

长链非编码 RNA 在动脉粥样硬化中的研究进展

易明¹, 刘强^{1,2}, 柯晓²

(1. 南华大学, 湖南省衡阳市 421000; 2. 中国医学科学院阜外医院深圳医院 深圳市孙逸仙心血管医院, 广东省深圳市 518000)

[关键词] 长链非编码 RNA; 动脉粥样硬化

[摘要] 动脉粥样硬化(As)是一种复杂的慢性疾病,其特征是血管壁中的脂质沉积,涉及到主要功能细胞,包括平滑肌细胞、内皮细胞和免疫细胞的炎性和增殖性级联反应。目前,As 机制的认知以及动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)的治疗有了实质性的改善,但疾病死亡率以及经济负担仍然很高。长链非编码基因(lncRNA)是一种不具有编码蛋白质功能的转录产物,广泛参与细胞发育、增殖、分化、凋亡等生物学功能的调节。在肿瘤、神经系统疾病等研究领域,已被作为重要的生物标记物以及治疗靶点被广泛研究。同时,大量证据表明在 As 的调节通路中 lncRNAs 同样发挥着重要的作用,不仅更全面地阐述了 As 发生发展机制,也为开发新型诊断标记物和治疗方向提供了新的方向。

[中图分类号] R541.1

[文献标识码] A

Long noncoding RNAs in atherosclerosis

YI Ming¹, LIU Qiang^{1,2}, KE Xiao²

(1. University of South China, Hengyang, Hunan 421000; 2. Chinese Academy of Medical Sciences Fuwai Hospital Shenzhen Hospital, Shenzhen Sun Yixian Cardiovascular Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

[KEY WORDS] lncRNA; atherosclerosis

[ABSTRACT] Atherosclerosis (As) is a complicated chronic disease characterized by lipid deposition in the blood vessel wall, involving inflammatory and proliferative cascade of major functional cells, including smooth muscle, endothelial cells and immune cells. At present, the cognitive mechanism of atherosclerosis and the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) have been substantially improved, but the mortality rate and economic burden are still high. Long non coding RNAs (lncRNAs) is a transcription product that does not have the function of encoding proteins. It is widely involved in the regulation of cell biological functions such as cell development, proliferation, differentiation and apoptosis. It has been extensively studied as an important biomarker and therapeutic target in research fields such as tumor diseases and nervous system diseases. At present, a large amount of evidence indicates that lncRNAs also play an important role in the regulation pathway of atherosclerosis, which not only can further understand atherosclerosis, but also provide new directions for developing new diagnostic markers and treatments.

虽然近几十年来动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)诊断与治疗有了实质性的改善,但 ASCVD 全球发病率和死亡率依然位居首位^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)作为 ASCVD 发病的基础,其病理过程

涉及重要功能细胞的增殖、分化、凋亡等多种生物学功能。虽然对 As 机制的研究已经非常深入,但是作为基因遗传易感性疾病,转录组水平的研究能够对发病机制予以完整的阐述,同时为开发新的生物标记物以及治疗方法提供机遇。在数量众多的非

[收稿日期] 2019-07-31

[修回日期] 2019-09-09

[基金项目] 国家自然科学基金(81700213);深圳市科创委资助课题(JCY20180302173849459, JCYJ20170307161535847)博士创新项目(SZBC2017007)

[作者简介] 易明,硕士研究生,研究方向为心血管内科动脉粥样硬化以及心肌纤维化,E-mail 为 mingming8909@163.com。通信作者柯晓,博士,副主任医师,研究方向为心血管内科介入以及心肌纤维化、心肌缺血再灌注损伤,E-mail 为 xiaokehospital@126.com。

编码转录产物中, lncRNAs 是一种重要的调节介质。通常长度大于 200 个碱基, 并且具有与信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 类似的特征, 但几乎没有开放阅读框, 因此不具有翻译功能^[2]。但可以参与表观遗传、转录以及转录后的调控, 在疾病发生的过程中发挥着重要的作用^[3]。随着高通量测序以及 lncRNAs 表征实验技术的成熟, 部分 lncRNAs 在 As 的调控通路中的作用也得到了验证。现就 lncRNAs 在 As 发生发展过程中的作用及相关机制予以综述, 主要是对参与 As 形成和发展的功能细胞以及危险因素予以介绍。

1 lncRNAs 概述

人类基因组只有不到 2% 能够编码蛋白质, 大部分 (>80%) 被有效转录为非编码 RNA (noncoding RNA, ncRNA)^[2], 这些“暗物质”长期未被认知, 随着 DNA 百科全书计划 (the encyclopedia of DNA elements, ENCODE) 启动, 阶段性测序表征最终证明 ncRNA 广泛参与表观遗传以及转录前后的调节^[3], 其中 lncRNAs 广泛表达, 在细胞核和细胞质中均有表达, 具有组织特异性、时相特异性的表达模式, 但物种间保守性有限^[3]。

1.1 lncRNAs 分类命名

lncRNAs 是重要的非编码基因, 根据其长度、来源、形成机制和编码基因相似性等进行多种分类。根据与编码基因位置关系分为: 基因间 lncRNAs (intergenic lncRNAs, lincRNAs)、双向 lncRNAs (bidirectional lncRNAs)、内含子 lncRNAs (intronic lncRNAs)、同义 lncRNAs (sense overlapping lncRNAs) 以及反义 (antisense lncRNAs)^[3]。此外还包括按亚细胞结构定位分类^[4]: 如染色质交联 RNA (Chromatin-interlinking RNA, ciRNA), 根据功能进行分类^[4]: 如内源性竞争性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 等等, 不断涌现的分类方法是为了适应不断新发现的 lncRNAs 提供转录组数据的注释。

1.2 lncRNAs 的主要调节机制

尽管许多人类基因组可以转录 lncRNAs, 但目前仍然只有少数已经在功能上表征。lncRNA 的已知功能有: 信号、诱饵、指导和支架^[5]。同时对于这些功能与 lncRNAs 的细胞区室定位有关, 定位于细胞核, 则对表观修饰、转录发挥调节作用^[6]: ①通过调节同源基因染色质结构、组蛋白修饰以及增强子-启动子环化干扰下游基因表达。②干扰前 mRNA

(pre-mRNA) 加工从而调节 mRNA 剪接。③反义 lncRNAs, 可以通过碱基互补配对指导 mRNA 产生内源性小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)。定位于细胞质, lncRNAs 则可通过调节翻译效率, 作为微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 海绵, 影响 RNA 稳定性, 进而在转录后水平进行调节^[3]: ④通过充当诱饵, 影响 mRNA 细胞质穿梭和定位。⑤充当海绵隔离 miRNA 来调节 mRNA 稳定性或者作为小分子 RNA 的前体。⑥与特定蛋白结构结合影响蛋白质翻译。⑦翻译后蛋白质修饰, 如影响高级结构的折叠, 影响蛋白质活性。⑧编码多肽^[7]。

