,其中 KD2 慢病毒感染 H1299 细胞较其他慢病毒、Control 和 NC 组显著下调 Versican mRNA 的表达($P<0.01$)。应用 KD2 慢病毒感染毛乳头细胞后,较 Control 和 NC 组明显下调毛乳头细胞 Versican mRNA 和蛋白的表达($P<0.01$),ADAMTS4、p-c-JUN 蛋白的表达较 Control 组明显下调($P<0.01$),毛乳头细胞聚集性生长的特性消失。**结论** 成功构建了 Versican 基因 RNAi 慢病毒载体。Versican 基因通过 c-JUN-ADAMTS-4 通路调控毛乳头细胞的聚集性生长。

[关键词] 多功能蛋白聚糖类;RNA 干扰;慢病毒;毛乳头细胞;聚集性生长
[中图法分类号] R322.995;R394-33;R394.2 [文献标志码] A

Construction and identification of lentiviral vector for RNA interference of human Versican gene and role of Versican in aggregative growth of dermal papilla cells

Feng Mingxia[1], Wu Jinjin[2], Yang Guihong[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, [2]Department of Dermatology, Institue of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct lentiviral vector for RNA interference (RNAi) of Versican gene and study the role of Versican in aggregative growth of dermal papilla cells (DPCs). **Methods** According to human Versican mRNA sequence, 4 specific RNAi sequences were designed for construction of 4 kinds of lentivirus vectors, and then the vectors were transferred into 293T cells for packaging lentiviruses. H1299 cells were divided into 6 groups, that is, a control group, a negative control group, and KD1, KD2, KD3 and KD4 groups transfected with KD1, KD2, KD3 and KD4 lentiviruses carrying different shRNAs, respectively. Transfection efficiency of lentiviruses was evaluated with a fluorescence microscope. The expression of Versican mRNA was detected by real-time PCR. Based on the detection data, the lentiviruses with high transfection efficiency and high specificity were chosen for further study. DPCs were transfected with the chosen lentiviruses, and the protein expression of Versican, ADAMTS4 and p-c-JUN was detected by Western blotting while the versican mRNA expression was assayed by real-time PCR. The characteristics of aggregative growth of DPCs was observed with a phase contrast microscope. **Results** Four kinds of Versican RNAi lentiviruses were constructed successfully, and KD2 lentiviruses showed the best transfection effect in the H1299 cells. The expression of Versican mRNA in the KD2 group was significantly decreased as compared

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30771934)
[通信作者] 伍津津,E-mail:wjjjj@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150505.1357.002.html(2015-05-05)

with the other groups ($P<0.01$). After the DPCs were transfected with KD2 lentiviruses, the expression of Versican at mRNA and protein levels was significantly lower than those of the control group and the negative control group ($P<0.01$). In addition, the protein expression of ADAMTS4 and p-c-JUN was significantly decreased as compared with the control group ($P<0.01$), and the characteristic aggregative growth of DPCs disappeared. **Conclusion** The lentiviral vector for RNAi of Versican gene is constructed successfully. Versican plays a role in regulating the aggregative growth of DPCs *via* the c-JUN-ADAMTS4 pathway.

[**Key words**] Versicans; RNA interference; lentiviral vector; dermal papilla cells; aggregative growth

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30771934). Corresponding author: Wu Jinjin, E-mail: wjjjj@163.com

毛乳头细胞(dermal papilla cells,DPCs)是位于毛囊延髓区的一种成纤维细胞,其主要作用是调节毛囊的发育和再生[1-2]。而毛乳头细胞是否具有诱导毛囊发育和再生的能力主要取决于毛乳头的聚集生长[3-4]。研究发现体外培养的毛乳头细胞在低代数(<7代)时呈聚集性生长。聚集性生长是毛乳头细胞培养的显著特征和反映毛乳头细胞诱导毛囊形成能力的重要特征,随着培养代数的增加,毛乳头细胞凝集性生长的特性会渐渐消失,也是脱发的重要病理生理机制,但其机制尚不清楚。

Versican是一种大分子硫酸软骨素蛋白聚糖,其作为分子信号与水化分子在多种细胞(如肿瘤细胞、炎症细胞)的黏附[5-6]、迁移[7]、增殖[8]和细胞外基质的合成[9]中发挥着重要的作用。此外,低氧及动脉粥样硬化、血管损伤中上调的Versican可以促进血管组织中生长因子、细胞因子的合成和释放,进而导致肺血管的重塑和动脉的再狭窄[10-11]。我们前期研究表明Versican在毛囊组织中表达,并且体外培养毛乳头细胞低代数(<7代)中呈高表达,随着传代数的增多而逐渐降低,Versican表达降低[12]。因此,我们推测Versican与毛乳头细胞的聚集性生长有关。

ADAMTS(a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs)为含Ⅰ型血细胞结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶,与MMPs均具有降解蛋白多糖的作用,其中ADAMTS-4是主要的蛋白聚糖酶。研究指出ADAMTS-4在退行性变疾病(如人椎间盘退化)中发挥着重要的作用[13]。Kenagy等[14]发现Versican降解可导致ADAMTS-4下调。而c-JUN是JNK信号通路的重要反应元件,同时Du等[1]研究指出Versican可激活JNK信号通路,进而增强乳腺癌细胞的迁徙和侵袭能力。这提示Versican可调控ADAMTS-4和c-JUN的表达及其功能。因此,本研究旨在探索Versican在毛乳头细胞的凝集性生长中的作用及是否通过c-JUN、ADAMTS-4发挥作用,为研究脱发的机制和探索防治策略奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和细胞

H1299、293T细胞均购自中国科学院上海细胞所,2014年1-6月在大坪医院整形中心收集5例女性患者头皮标本,年龄(50.0±1.2)岁,标本为面部松弛行面部提升术后的多余头皮组织。在术前征得了供者的同意,按照Wu等[2]建立的二步酶消化法进行DPCs的分离培养。慢病毒包装系统(由pGCSL-GFP、pHelper 2.0、pHelper 1.0组成)购自上海吉凯公司,T_4 DNA连接酶、质粒DNA提取试剂盒购自Qiagen公司,TRIzol RNA抽提试剂盒、转染试剂Lipofectamine™ 2000购自美国Invitrogen公司,M-MLV逆转录酶购自美国Promega公司,SYBRMaster Mixture购自日本TaKaRa公司,兔抗人Versican单克隆抗体购自美国Sigma公司,兔抗人p-c-JUN单克隆抗体构建CST公司,ADAMTS4抗体购自Abcam公司,β-actin购自北京天德悦生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体构建

1.2.1.1 目的基因Versican RNAi慢病毒载体的制备

从GenBank中查找Versican基因序列号(NM_004385),根据Ambion公司的软件,设计并合成4对针对Versican基因的4对含有*Hpa*Ⅰ/*Xho*Ⅰ酶切位点的siRNA,其序列分别为pSC-1:GTAGGCTGTTATGGAGATA,pSC-2:CTTACGATGTGTATTGTTA,pSC-3:GCACACTGCAATACGAGAA,pSC-4:CGAGAATTGGAGACCCAAC。经退火形成双链DNA,运用T_4噬菌体DNA连接酶与双酶切后的pGCSL-GFP连接,转化用氯化钙制备的新鲜的大肠杆菌感受态细胞。每管加入感受态细胞悬液200 μL、连接液2 μL进行转化。将150 μL已转化的感受态细胞转移到含20 mmol/L $MgSO_4$和Amp抗性的SOB琼脂培养基上,于37 ℃培养16 h。使用载体多克隆位点两端的引物(上游:5′-GCCCCGGTTAATT-TGCATAT-3′;下游:5′-GAGGCCAGATCTTGGGTG-3′)进行PCR扩增检测阳性菌落。挑选阳性克隆菌液送Invitrogen公司进行测序分析。