1.3 lncRNAs 主要的检索数据库

虽然目前没有专门针对 ASCVD 以及 As 的数据库, 为了方便地查询和研究 lncRNAs, 将现有的主要数据库列举见表 1。

2 lncRNAs 与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化性疾病作为一种遗传易感性疾病, 通过全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 发现冠状动脉疾病 (coronary artery disease, CAD) 与染色体 9p21.3 之间的强相关性^[8], 同时 INK4 基因座中反义非编码 RNA (antisense noncoding RNA in the INK4 locus, ANRIL) 与 As 严重程度相关。虽然这种关联机制的具体内涵仍然不清楚, 但目前已有研究指出 ANRIL 能够介导内皮细胞的增殖、黏附、凋亡^[9-10], 而内皮细胞作为 As 发生和发展过程中的重要功能细胞, 因此有助于解读这种强相关性。

除了 GWAS 这种遗传流行病学方法, 还可通过对疾病样本进行转录组测序表明疾病与 lncRNAs 之间的相关性。而这种分子流行病学方法主要是通过通过对动脉粥样斑块或动脉粥样硬化性心血管疾病个体的外周血进行测序。比如急性心肌梗死外周血转录本测序^[11], 不仅可以筛选差异表达的 lncRNAs 然后进行表征, 同时还可以作为诊断以及预后判断的生物标记物。

通过上述方法均能够确认 As 与 lncRNAs 的相关性, 且目前已有部分 lncRNAs 已经得到了进一步验证。鉴于内皮细胞、平滑肌细胞以及免疫炎症细胞是参与动脉粥样硬化形成的重要细胞, 因此主要叙述 lncRNAs 在这些细胞中的调节机制。

2.1 lncRNAs 调节内皮细胞功能

血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 对于调节血管稳态十分重要, 在氧化应激、炎症、剪切应力等刺

表 1. lncRNAs 检索数据库

Table 1. lncRNAs research resources

数据库名称	网址	主要特点
HGNC	https://www.genenames.org/	lncRNA 的命名
GENCODE	http://www.genecodegenes.org/	高精度注释 15779 个人类 lncRNA 基因
LNCipedia	http://www.lncipedia.org/	二级结构信息,编码潜力和 miRNA 结合位点预测
NONCODE	http://www.noncode.org/	汇总 17 个物种的 lncRNA 基因注释信息
lncRNator	http://lncrnator.ewha.ac.kr/index.htm	整合来自 ENSEMBL, HGNC, MGI 和 lncRNAdb 的 lncRNA 信息,提供 mRNA 和 lncRNA 的共表达分析
lncRNASNP2	http://bioinfo.life.hust.edu.cn/lncRNASNP/	lncRNAs 中单核苷酸多态性(SNPs)综合数据库
DIANA-lncBase	http://carolina.imis.athena-innovation.gr/	miRNA-lncRNA 功能性相互作用以及保守性分析
lncRNAdb	http://www.lncrnadb.org/	全面注释 lncRNA 序列结构信息,基因组背景,表达,亚细胞定位,保守性以及功能预测
lncDisease	http://www.cuilab.cn/lncrnadisease/	lncRNA-疾病关联数据,预测 lncRNA 相关疾病
starbase	http://starbase.sysu.edu.cn/starbase2/	构建 ceRNA 网络
lncRscan-SVM	https://sourceforge.net/projects/lncscansvm/	来源基因,潜在密码子序列和保守性的特征分析
lncRNA-MFDL	https://omictools.com/lncrna-mfdl-tool	识别 lncRNA
lncRNA-ID	https://omictools.com/lncrna-id-tool	鉴定 lncRNA
lncBook	http://bigd.big.ac.cn/lncbook/lncrnas	数据最为丰富的人类 lncRNA 数据库

激下可出现内皮功能障碍。内皮功能障碍是血管疾病的初始阶段,并且是 As 重要预后指标。目前已有多个 lncRNAs 验证了在内皮细胞中的作用,因此,关于影响内皮功能障碍的信号传导途径所涉及的 lncRNAs 研究,有助于开发血管疾病的治疗靶标。

Singh 等^[12]最先描述氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)介导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein/vascular endothelium cell, HUVEC)中 lncRNA 和 mRNA 表达谱。其结果发现 HUVEC 在 ox-LDL 暴露后,共有 923 个 lncRNAs 显著上调,975 个显著下调。在相同的样本中,有 518 个 mRNAs 被上调,572 个被下调。这不仅表明 lncRNAs 参与 As 形成,更重要的是这些差异表达提供了可供进一步表征的候选基因。Michalik 等^[13]更进一步指出,在不同来源的 EC 中表达相对保守且表达水平较高的是转移相关肺腺癌转录物 1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)、牛磺酸上调基因 1 (taurine up-regulated1, TUG1)、母系印迹基因 3 (maternally expressed gene 3, MEG3)、linc00657 和 linc00493。

MALAT1, 也被称作非编码富核的丰富转录本 2 (noncoding nuclear-enriched abundant transcript 2, NEAT2), 是第一个被鉴定与肺癌相关联的 lncRNA。该基因高度保守,且广泛表达于多种组织,是表征最多的 lncRNA。MALAT1 在大血管和微血管中的

内皮细胞均有表达^[13]。在缺氧以及血管内皮生长因子的刺激下, MALAT1 沉默能抑制 EC 增殖,并促成迁移表型^[13], 这种现象可能是通过调节细胞周期蛋白而实现的^[14]。此外过表达的 MALAT1 还可通过下调 miR-145 促进转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β 1) 诱导的内皮-间质转化 (endothelial-to-mesenchymal transition, EndMT)^[15] 以及激活 Wnt/ β -catenin 信号通路促使 ox-LDL 诱导 EndMT^[16]。

MEG3 是一种印迹基因, 定位于染色体 14q32.3, 是第一个被发现具有肿瘤抑制功能的 lncRNA。Boon 等^[17]对衰老 HUVEC (第 16 至 18 代) 深度测序发现 MEG3 是唯一显著增加的 lncRNA, 表明抑制 MEG3 表达可以作为干预衰老相关 EC 功能损伤的潜在治疗策略。在接下来的功能验证过程中, He 等^[18]发现过表达 MEG3 能够以分子海绵的方式负调节 miR-9, 从而显著抑制 EC 的增殖和体外血管生成, 而敲除 MEG3 具有相反的作用。Ruan 等^[19]也指出敲低 MEG3 显著抑制血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) mRNA 的表达水平, 同时抑制血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 诱导的内皮细胞迁移和血管生成, 但是对血管内皮细胞生长因子受体 1 (vascular endothelial growth factor receptor 1, VEGFR1) mRNA 水平没有影

响。这些研究均强调了 MEG3 在血管生成和维持血管内皮细胞正常功能中的重要性,但潜在的机制在很大程度上是未知的,且 MEG3 与疾病整体上的相关性尚不清楚。

TUG1 最初是在牛磺酸处理的视网膜细胞中鉴定的一种 lncRNA^[20],该 RNA 促进细胞增殖并在肿瘤细胞中上调^[21],在 EC 中高表达^[13],而 CAD 患者外周血测序时则发现血清 TUG1 显著降低^[22],机制不清。新近有研究指出下调 TUG1 减轻 ox-LDL 诱导的 HUVEC 氧化损伤,减少 HUVEC 凋亡^[23]。TUG1 沉默还能够削弱雷帕霉素诱导的 HUVEC 细胞增殖和迁移的抑制^[24]。