1.2.1.2 慢病毒载体的小量包装 胰酶消化对数生长期的293T细胞,重新接种于细胞培养皿上,细胞密度达70%~80%时转染,转染前2 h将细胞培养基更换为无血清培养基,慢病毒包装系统中各质粒的DNA溶液中pGC-LV载体20 μg,pHelper1.0载体15 μg,pHelper2.0载体10 μg;与相应体积的Opti-MEM混合均匀,调整总体积为2.5 mL,在室温下温育5 min。将Lipofectamine™ 2000试剂轻柔摇匀,取100 μL Lipofectamine™ 2000试剂在另一管中与2.4 mL Opti-MEM混合,在室温下温育5 min。把稀释后的DNA与稀释后的Lipofectamine™ 2000进行混合,轻轻地颠倒混匀约3 min。室温下温育20 min,将DNA与Lipofectamine™ 2000混合液转移至293T细胞的培养液中混匀,于37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养8 h。用PBS轻轻冲洗培养瓶,再在每瓶细胞中加入含10%血清的细胞培养基25 mL,于37 ℃、5% CO_2培养箱内继续培养48 h。收集转染48 h后的293T细胞上清液。于4 ℃、4 000×*g*离心10 min,以除去细胞碎片。再用0.45 μm滤器过滤上清液于40 mL超速离心管中。把病毒粗提液样品加入到过滤杯中并盖上盖子,将过滤杯插到滤过液收集管中。组合好后,做好平衡,放在转头上。在4 000×*g*离心约15 min。离心结束后,取出离心装置,将过滤杯和下面的滤过液收集杯分开。样品收集杯中的即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液移出,分装后保存在病毒管中;一部分-80 ℃长期保存,另一部分逐孔稀释法测定滴度。

1.2.1.3 实验分组 实验分别为3组:①Control组:不做任何处理;②NC组:用空慢病毒载体包装的病毒转染细胞;③慢病毒感染组:应用KD1、KD2、KD3和KD4 Verscican RNAi慢病毒分别感染细胞。

1.2.1.4 慢病毒载体干扰效果的鉴定 对数生长期的靶细胞H1299细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液(细胞数约为2×10^4),并接种于12孔板,37 ℃、5% CO_2培养箱培养待细胞融合度达到约30%,根据感染复数(MOI)值,加入适宜量的病毒,12 h后更换培养基。感染4 d后观察慢病毒上报告基因GFP的表达情况,感染效率大于50%者继续培养;感染效率低于50%的实验组,重新进行感染实验。感染5 d后收集细胞,采用实时聚合酶链反应(RT-PCR)的方法检测Versican mRNA表达情况,判断不同靶点的干扰效果。β-actin上游引物序列:5′-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3′,下游5′-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3′,产物大小202 bp;Versican上游引物:5′-TCACTCTAATCCCTGTCGTAATG-3′,下游:5′-ATGTCTCGGTATCTTGCTCAC-3′,产物大小113 bp。反应体系:每管加入SYBR premix *ex Taq* 10 μL、上游引物(5 μmol/L)0.5 μL、下游引物(5 μmol/L)0.5 μL、cDNA 1.0 μL和水8.0 μL。设定程序为两步法Real-Time定量:预变性95 ℃ 15 s、之后每一步变性95 ℃ 5 s、退火延伸60 ℃ 30 s,共进行40个循环,数值分析采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$分析法。

1.2.1.5 慢病毒载体的中量包装 用筛选出的最有效的Versican siRNA序列构建的重组质粒(具体方法参照1.2.1.2),并大量制备Versican shRNA慢病毒表达载体(相当于小量包装10倍的量),用于后续的系列研究。

1.2.2 Western blot检测慢病毒对毛乳头细胞Versican、ADAMTS4和p-c-JUN表达的影响 将上述构建好的含有有效干扰靶点的慢病毒载体按照一定的MOI数感染第2代毛乳头细胞,待细胞贴壁达80%时,用PBS将贴壁的细胞冲洗3遍后,加入蛋白裂解液,冰上刮拭,并于4 ℃、12 000×*g*离心20 min,取上清。采用考马斯亮蓝定量总蛋白,各取20 μg/孔,行10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。待电泳完毕后电转印40 min至硝酸纤维素膜,在室温下封闭3 h。分别加入兔抗人Versican单克隆抗体(1∶1 000)、ADAMTS4抗体(1∶500)、p-c-JUN(1∶500)后,4 ℃过夜,并加入二抗为HRP偶联的抗兔IgG(1∶5 000稀释),室温反应2 h,增强化学发光法显色。

1.2.3 qRT-PCR检测慢病毒对毛乳头细胞Versican mRNA表达的影响 将上述构建好的含有有效干扰靶点的慢病毒载体按照一定的MOI数感染第2代毛乳头细胞,待细胞贴壁达80%时,用PBS将贴壁的细胞冲洗3遍后,加入TRIzol,按照提取总RNA试剂盒说明书提取毛乳头细胞的总RNA。取1 μg总RNA按照反转录试剂盒说明书以65 ℃ 5 min,冰浴5 min进行预处理后,42 ℃ 60 min,72 ℃ 5 min将总RNA反转录为cDNA。Real-time PCR检测和分析条件同1.2.1.3。

1.2.4 观察Versican shRNA慢病毒感染毛乳头细胞对其生长方式的影响 慢病毒载体颗粒感染第2代DPCs后,传代培养7~10代,在相差显微镜下观察细胞生长状态的变化。

1.3 统计学分析

实验重复3次,数据以$\bar{x}\pm s$形式表示,运用SPSS 13.0统计软件对多组间实验结果进行单因素方差分析,2组数据间比较采用独立样本的*t*检验。

2 结果

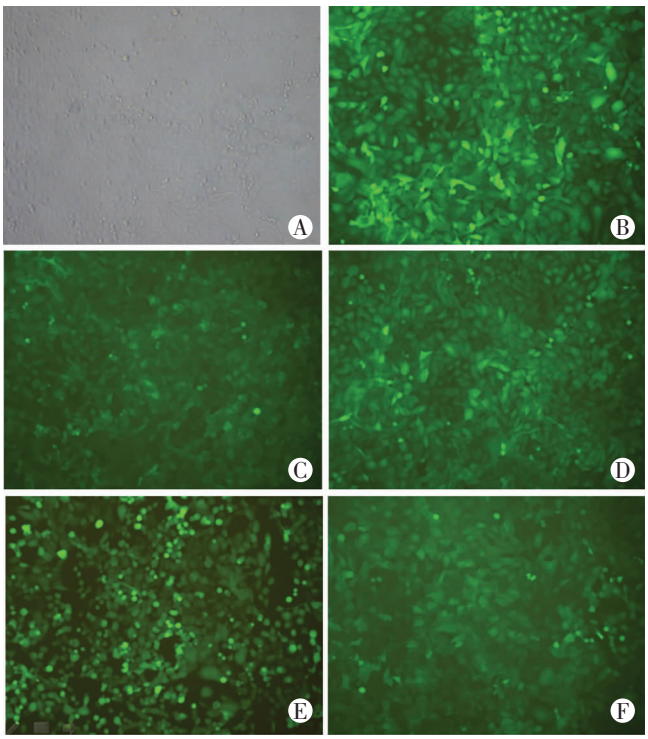
2.1 慢病毒载体的构建

2.1.1 阳性克隆PCR鉴定 Versican基因shRNA

的寡核苷酸序列,经退火形成双链 DNA,与经双酶切的 pGCSL-GFP 载体连接并转化感受态菌后,挑选重组克隆经 PCR 鉴定并送测序,证实合成的 Versican shRNA 核苷酸序列插入正确,无序列突变。