此外,还有些验证的 lncRNAs,比如参与表观遗传调控,从而指引关键内皮基因转录表达的 MANTIS(lncRNA n342419)^[25]、稳定 EC 表型的平滑肌和内皮细胞富集的迁移/分化相关的长链非编码 RNA(smooth muscle and endothelial cell enriched migration/differentiation-associated long noncoding RNA,SENCR)^[26]以及抑制内皮细胞凋亡的母系印记转录物 H19(H19 imprinted maternally expressed transcript H19)^[27-29]。

总体而言,这里提到一些新的研究证据再次强调了 lncRNAs 在 EC 功能调节中的重要作用,而且主要集中在 EC 模型。

2.2 lncRNAs 与平滑肌细胞

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)具有可塑性,在炎症刺激以及血流应力物理刺激下可转化为低分化形式,去分化后的 VSMC 获得再增殖能力伴随着迁移,并且可以合成细胞外基质、分泌促炎因子以及吞噬胆固醇形成泡沫细胞,从而促进斑块形成,在 As 中发挥着重要的作用。目前,大量的研究发现 ncRNA 在转录后水平对 VSMC 的分化进行调节,从而影响 VSMC 的增殖和迁移。而通过对人血管平滑肌细胞高通量转录测序,鉴定了许多 lncRNAs,表明 lncRNAs 可以通过调节 VSMC 的表型转换以及细胞功能从而发挥调控 As 发生的作用^[30]。

较早一些研究 lncRNAs 对 VSMC 和 As 发展的作用,主要是一些在动脉粥样斑块以及 ASVCD 外周血液标本测序中已经鉴定的 lncRNAs,包括 ANRIL^[31]、TUG1^[32]、H19^[27-29]以及透明质酸合成酶 2 反义转录物(HAS2 antisense RNA 1, HAS2-AS1)^[33]。而 Bell 等^[34]则率先通过直接对人类冠状动脉平滑肌细胞进行测序,其结果揭示了 31 个未曾注释的 lncRNAs,这其中就包括 SENCN,同时对其进行了功

能验证,提示 SENCN 可以稳定平滑肌细胞的收缩表型^[34]。在 VSMC 中表征最清楚的应该是基因间长链非编码 RNA-p21(long intergenic non-coding RNA-p21, lincRNA-p21),lincRNA-p21 是肿瘤蛋白 53(tumor protein 53,P53)信号通路下游的辅助因子,通过 P53 对下游基因的调控而发挥作用。Wu 等^[35]发现 lincRNA-p21 的表达在 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化斑块中显著下调,同时 CAD 患者的外周血 lincRNA-p21 表达也是降低的。随后的体外细胞功能验证表明 lincRNA-p21 抑制细胞增殖并诱导 VSMC 凋亡。最近发现胸主动脉瘤(thoracic aortic aneurysms,TAA)患者的主动脉组织和血液中 lincRNA-p21 的表达明显增高。Hu 等^[36]进一步指出 lincRNA-p21 过表达后通过上调 TGF- β 1 表达进而调控 VSMC 的增殖和凋亡。Ballantyne 等^[37]对白细胞介素 1 α 和血小板衍生生长因子处理后的人隐静脉血管内皮细胞(human saphenous vein vascular smooth muscle cells,HSVSMC)测序发现了数百种表达差异的 lncRNAs。同时鉴定了其中一种名为平滑肌诱导的增强复制长链非编码 RNA(smooth muscle induced lncRNA,enhancer of proliferation,SMILR)的 lncRNA。在机制上,SMILR 是 VSMC 增殖的驱动因素,同时,在人群中发现,不稳定的动脉粥样硬化斑块中 SMILR 表达增加^[37]。

此外还有母系印记基因 8(maternally expressed 8,MEG8)通过分子海绵 miR-181a-5p 促进过氧化物酶增殖激活受体 α (peroxisome proliferator activated receptor α ,PPAR α)表达调控 VSMC 的增殖和迁移^[38];钙/钙调素依赖性蛋白激酶 2 δ 相关转录本 1(CAMK2D associated transcript 1,C2dat1)通过促进去乙酰化酶 1(sirtuin 1,SIRT1)表达调节 VSMC 增殖和迁移^[39]。心肌素诱导平滑肌细胞增殖分化长链非编码 RNA(myocardin-induced smooth muscle lncRNA,inducer of differentiation,MYOSLID)通过心肌素/血清反应因子(MYOCN/serum response factor,SRF)和转化生长因子- β /SMAD(transforming growth factor- β /SMAD,TGF- β /SMAD)途径促进 VSMC 分化并抑制增殖^[40]。

除了机制研究,在干预治疗方面,李学堂等^[41]观察到黄芩素可抑制人主动脉平滑肌细胞的增殖并促进其凋亡,这一现象可能与 lncRNA 调控成纤维细胞生长因子 18(fibroblast growth factor 18,FGF18)有关^[41]。

上述研究可以确认 lncRNAs 在 VSMC 的异常增殖促使斑块形成中调节作用,但是晚期斑块中的

VSMC 的增殖稳定斑块的作用目前尚不明确。而且遗传谱系追踪研究表明,斑块内的功能细胞大部分来源于 VSMC,而非骨髓来源^[42],同时表型转换后导致缺乏 VSMC 标记,而传统的方法并不能与巨噬细胞等进行分离和鉴定,因此 VSMC 在 As 中的作用长期以来是被低估了^[42]。更为重要的是,VSMC 的增殖可能对整个 As 形成都是有益的,而不仅仅是在晚期病变中^[42]。所以通过表征 VSMC 中与 As 相关的 lncRNAs,不仅仅只是作临床诊断和预后的生物标志物,更重要的是系统归因 VSMC 在 As 中的作用,从而提出新的治疗方法。

目前对 As 的治疗主要集中在药物上,例如调控血脂的他汀类药物以及针对巨噬细胞和其他免疫细胞的抗炎治疗。而 VSMC 作为 As 中重要的功能细胞,如果可以确定促进 VSMC 表型转换的分子机制以及有益表型维持的因素,将可以增加甚至取代这些更为传统的抗动脉粥样硬化方法。当然,随着单细胞 RNA 测序(scRNAseq)的发展,对 VSMC 不同表型的表征将会取得更大的进步。

2.3 lncRNA 和免疫炎症细胞

动脉粥样硬化不仅仅是动脉壁中脂质沉积的病理过程,实际上 As 的发生和发展中炎症影响同样不可小觑^[43]。以检验“炎症假说”为目的的 CANTOS 试验结果显示,促炎细胞因子白细胞介素-1 β 单克隆抗体 canacinumab 治疗后心血管事件发生率显著降低。自此,明确了炎症在 As 中的重要作用^[44]。