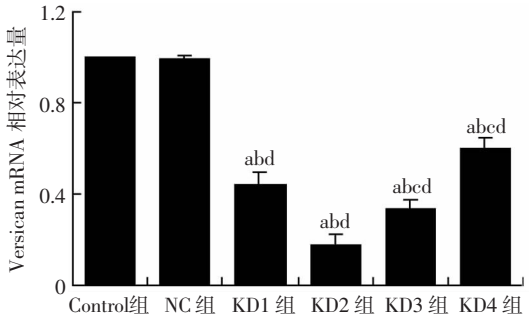
2.1.2　慢病毒载体的包装及病毒滴度的测定　　将筛选出的重组载体与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,在荧光显微镜下观察计数各孔中 GFP 的表达量,病毒滴度为表达 GFP 的细胞数 × 相应的稀释倍数。4 个靶点的病毒载体测定的滴度均为 2×10^9TU/mL。

2.1.3　RNAi 有效靶点的筛选　　针对靶基因的不同 siRNA 双链所构建的 4 种慢病毒及空载体慢病毒分别转染 H1299 细胞,转染 24 h 后,应用荧光显微镜观察,结果显示各组慢病毒感染 H1299 细胞的转染效率均在 90% 以上(图 1)。同时提取总 RNA,应用 Real-time PCR 检测 H1299 细胞中 Versican 的表达。结果显示 KD1、KD2、KD3 和 KD4 组中 Versican 的表达显著低于 Control 和 NC 组($P < 0.01$),与 KD1 组比较,KD2 和 KD3 组 Versican 的表达显著降低($P < 0.05$,$P < 0.01$),而 KD4 组表达显著升高($P < 0.01$);与 KD2 组比较,KD1、KD3、KD4 组中 Versican 的表达显著升高($P < 0.01$,图 2)。上述结果说明 4 种慢病毒均可有效感染靶细胞,并下调 Versican 的表达,其中 KD2 慢病毒效果最佳。后续实验将使用 KD2 病毒进行感染细胞。



A: Control 组;B: NC 组; C: KD1 组; D: KD2 组; E: KD3 组; F: KD4 组;A: 光镜;B ~ F:荧光显微镜

图 1　慢病毒感染 H1299 细胞后 GFP 的表达　(×100)

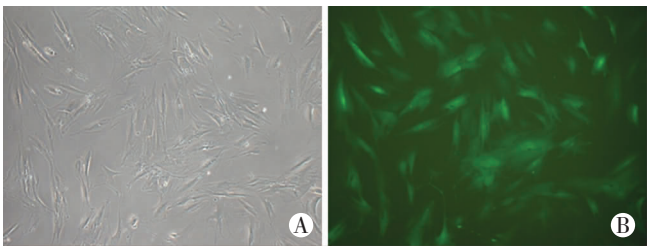


a: $P < 0.05$,与 Control 组比较;b: $P < 0.05$,与 NC 组比较;c: $P < 0.05$,与 KD1 组比较;d: $P < 0.05$,与 KD2 组比较

图 2　qRT-PCR 检测 4 种慢病毒对 H1299 细胞中 Versican 的沉默效果

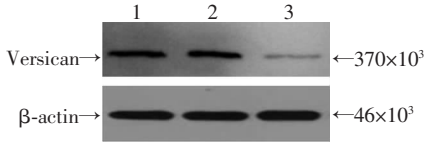
2.2　慢病毒载体感染毛乳头细胞后 Versican mRNA 和蛋白的表达

利用 Versican RNAi(KD2)慢病毒及 NC 组慢病毒成功感染毛乳头细胞(图 3)后,应用 qRT-PCR 检测各组 Versican mRNA 的表达,结果显示 NC 组和慢病毒感染组中 Versican mRNA 表达较 Control 组分别降低(97.30 ± 4.04)% 和(28.33 ± 1.5)%,慢病毒感染组 Versican 蛋白表达显著低于 Control 和 NC 组($P < 0.01$)。Western blot 检测结果显示 NC 组和慢病毒感染组中 Versican 蛋白表达水平降低至对照组的(96.33 ± 3.05)% 和(33.67 ± 2.51)%,慢病毒感染组 Versican 蛋白表达显著低于 Control 组和 NC 组($P < 0.01$,图 4)。



A:光镜;B:荧光显微镜

图 3　慢病毒感染毛乳头细胞后 GFP 的表达　(×100)



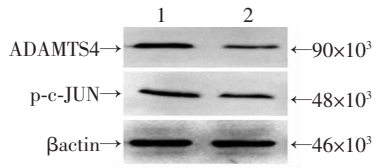
1:Control 组;2:NC 组;3:KD2 慢病毒感染组

图 4　Western blot 检测慢病毒感染毛乳头细胞后 Versican 蛋白的表达

2.3　慢病毒载体感染毛乳头细胞后 ADAMTS4 和p-c-JUN 蛋白表达变化

利用 Versican RNAi(KD2)慢病毒成功感染毛乳头细胞后,Western blot 检测结果显示慢病毒感染组

中 ADAMTS4 和 p-c-JUN 蛋白表达降低至 Control 组的(31.00±2.64)%和(45.67±2.52)%,慢病毒感染组 ADAMTS4 和 p-c-JUN 蛋白表达显著低于 Control 组($P<0.01$,图5)。

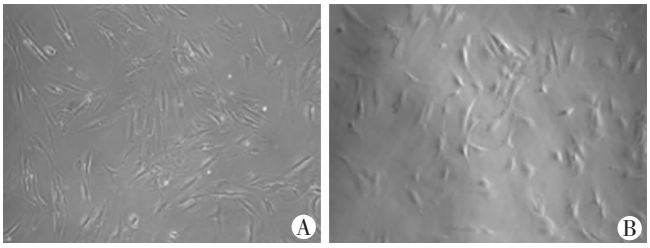


1:对照组;2:KD2 慢病毒感染组

图5 Western blot 检测慢病毒感染后毛乳头细胞中 ADAMTS4和 p-c-JUN 蛋白表达

2.4 慢病毒载体感染毛乳头细胞后聚集性生长情况

正常培养的第2代 DPCs 呈凝集性生长(图6A),而转染了 Versican RNAi 的第2代 DPCs,细胞呈不规则的多边形,边缘模糊,折光度明显降低,形态略显老化,继续传代培养长期观察发现,细胞不再出现凝集性生长的现象(图6B)。



A:正常培养毛乳头细胞;B:慢病毒感染毛乳头细胞

图6 相差显微镜观察第2代毛乳头细胞生长 (×100)

3 讨论

本研究成功构建4个 Versican shRNA 慢病毒载体,并感染毛乳头细胞,结果显示其均可高效的感染毛乳头细胞,并显著降低 Versican mRNA 的表达,其中第2个靶点的敲低效率最为突出,为进一步研究 Versican 基因在毛囊周期性发育以及毛囊相关疾病中的重要作用机制奠定了实验基础。