炎症导致 As 本质上是免疫应答失衡的结果,涉及到固有免疫应答和适应性免疫反应。目前研究认为固有免疫应答与 As 关系密切,包括免疫应答细胞:单核/巨噬细胞、肥大细胞、自然杀伤细胞、中性粒细胞、树突状细胞等以及模式识别受体:Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)和 NOD 样受体(NOD-like receptors, NLRs)等。但对单核/巨噬细胞的研究最多,机制较为清晰,且单核/巨噬细胞在 As 的发展中有基础性的作用。多态性和可调节性是巨噬细胞的重要特征。M1 型巨噬细胞(又称为经典活化的巨噬细胞)主要起“促炎、抗感染”作用,而 M2 型巨噬细胞(或替代型巨噬细胞)主要起“促修复”作用,巨噬细胞极化和可转换表型主要是以微环境改变而做出的适应性反应。目前,在对人源巨噬细胞转录组的深度测序证实了巨噬细胞 lncRNA 能够响应刺激,巨噬细胞暴露于不同活化条件下的 lncRNA 和 mRNA 表达谱发生显著改变^[45]。因此巨噬细胞动态调节对 As 的驱动和炎症信号传导也受到

lncRNA 的调节^[46]。巨噬细胞表型的复杂性使其功能也具有多样性^[47];包括浸润血管内皮下层、吞噬周围脂质转变为泡沫细胞、诱发炎症反应、溶解细胞外基质导致斑块破裂等。了解巨噬细胞表型异质性的机制将有助于确定它们在病变发展和斑块稳定性中的潜在作用。所以通过 lncRNA 的谱系追踪可以为病变内巨噬细胞的复杂表型提供线索。在这里主要对巨噬细胞的 lncRNA 调节予以叙述。

生长阻滞特异性转录因子 5 (growth arrest-special transcript 5, GAS5) 是一种与炎症密切相关的 lncRNA。Sun 等^[48] 最先将 GAS5 鉴定为小胶质细胞极化的表观遗传调节因子,并指出 GAS5 通过募集多梳抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 抑制拓扑异构酶相关功能蛋白 4 (topoisomerase-related function protein 4, TRF40) 的转录,进而影响 M2 巨噬细胞极化^[48];此外在肺部感染性疾病中,GAS5 可通过作为 miR-455-5p 的竞争性内源性 RNA 促进 M1 巨噬细胞极化。最新研究发现 GAS5 在动脉粥样硬化小鼠模型以及人动脉粥样斑块中显著增高^[49-50],Ye 等^[49] 则证实 GAS5 在动脉粥样硬化斑块和暴露于 ox-LDL 的 THP-1 巨噬细胞中富集表达,进一步功能验证发现,过表达 GAS5 加重了 ox-LDL 诱导的巨噬细胞促炎症表型活化,伴随着促炎细胞因子:白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和单核细胞趋化因子 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的分泌^[49]。此外,GAS5 升高后 ox-LDL 刺激的巨噬细胞中基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 分泌增加,而这些效应都是直接抑制 miR-221 表达而实现的^[49]。

核因子 IA (nuclear factor IA, NFIA) 是一种在脂肪中高表达的基因,与脂质代谢密切相关^[51]。Hu 等^[52] 对巨噬细胞衍生的泡沫细胞测序发现 NFIA 下调,而核因子 IA 反义转录物长链非编码 RNA RP5-833A20.1 (NFIA antisense RNA 1, NFIA-AS1) 表达上调。在体外实验验证中发现 NFIA-AS1 可诱导 hsa-miR-382-5p 表达来降低 NFIA 表达,在体内过表达 NFIA 则会增加高密度脂蛋白胆固醇循环,降低低密度脂蛋白胆固醇和极低密度脂蛋白胆固醇循环,减少炎症细胞因子(IL-1 β 、IL6、TNF- α) 的循环,增强反向胆固醇转运,促进小鼠动脉粥样硬化斑块的消退^[52]。在调节巨噬细胞胆固醇流出以及胆固醇逆向转运中另一个值得瞩目的 lncRNA 分子是表

达序列 AI427809 (expressed sequence AI427809, MeXis)。肝 X 受体(liver X receptors, LXRs)是一类被甾醇(sterol)激活的核受体,ATP 结合亚族 A1 (ATP binding cassette subfamily A member 1, Abca1) 基因受 LXR 调节并在胆固醇流出方面起到关键作用。Sallam 等^[53]发现巨噬细胞中 MeXis 能够强化受 LXR 调控的 Abca1 基因转录,伴随着巨噬细胞的胆固醇流出增加以及 As 进程的阻遏。

Carpenter 等^[54]用 TLR2 配体刺激巨噬细胞后进行全转录组分析,其中前列腺素-内过氧化物合成酶 2 互补链编码产物 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, opposite strand 2, lincRNA-Cox2) 表达量最高,lincRNA-Cox2 通过与各种调节复合物的相互作用而充当阻滞剂或激活剂调节固有免疫^[54]。在神经系统,lincRNA-Cox2 可调节炎性小体(NACHT、LRR and PYD domains-containing protein 3, NLRP3) 和自噬介导的神经炎症^[55],通过对白介素 12b (interleukin 12B, IL-12B) 的转录调节影响肠道炎症^[56]。lincRNA-Cox2 发现之后,Li 等^[57]注释了一种 TNF α 和核不均一核糖核蛋白 L (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, HNRNPL) 相关的免疫调节长链非编码 RNA (TNF and HNRNPL related immunoregulatory long non-coding RNA, THRIL)。同时表明 THRIL 表达下降与川崎病急性期之间存在正相关^[57]。鉴于 TNF α 是炎症中重要的介质,THRIL 通过调节 TNF α 表明它也可能导致其他常见炎症性疾病也存在相关性可能^[57]。

Wang 等^[58]在树突细胞 (dendritic cells, DC) 中鉴定了一种特异性表达的树突状细胞分化长链非编码 RNA (linc-dendritic cell lincRNA, linc-DC)。在体外和体内实验中验证发现敲低 linc-DC 后 DC 分化受抑,并降低 DC 刺激 T 细胞活化的能力^[58]。介导这些作用是 linc-DC 通过直接结合信号转导和转录激活因子 3 (Signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 实现的^[58]。

除了免疫细胞,同时还有大量 lincRNAs 通过模式识别受体响应调节,比如心肌梗死相关转录本 2 (myocardial infarction associated transcript 2, Mirt2) 通过 TLRs 抑制 NF- κ B 和 MAPK 通路的激活并限制促炎细胞因子的产生,防止炎症的异常激活^[59]。

实际上还有大量 lincRNAs 已经报道在体内调节炎症信号,目前它们对 As 的作用尚未验证,因此将他们用于 As 病变发展的功能验证应该是可行的。而且目前主要集中在固有免疫的研究,有研究指出

适应性免疫在 As 中的作用同样值得重视^[43]。而且上述的研究大多数都是从细胞以及动物模型进行的测序,在今后的研究中需要更侧重于直接描述 lincRNAs 在疾病患者和匹配对照受试者的人类病变和免疫细胞亚群中的作用。

在干预治疗上,精准靶向病变的治疗手段开发越来越热门,诸如单克隆抗体、基因编辑等等。而在心血管领域,IL-1B 是抗炎治疗的关键目标,而且 Canakinumab 抗炎治疗降低了心血管疾病风险,其价值得到了肯定。而上述的 lincRNAs 也显示出有效调节 IL-1B 的作用,因此 lincRNA 的有可能是一种更为有效的干预方法。此外,因为免疫系统对生存至关重要,很多免疫治疗,如 NLRP3 特效抑制剂 MCC950,其安全性需要进一步评估,而丰富的 lincRNAs 转录介质,其广泛参与表观修饰以及转录前后的调节,可能对 MCC950 的作用机制进一步阐释同时有助于效益评价。