Versican 基因位于鼠的13号染色体和人的5号染色体上[15]。它是由9万个碱基对的连续 DNA 编码的15个外显子组成。Versican 的表达是由1个位于 TATA-box 上的启动子和一些转录因子结合位点所调节的。这些转录因子包括 AP2、CCAAT 增强子蛋白及 cAMP 应答元件等[16]。由于存在 RNA 剪切的差异性,导致了两种不同亚型的葡萄糖胺聚糖(α-GAG、β-GAG)表达的存在或缺失,Versican 共有4种亚型[17-18]——V_0、V_1、V_2、V_3。近来的实验证实,转染了部分 Versican 基因(vers-GFP)的转基因小鼠,毛乳头细胞的 GFP 表达强阳性,可用流式细胞仪分离出来,与角质形成细胞共同培养可表现出诱导毛囊形成的能力;而 GFP 阴性的真皮细胞则不具有诱导毛囊形成。进一步的实验研究表明:Versican 在毛囊形态发生、再生和生长中具有重要的诱导作用,在鼠和人类头皮毛囊中,Versican 的基因和蛋白表达与毛乳头的生长周期显著相关,生长期的毛乳头表达非常明显,退行期明显减少,而休止期不表达,且在雄性秃发之毳毛样毛囊的毛乳头中 Versican 基因表达几乎丧失[19]。本研究发应用 Versican RNAi 慢病毒感染细胞后,毛乳头细胞的凝集性生长的特性消失,说明 Verscian 在毛乳头细胞凝集性生长中发挥着重要作用,进而可影响毛囊的发育。

本研究结果显示:毛乳头细胞下调 Versican 基因后,p-c-JUN 和 ADAMTS-4 的表达均降低,说明在毛乳头细胞中 Versican 可调节 p-c-JUN 和 ADAMTS-4 的表达,同时也说明了 p-c-JUN 和 ADAMTS-4 参与了毛乳头细胞聚集性生长的调控。研究表明:TGF-β 等生长因子可促进毛乳头细胞的增殖和聚集性生长,而 TGF-β 可通过诱导 JNK 信号通路(c-JUN)的激活导致 ADAMTS-4 的表达[20-22],提示 c-JUN-ADAMTS-4 可能参与了毛乳头细胞的聚集性生长的调节。此外,我们的前期研究表明细胞外基质的水平与毛乳头细胞聚集性生长的能力呈正相关,而当毛乳头细胞丧失聚集性生长能力时,细胞外基质水平显著降低[3]。研究表明 ADAMTS-4 在调节多种细胞的细胞外基质中发挥着关键作用[23-24],提示 ADAMTS-4 参与了乳头细胞聚集性生长。因此,本研究结果说明 Verscian 通过 JUN/ADAMTS-4 通路发挥了对毛乳头细胞聚集性生长的调控作用。

本研究仅从体外研究 Versican 对毛乳头细胞聚集性生长特性的调控功能,但具体机制还需进一步研究。此外,Versican 是否在体内实验中仍具有调控毛乳头细胞的功能尚不清楚,需进一步研究。

综上所述,本研究成功构建 Versican RNAi 慢病毒载体,并发现 Versican 基因可调控毛乳头细胞的聚集性生长,其是通过 c-JUN-ADAMTS-4 通路发挥作用的。

参考文献:

[1] Du W W, Fang L, Yang W, *et al*. The role of Versican G3 domain in regulating breast cancer cell motility including

effects on osteoblast cell growth and differentiation *in vitro*-evaluation towards understanding breast cancer cell bone metastasis[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 341.

[2] Wu J J, Liu R Q, Lu Y G, *et al*. Enzyme digestion to isolate and culture human scalp dermal papilla cells: a more efficient method[J]. Arch Dermatol Res, 2005, 297(2): 60-67.

[3] 麦跃, 刘荣卿, 伍津津, 等. 毛乳头细胞凝集性生长对诱导毛囊样结构形成能力的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(13): 1197-1200.

[4] 伍津津, 刘荣卿, 麦跃, 等. 毛乳头细胞诱导毛囊形成的研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(2): 108-112.

[5] Kawashima H, Hirose M, Hirose J, *et al*. Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, Versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 35448-35456.

[6] Watanabe N, Kawashima H, Li Y F, *et al*. Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. III. Characterization of L-selectin reactive heparan sulfate proteoglycans[J]. J Biochem, 1999, 125(4): 826-831.

[7] Perissinotto D, Iacopetti P, Bellina I, *et al*. Avian neural crest cell migration is diversely regulated by the two major hyaluronan-binding proteoglycans PG-M/Versican and aggrecan [J]. Development, 2000, 127(13): 2823-2842.

[8] Zhang Y, Cao L, Kiani C, *et al*. Promotion of chondrocyte proliferation by Versican mediated by G1 domain and EGF-like motifs[J]. J Cell Biochem, 1999, 73(4): 445-457.

[9] Isogai Z, Aspberg A, Keene D R, *et al*. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks[J]. J Biol Chem, 2002, 277(6): 4565-4572.

[10] Wight T N, Merrilees M J. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for Versican[J]. Circ Res, 2004, 94(9): 1158-1167.

[11] Andersson-Sjoland A, Hallgren O, Rolandsson S, *et al*. Versican in inflammation and tissue remodeling: the impact on lung disorders[J]. Glycobiology, 2015, 25(3): 243-251.

[12] Feng M, Yang G, Wu J. Versican targeting by RNA interference suppresses aggregative growth of dermal papilla cells [J]. Clin Exp Dermatol, 2011, 36(1): 77-84.

[13] Song R H, Tortorella M D, Malfait A M, *et al*. Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5[J]. Arthritis Rheum, 2007, 56(2): 575-585.

[14] Kenagy R D, Min S K, Clowes A W, *et al*. Cell death-associated ADAMTS4 and Versican degradation in vascular tissue [J]. J Histochem Cytochem, 2009, 57(9): 889-897.

[15] Iozzo R V, Naso M F, Cannizzaro L A, *et al*. Mapping of the Versican proteoglycan gene (CSPG2) to the long arm of human chromosome 5 (5q12-5q14)[J]. Genomics, 1992, 14(4): 845-851.

[16] Wu Y J, La-Pierre D P, Wu J, *et al*. The interaction of Versican with its binding partners[J]. Cell Res, 2005, 15(7): 483-494.

[17] Kenagy R D, Plaas A H, Wight T N. Versican degradation and vascular disease[J]. Trends Cardiovasc Med, 2006, 16(6): 209-215.

[18] Rahmani M, Wong B W, Ang L, *et al*. Versican: signaling to transcriptional control pathways[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2006, 84(1): 77-92.

[19] Soma T, Tajima M, Kishimoto J. Hair cycle-specific expression of Versican in human hair follicles[J]. J Dermatol Sci, 2005, 39(3): 147-154.

[20] Tian Y, Yuan W, Fujita N, *et al*. Inflammatory cytokines associated with degenerative disc disease control aggrecanase-1 (ADAMTS-4) expression in nucleus pulposus cells through MAPK and NF-kappaB[J]. Am J Pathol, 2013, 182(6): 2310-2321.

[21] Yaykasli K O, Hatipoglu O F, Yaykasli E, *et al*. Leptin induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 genes expression by mitogen-activated protein kinases and NF-κB signaling pathways in human chondrocytes[J]. Cell Biol Int, 2015, 39(1): 104-112.

[22] Salter R C, Arnaoutakis K, Michael D R, *et al*. The expression of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4 in human macrophages is inhibited by the anti-atherogenic cytokine transforming growth factor-beta and requires Smads, p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2011, 43(5): 805-811.

[23] Vistnes M, Aronsen J M, Lunde I G, *et al*. Pentosan polysulfate decreases myocardial expression of the extracellular matrix enzyme ADAMTS4 and improves cardiac function in vivo in rats subjected to pressure overload by aortic banding [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e89621.

[24] Ren P, Zhang L, Xu G, *et al*. ADAMTS-1 and ADAMTS-4 levels are elevated in thoracic aortic aneurysms and dissections[J]. Ann Thorac Surg, 2013, 95(2): 570-577.

(收稿:2014-11-12;修回:2015-01-06)

(编辑 栾 嘉)