3 lincRNAs 与动脉粥样硬化的危险因素

动脉粥样硬化发展存在着多种危险因素,包括血脂异常,高血压和糖尿病等^[1],这些危险因素不同程度地影响疾病进展。通过大量的流行病学研究,我们已经知道改善生活方式对降低心血管风险是有效的^[1],同时药物干预也是作为减少心血管事件发生风险的基石,临床上血管紧张素转换酶抑制剂以及 β 受体阻滞剂的长期临床获益充分证明了这一观点。同时,前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin9 型 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 的降脂治疗,是深入解析基因变异与疾病表型之间的关系后进行临床转化的最好例证。因此研究上述危险因素相关的 lincRNAs 是非常有价值的。

3.1 高脂血症

低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 与 As 的发生直接相关,随着脂质的异常聚集从而始动 As。虽然脂质代谢在 As 发展中起到重要的作用,但是相关的 lincRNAs 研究目前比较少。

肝脏特异性甘油三酯调节剂 (liver-specific triglyceride regulator, lincLSTR) 最早由 Li 等^[60]在肝脏中鉴定。观察到 lincLSTR 敲除后小鼠血浆甘油三酯水平的显著降低伴随着载脂蛋白 C2 (apolipoprotein C2, apoC2) 强化表达^[60]。进一步机制研究证明 lincLSTR 与 TAR 结合蛋白 (TAR DNA binding protein,

TDP-43)形成分子复合物以调节细胞色素 P450 家族 8B1 (cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1, Cyp8b1) 表达, Cyp8b1 进而通过法尼酯衍生物 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 诱导 apoC2 表达从而调节甘油三酯的代谢^[60]。

癌症/睾丸相关转录物 70 (cancer/testis associated transcript 70, CT70, Lexis) 主要调节肝脏和血浆中的胆固醇水平^[61]。Lexis 可被 LXR 激活, 同时与 ALY 异质核糖核蛋白 (RALY heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, Raly) 作用, 减少胆固醇的从头合成^[61], 而且针对 Lexis 的基因治疗显示可减轻家族性高胆固醇血症动物模型中 As 的严重程度^[62]。虽然目前已经确定了人类 Lexis 转录本, 但 Lexis 在人类疾病中的相关性尚不清楚^[62]。

肝细胞癌上调长链非编码 RNA (hepatocellular carcinoma up-regulated long non-coding RNA, HULC) 参与脂肪酸代谢^[63]。在肝细胞癌中, HULC 与长链脂肪 CoA 合成酶 (long chain fatty acid CoA ligase 1, ACSL1) 表达呈正相关^[63]。HULC 通过转录因子核受体过氧化物酶体增殖物激活受体 α (nuclear receptorsperoxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR α) 以及视黄醇受体 (retinoid X receptor alpha, RXRA) 形成反馈环调节脂肪酸代谢^[63]。

脂质代谢中, 还涉及到载脂蛋白的转运, Cui 等^[63]鉴定了多种脂肪肝相关的 lncRNAs, 并指出载脂蛋白 A4 反义转录 RNA (apolipoprotein A4 antisense, APOA4-AS) 协调载脂蛋白 A4 (apolipoprotein A4, APOA4) 转录, 并且在胚胎致死异常视觉样 RNA 结合蛋白 1 (embryonic lethal abnormal vision like RNA binding protein 1, HuR) 的参与下, 在体外和体内一致且特异性地调节 APOA4 表达^[64]。载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, APOA1) 是血浆中高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的主要蛋白质成分。其反义长非编码转录物 (apolipoprotein A1 antisense, APOA1-AS) 在体外和体内均充当 APOA1 的负转录调节因子^[65]。

上述这些研究表明, lncRNAs 在体外和体内脂质代谢中发挥着作用。然而, 这些观察到的现象都是动物模型, 鉴于 lncRNAs 保守性并不高, 功能上的保守尚值得探讨。此外, lncRNAs 的功能与其组织特异性和亚细胞定位有关, 而上述研究大多是定位于肝细胞, 因此能否在血液或其他可接近的细胞区室中检测到这些 lncRNAs 也是一个问题。

他汀类药物以及 PCSK9 的临床获益, 充分验证

了“脂质假说”, 也表明了基因在疾病表型中作为潜在治疗靶点的光明前景, 但要明确上述这些参与脂质代谢调节的 lncRNAs 是否与人类疾病相关以及潜在的诊断和治疗应用价值仍然需要长时间的探索。

3.2 高血压

高血压以动脉血压持续升高为主要特征, 是 As 的重要危险因素。目前认为高血压的形成与复杂的神经内分泌调节密切相关, 尤其是肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)。同时, EC、VSMC、炎症、水盐代谢等也都参与高血压的发生和发展。

通过 GWAS 分析, 发现 ANRIL 的多态性与高血压患者的收缩压水平相关^[66], 这表明 lncRNAs 与高血压的相关性。Leung 等^[67]最先对 VSMC 响应血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 的转录组进行报道, 发现经 Ang II 干预后的 VSMC 中 lncRNAs 存在差异表达, 并对非编码 miR222/221 宿主基因 (miR222/221 cluster host gene, MIR222HG, lnc-Ang362) 进行了验证, 指出其通过产生 2 种 microRNA (miR-221 和 miR-222) 参与调节 VSMC 增殖, 具体表现为, lnc-Ang362 的缺失导致 VSMC 的增殖减少^[67]。这表明 lncRNAs 不仅与疾病存在相关性, 而且在驱动高血压发展的分子机制中发挥重要作用。新近又验证了生长因子和促炎性细胞因子诱导的血管细胞表达的长链非编码 RNA (growth factor and pro-inflammatory cytokine-induced vascular cell expressed lncRNA, lnc-Ang164, Giver)。Ang II 通过将核受体亚家族 4a3 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 3, Nr4a3) 募集至 Giver 启动子而增加 Giver 表达, 进而加重 VSMC 的氧化应激以及炎症损伤^[31]。同时还发现人源 Giver 和 NR4A3 在用 Ang II 处理的人 VSMC 和高血压患者中上调, 并且在使用 RAS 抑制剂治疗的高血压患者中降低, 这表明 Giver 可能成为抗高血压治疗的新靶点^[31]。

此外还有报道 GAS5^[48]、MYOSLID^[40]、MANTIS^[25] 和 MALAT1^[13] 等参与调节高血压相关血管细胞功能以及血管重塑。虽然上述例证可以确定 lncRNAs 对高血压发病的调节作用, 但目前的研究是局限的, 除了 RAAS 以外, 对于交感-肾上腺素能神经系统、脑啡肽-脑啡肽酶等相关的研究是匮乏的, 而对于已知的 lncRNA, 比如 ANRIL, 影响包括高血压在内的众多心血管疾病, 但确切作用仍然知之甚少, 此外, 目前的研究局限于机制的探索, 而少有通过调查分析 lncRNAs 对人体全身血压的影响, 基于不同人群不同疾病表型的血压达标标准是不同的,

探究 lncRNAs 与全身血压调节关系对疾病的预防和控制意义重大。

3.3 高血糖

Morán 等^[68]最先报告了人类胰岛 β 细胞的全面转录组图谱,并发现超过 1 000 个 lncRNAs 响应胰岛的动态调节。在小鼠体内敲除 β 细胞特异性表达基因间长链非编码 RNA1370 (long intergenic non-protein coding RNA 1370, HI-LNC25)后, GLIS 家族锌指 3 (GLIS family zinc finger 3, GLIS3) 表达下调,因此例证了胰岛 lncRNA 的基因调节在 β 细胞分化和成熟程序中的重要作用^[68]。之后,转录测序发现的 β 细胞基因间长链非编码 RNA 1 (β-cell long intergenic noncoding RNA 1, βlinc1) 也被验证通过促进胰岛特异性转录因子胰十二指肠同源框 (pancreatic and duodenal homeobox 1, Pdx1) 和神经元分化因子 1 (neuronal differentiation 1, NeuroD1) 的转录来调节胰岛 β 细胞的形成以及胰岛素分泌合成^[69]。

最近, Sathishkumar 等^[70]对糖尿病病人外周血液测序发现存在 13 个 lncRNAs 表达水平显著增加。其中包括现同源盒反义转录 RNA (HOX transcript antisense RNA, HOTAIR)、MEG3、MALAT1、CDKN2BAS1/ANRIL、GAS5、LincRNA-p21、基因间长链非编码 RNA 2402 (long intergenic non-protein coding RNA 2402, LINC02402, ENST00000550337. 1) 以及胰十二指肠同源框上调转录相关长链非编码 RNA (pancreatic and duodenal homeobox 1 associated lncRNA, upregulator of transcription, PLUTO) 等等。其中, PLUTO 能够调节 PDX1 的转录,进而影响关键性 β 细胞转录因子的编码^[71],而且 PLUTO 和 PDX1 在 2 型糖尿病或葡萄糖耐受受损的胰岛供体中都是下调的^[71]。而 GAS5 与 2 型糖尿病风险强烈相关^[72]。

除了 2 型糖尿病, 1 型糖尿病与 lncRNAs 同样密切相关。叉头样转录因子 3 (forkhead box P3, Foxp3) 调节基因间长链非编码 RNA (FOXP3 regulating long intergenic non-coding RNA, FLICR) 是很好的例证。FLICR 是人和小鼠调节性 T 细胞中的顺式非编码 RNA, 通过修饰染色质可负向调节 Foxp3, 从而导致自身免疫性糖尿病^[71]。

总之, 这些列举的例证表明 lncRNAs 在糖尿病发展中起着重要作用, 包括调节胰岛细胞功能以及血糖的代谢。但是糖尿病领域的 lncRNAs 研究是不足的, 虽然有许多测序鉴定的 lncRNAs, 但较少与糖

尿病进行相关性进行分析, 评价诊断预后价值; 少数虽有报道通过表观修饰参与疾病发生的过程, 总体来说对这些 lncRNA 的病理生理学机制缺乏进一步了解。

4 结 语

As 在各种危险因素的作用下, 因脂质沉积伴随着血管稳态失衡和炎症级联反应而发生发展, 如上所述, 已经将 lncRNAs 鉴定为与 As 血管稳态以及相关危险因素的关键调节介质, 通过 GWAS 分析, 某些 lncRNAs 表现出与疾病的密切相关, 因此将它们作为潜在生物标志物和治疗靶标是可行的。但是目前 As 相关的 lncRNAs 研究也有其不足, 很多受限 lncRNAs 自身的特性。

虽然已经在人血浆和动脉粥样硬化样本以及不同的疾病模型中报道了 lncRNA 调节, 但仅有少数 lncRNAs 的功能和作用机制是已知的, 且大多 lncRNAs 保守性低, 因此, 许多鉴定的 lncRNAs 与人类疾病的功能相关性并不确定^[73], 如 Lexis^[61-62], 虽然可以推定人类 Lexis 转录本, 但 Lexis 在人类中的相关性仍得不到确认, 限制了它们在 As 防治中的临床转化价值。

lncRNAs 生物功能和作用机制的特异性取决于组织特异性表达模式。探索其生物发生和作用的背景, 才能准确注释 lncRNAs 的功能, 比如 ANRIL^[9-10], 虽然与心血管疾病关系密切, 但是受限于特定作用背景的探索, 所以目前对其作用机制仍然知之甚少。即便是功能和作用机制已知的少数 lncRNAs, 解读也不能过度外延而只能更为严格而内敛。与此同时, 特异性高, 能够成组对象之间的必然对应关系, 这也是开发生物标记物最希望看到的, 因此对 lncRNAs 进行更严格生发和作用背景的探索以及功能验证的研究是有前景的。As 作为一个慢性多因素分阶段的疾病过程, lncRNAs 的时相表达模式应充分考虑, 比如 VSMC 在早期可能是促 As 发展的, 而晚期斑块内的 VSMC 更多的发挥稳定纤维斑块的作用, 虽然已经明确了 lncRNAs 对 VSMC 的功能调节, 但是否存在时相的差异调节尚不清楚^[35]。

大多数研究尝试通过解析 lncRNAs 如何与其他 ncRNA、DNA 和蛋白质相互作用以确定 As 中的确切功能反应^[74]。诚然, 这对于构建疾病特异性调控网络非常有帮助, 但是相比于 mRNA 而言 lncRNAs 的表达水平很低, 因此实验结果的稳定性和可重复

性是很大的挑战。相信随着微阵列技术和生物信息学方法的敏感性不断增加,低丰度的 lncRNAs 也能被捕获。在 As 研究中,不仅可以从调节基因表达、鉴定 lncRNA 相关的 DNA、RNA 和蛋白质互作对 lncRNAs 功能进行探索^[75],细胞/亚细胞定位的可视化也是非常热门且重要的。

蛋白质编码基因被转运到细胞质并与核糖体结合,而大多数 lncRNAs 保留在细胞核中,因此研究 lncRNAs 的功能和其细胞区室定位有关^[75]。这也是为什么结构相似的转录本却有不同细胞命运,目前对这种现象的分子基础仍然没有得到充分的认知。除了细胞内,还有细胞间的微泡递送系统,比如外泌体内检测到的 lncRNAs,可以作为细胞间信息传递的介质以及诊断干预的靶点^[76]。有研究指出,巨噬细胞来源的外泌体所包裹的 lncRNA 能够靶向恶性肿瘤代谢重编程^[77],但对这种循环性“外来体”的分类以及机制研究在 As 领域是缺乏的,对于细胞核、细胞质和外来体中的不同作用机制,需要进一步研究来定义。

全转录组测序去发现新的 lncRNA 价格十分昂贵,而已经发现的 lncRNAs 缺乏基于序列或结构特征的功能预测,其生物学功能不能直接从 lncRNA 的一级序列预测,而通过生物信息学软件根据已知的同源结构域和 microRNA 基因的功能来预测蛋白质编码功能和结合位点的方法存在不稳定性。使用 RNA 纯化染色质分离(chromatin isolation by RNA purification, ChIRP)、RNA 反义纯化(RNA antisense purification, RAP)和 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)识别 lncRNAs 相互作用因子也存在一定技术上的限制^[78]。

总之,lncRNAs 已被确定为 As 的病理学过程中的关键调节因子,随着越来越多的 lncRNAs 被发现,与 As 以及 ASCVD 的相关性也通过 GWAS 也得到验证,接下来最值得关注的问题是如何将这些 lncRNAs 生物学中的现象观察转化为可行的诊断和治疗的方法。随着技术的进步,以及对不同物种、不同时相以及不同亚细胞定位的不同作用机制更为严格的定义,在 As 的诊断和防治上必将取得巨大的突破。

[参考文献]

[1] Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, et al. 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Associa-

tion task force on clinical practice guidelines [J]. *Circulation*, 2019, 140(11): e596-e646.

- [2] Djebali S, Davis CA, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells[J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 101-108.
- [3] Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression [J]. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1775-1789.
- [4] Laurent GS, Wahlestedt C, Kapranov P. The landscape of long non-coding RNA classification [J]. *Trends Genet*, 2015, 31(5): 239-251.
- [5] Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future[J]. *Genetics*, 2013, 193(3): 651-669.
- [6] Lee JT. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs [J]. *Science*, 2012, 338(6113): 1435-1439.
- [7] Nelson BR, Makarewich CA, Anderson DM, et al. A peptide encoded by a transcript annotated as long noncoding RNA enhances SERCA activity in muscle[J]. *Science*, 2016, 351(6270): 271-275.
- [8] Lo Sardo V, Chubukov P, Ferguson W, et al. Unveiling the role of the most impactful cardiovascular risk locus through haplotype editing[J]. *Cell*, 2018, 175(7): 1796-1810.
- [9] Cho H, Shen GQ, Wang X, et al. Long noncoding RNA ANRIL regulates endothelial cell activities associated with coronary artery disease by up-regulating CLIP1, EZR, and LYVE1 genes [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(11): 3881-3898.
- [10] Holdt LM, Hoffmann S, Sass K, et al. Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(7): e1003588.
- [11] Li L, Wang L, Li H, et al. Characterization of lncRNA expression profile and identification of novel lncRNA biomarkers to diagnose coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 275: 359-367.
- [12] Singh KK, Matkar PN, Pan Y, et al. Endothelial long non-coding RNAs regulated by oxidized LDL [J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 431(1-2): 139-149.
- [13] Michalik KM, You X, Manavski Y, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates endothelial cell function and vessel growth [J]. *Circ Res*, 2014, 114(9): 1389-1397.
- [14] Tang Y, Jin X, Xiang Y, et al. The lncRNA MALAT1 protects the endothelium against ox-LDL-induced dysfunction via upregulating the expression of the miR-22-3p target genes CXCR2 and AKT [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(20 Pt B): 3189-3196.
- [15] Xiang Y, Zhang Y, Tang Y, et al. MALAT1 modulates TGF-beta1-induced endothelial-to-mesenchymal transition through down-regulation of miR-145 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(1): 357-372.
- [16] Li H, Zhao Q, Chang L, et al. LncRNA MALAT1 modulates ox-LDL induced EndMT through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1): 62.
- [17] Boon RA, Hofmann P, Michalik KM, et al. Long noncoding RNA Meg3 controls endothelial cell aging and function: implications for regenerative angiogenesis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(23): 2589-2591.

- [18] He C, Yang W, Yang J, et al. Long noncoding RNA MEG3 negatively regulates proliferation and angiogenesis in vascular endothelial cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(6): 475-481.
- [19] Ruan W, Zhao F, Zhao S, et al. Knockdown of long noncoding RNA MEG3 impairs VEGF-stimulated endothelial sprouting angiogenesis via modulating VEGFR2 expression in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Gene*, 2018, 649: 32-39.
- [20] Young TL, Matsuda T, Cepko CL. The noncoding RNA taurine upregulated gene 1 is required for differentiation of the murine retina[J]. *Curr Bio*, 2005, 15(6): 501-512.
- [21] Lin YH, Wu MH, Huang YH, et al. Taurine up-regulated gene 1 functions as a master regulator to coordinate glycolysis and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2018, 67(1): 188-203.
- [22] 潘洪川, 刘海燕, 张月超, 等. LncRNA TUG1 在冠状动脉粥样硬化性心脏病患者血清中的表达及意义[J]. *岭南心血管病杂志*, 2017, 23(2): 151-154.
- [23] 陈德才, 马从乾, 杨轲. 下调牛磺酸调节基因1减轻氧化低密度脂蛋白诱导的血管内皮细胞氧化损伤[J]. *基础医学与临床*, 2019, 39(4): 509-513.
- [24] Gao X, Zhang T, Zeng XY, et al. Effect of silencing lncRNATUG1 on rapamycin-induced inhibition of endothelial cell proliferation and migration[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(3): 1891-1899.
- [25] Leisegang MS, Fork CI, Richter FM, et al. Long noncoding RNA MANTIS facilitates endothelial angiogenic function[J]. *Circulation*, 2017, 136(1): 65-79.
- [26] Lyu Q, Xu S, Lyu Y, et al. SENCER stabilizes vascular endothelial cell adherens junctions through interaction with CKAP4[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(2): 546-555.
- [27] Pan JX. LncRNA H19 promotes atherosclerosis by regulating MAPK and NF- κ B signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(2): 322-328.
- [28] Hou J, Wang L, Wu Q, et al. Long noncoding RNA H19 upregulates vascular endothelial growth factor A to enhance mesenchymal stem cells survival and angiogenic capacity by inhibiting miR-199a-5p[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 109.
- [29] Gao W, Zhu M, Wang H, et al. Association of polymorphisms in long non-coding RNA H19 with coronary artery disease risk in a Chinese population[J]. *Mutat Res*, 2015, 772: 15-22.
- [30] Wirka RC, Wagh D, Paik DT, et al. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis[J]. *Nat Med*, 2019, 25(8): 1280-1289.
- [31] Das S, Zhang E, Senapati P, et al. A novel angiotensin II-induced long noncoding RNA Giver regulates oxidative stress, inflammation, and proliferation in vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2018, 123(12): 1298-1312.
- [32] Shi L, Tian C, Sun LZ, et al. The lncRNA TUG1/miR-145-5p/FGF10 regulates proliferation and migration in VSMCs of hypertension[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(3): 688-695.
- [33] Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, et al. Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS2-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(42): 28816-28826.
- [34] Bell RD, Long X, Lin M, et al. Identification and initial functional characterization of a human vascular cell-enriched long noncoding RNA[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(6): 1249-1259.
- [35] Wu G, Cai J, Han Y, et al. LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity[J]. *Circulation*, 2014, 130(17): 1452-1465.
- [36] Hu W, Wang Z, Li Q, et al. Upregulation of lincRNA-p21 in thoracic aortic aneurysms is involved in the regulation of proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells by activating TGF- β 1 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 4113-4120.
- [37] Ballantyne MD, Pinel K, Dakin R, et al. Smooth muscle enriched long noncoding RNA (SMILR) regulates cCell proliferation[J]. *Circulation*, 2016, 133(21): 2050-2065.
- [38] Zhang B, Dong Y, Zhao Z. LncRNA MEG8 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration and apoptosis by targeting PPAR α [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 510(1): 171-176.
- [39] Wang H, Jin Z, Pei T, et al. Long noncoding RNAs C2dat1 enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting miR-34a-5p [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3): 3001-3008.
- [40] Zhao J, Zhang W, Lin M, et al. MYOSLID is a novel serum response factor-dependent long noncoding RNA that amplifies the vascular smooth muscle differentiation program [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(10): 2088-2099.
- [41] 李学堂, 隋玉玲. 黄芩素抑制血管平滑肌细胞增殖作用及其机制研究[J]. *世界临床药物*, 2017, 38(09): 601-607.
- [42] Basatemur GL, Jørgensen HF, Clarke MCH, et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Nat Rev Cardio*, 2019, 16(12): 727-744.
- [43] Ridker PM, Luscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease[J]. *Eur Heart J*, 2014, 35(27): 1782-1791.
- [44] Ridker PM, MacFadyen JG, Everett BM, et al. Relationship of C-reactive protein reduction to cardiovascular event reduction following treatment with canakinumab: a secondary analysis from the CANTOS randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2018, 391(10118): 319-328.
- [45] Huang Z, Luo Q, Yao F, et al. Identification of differentially expressed long non-coding RNAs in polarized macrophages[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19705.
- [46] Zhang H, Xue C, Wang Y, et al. Deep RNA sequencing uncovers a repertoire of human macrophage long intergenic noncoding RNAs modulated by macrophage activation and associated with cardiometabolic diseases[J]. *J Am Heart Assoc*, 2017, 6(11): e007431.
- [47] Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis[J]. *Immunol Rev*, 2014, 262(1): 153-166.
- [48] Sun D, Yu Z, Fang X, et al. LncRNA GAS5 inhibits microglial M2 polarization and exacerbates demyelination[J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(10): 1801-1816.

- [49] Ye J, Wang C, Wang D, et al. LncRBA GSA5, up-regulated by ox-LDL, aggravates inflammatory response and MMP expression in THP-1 macrophages by acting like a sponge for miR-221[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 369(2): 348-355.
- [50] Chen L, Yang W, Guo Y, et al. Exosomal lncRNA GASS regulates the apoptosis of macrophages and vascular endothelial cells in atherosclerosis[J]. *PloS one*, 2017, 12(9): e0185406.
- [51] Shapira SN, Seale P. Enhancing brown fat with NFIA[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(9): 1006-1007.
- [52] Hu YW, Zhao JY, Li SF, et al. RP5-833A20. 1/miR-382-5p/NFIA-dependent signal transduction pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory reaction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 87-101.
- [53] Sallam T, Jones M, Thomas BJ, et al. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA[J]. *Nat Med*, 2018, 24(3): 304-312.
- [54] Carpenter S, Aiello D, Atianand MK, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. *Science*, 2013, 341(6147): 789-792.
- [55] Xue Z, Zhang Z, Liu H, et al. lincRNA-Cox2 regulates NLRP3 inflammasome and autophagy mediated neuroinflammation [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(1): 130-145.
- [56] Tong Q, Gong AY, Zhang XT, et al. LincRNA-Cox2 modulates TNF- α -induced transcription of *Il12b* gene in intestinal epithelial cells through regulation of Mi-2/NuRD-mediated epigenetic histone modifications[J]. *FASEB J*, 2016, 30(3): 1187-1197.
- [57] Li Z, Chao TC, Chang KY, et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNF α expression through its interaction with hnRNPL[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(3): 1002-1007.
- [58] Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation[J]. *Science*, 2014, 344(6181): 310-313.
- [59] Du M, Yuan L, Tan X, et al. The LPS-inducible lncRNA *Mirt2* is a negative regulator of inflammation[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 2049.
- [60] Li P, Ruan W, Yang L, et al. A liver-enriched long non-coding RNA, lncLSTR, regulates systemic lipid metabolism in mice[J]. *Cell Metab*, 2015, 21(3): 455-467.
- [61] Sallam T, Jones MC, Gilliland T, et al. Feedback modulation of cholesterol metabolism by the lipid-responsive non-coding RNA *LeXis*[J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 124-128.
- [62] Tontonoz P, Wu XH, Jones M, et al. Long noncoding RNA facilitated gene therapy reduces atherosclerosis in a murine model of familial hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2017, 136(8): 776-778.
- [63] Cui M, Xiao Z, Wang Y, et al. Long noncoding RNA HULC modulates abnormal lipid metabolism in hepatoma cells through an miR-9-mediated RXRA signaling pathway[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(5): 846-857.
- [64] Qin W, Li X, Xie L, et al. A long non-coding RNA, APOA4-AS, regulates APOA4 expression depending on HuR in mice[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(13): 6423-6433.
- [65] Halley P, Kadakkuzha BM, Faghihi MA, et al. Regulation of the apolipoprotein gene cluster by a long noncoding RNA [J]. *Cell Rep*, 2014, 6(1): 222-230.
- [66] Bayoglu B, Yuksel H, Cakmak HA, et al. Polymorphisms in the long non-coding RNA *CDKN2B-AS1* may contribute to higher systolic blood pressure levels in hypertensive patients[J]. *Clin Biochem*, 2016, 49(10-11): 821-827.
- [67] Leung A, Trac C, Jin W, et al. Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2013, 113(3): 266-278.
- [68] Morún I, Akerman I, van de Bunt M, et al. Human β cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes [J]. *Cell Metab*, 2012, 16(4): 435-448.
- [69] Arnes L, Akerman I, Balderes DA, et al. *β linc1* encodes a long noncoding RNA that regulates islet β -cell formation and function [J]. *Genes Dev*, 2016, 30(5): 502-507.
- [70] Sathishkumar C, Prabu P, Mohan V, et al. Linking a role of lncRNAs (long non-coding RNAs) with insulin resistance, accelerated senescence, and inflammation in patients with type 2 diabetes [J]. *Hum Genomics*, 2018, 12(1): 41.
- [71] Akerman I, Tu Z, Beucher A, et al. Human pancreatic β cell lncRNAs control cell-specific regulatory networks [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(2): 400-411.
- [72] Carter G, Miladinovic B, Patel AA, et al. Circulating long non-coding RNA *GAS5* levels are correlated to prevalence of type 2 diabetes mellitus[J]. *BBA Clin*, 2015, 4: 102-107.
- [73] Bao Z, Yang Z, Huang Z, et al. LncRNA *Disease 2.0*: an updated database of long non-coding RNA-associated diseases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1034-D1037.
- [74] 王鹏宇, 田江天, 冯玉宽, 等. miRNA 在胆固醇逆向转运中的作用研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(10): 1052-1056.
- [75] Yao RW, Wang Y, Chen LL. Cellular functions of long noncoding RNAs[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(5): 542-551.
- [76] Chang W, Wang J. Exosomes and their noncoding RNA cargo are emerging as new modulators for diabetes mellitus [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 853.
- [77] Chen F, Chen J, Yang L, et al. Extracellular vesicle-packaged HIF-1 α -stabilizing lncRNA from tumour-associated macrophages regulates aerobic glycolysis of breast cancer cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(4): 498-510.
- [78] Haemmig S, Feinberg MW. Targeting lncRNAs in cardiovascular disease: options and expeditions [J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 620-623.

(此文编辑 朱雯霞)