

[文章编号] 1000-4718(2019)06-1004-06

lncRNA-MIAT 在高糖诱导血管平滑肌 细胞活力增加中的作用*

王 峥[△], 胡 芳, 孙 莹, 陈杨丽

(中山大学附属第五医院内分泌与代谢病科, 广东 珠海 519000)

[摘 要] 目的: 探讨长链非编码 RNA 心肌梗死相关转录本(lncRNA-MIAT)在高糖引起血管平滑肌细胞(VSMC)活力异常中的作用和机制。方法: 体外分离并培养大鼠主动脉 VSMC 分别进行非高糖培养和高糖培养; 通过转染 pcDNA3.1-MIAT 真核表达质粒和 MIAT-siRNA 分别实现细胞内 lncRNA-MIAT 的过表达和沉默; 通过转染微小 RNA-145(microRNA-145)的模拟序列和抑制序列分别实现细胞内 microRNA-145 的过表达和沉默。CellTiter-Blue 实验分析各种转染处理后细胞活力的变化; RT-qPCR 检测各组处理后细胞中 lncRNA-MIAT 及 microRNA-145 的水平; 双萤光素酶报告基因实验确认 lncRNA-MIAT 与 microRNA-145 之间的靶向结合关系。结果: 与非高糖培养相比, 高糖培养可以上调 VSMC 中 lncRNA-MIAT 的表达, 同时下调 microRNA-145 的表达 ($P < 0.01$)。lncRNA-MIAT 过表达可增加非高糖培养 VSMC 的活力 ($P < 0.01$), lncRNA-MIAT 沉默会逆转高糖培养诱导的 VSMC 活力异常 ($P < 0.01$), 但 lncRNA-MIAT 对 VSMC 活力的调控依赖于 microRNA-145 的水平。过表达或沉默 lncRNA-MIAT 均会改变 microRNA-145 的水平 ($P < 0.05$)。双萤光素酶报告基因实验提示 lncRNA-MIAT 与 microRNA-145 之间存在互补结合的区域。结论: lncRNA-MIAT 可能通过抑制 microRNA-145 参与高糖引起的血管平滑肌细胞活力异常。

[关键词] 糖尿病; 血管平滑肌细胞; 长链非编码 RNA; 心肌梗死相关转录本; 微小 RNA-145; 细胞活力

[中图分类号] R587.1; R363.2 [文献标志码] A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.007

Role of lncRNA-MIAT in high glucose-induced viability enhancement in vascular smooth muscle cells

WANG Zheng, HU Fang, SUN Ying, CHEN Yang-li

(Department of Endocrinology and Metabolism, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China. E-mail: dr.zhengwang_gz@gmail.com)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the effect of long non-coding RNA myocardial infarction associated transcript (lncRNA-MIAT) on high glucose-induced enhancement of vascular smooth muscle cell (VSMC) viability. METHODS: The VSMC collected from rats was cultured in medium with glucose at a normal concentration or high concentration. For over-expression and knock-down of lncRNA-MIAT expression, pcDNA3.1-MIAT and MIAT-siRNA were transfected into the VSMC, respectively. For over-expression and knock-down of microRNA-145 expression, microRNA-145 mimic and microRNA-145 inhibitor were transfected into the VSMC, respectively. The viability of the VSMC after treatments was measured by CellTiter-Blue assay. The levels of lncRNA-MIAT and microRNA-145 in the VSMC were detected by RT-qPCR. The targeting relationship between lncRNA-MIAT and microRNA-145 was confirmed by dual-luciferase reporter assay. RESULTS: Compared with normal glucose, high glucose resulted in higher level of lncRNA-MIAT but reduced the level of microRNA-145 ($P < 0.01$). lncRNA-MIAT over-expression promoted the viability of VSMC under normal glucose ($P < 0.01$). Knock-down of lncRNA-MIAT expression inhibited the viability of VSMC induced by high glucose ($P < 0.01$), but this effect was dependent on the level of microRNA-145. Both over-expression and knock-down of lncRNA-MIAT expression changed the level of microRNA-145 ($P < 0.05$). The results of dual-luciferase reporter assay showed that lncRNA-MIAT bound to microRNA-145 directly. CONCLUSION: lncRNA-MIAT promotes high glucose-induced abnormal viability of

[收稿日期] 2018-07-06 [修回日期] 2018-11-23

* [基金项目] 广东省医学科研基金资助项目 (No. A2018142)

△通讯作者 Tel: 0756-2528741; E-mail: dr.zhengwang_gz@gmail.com

vascular smooth muscle cells by inhibiting microRNA-145.

[KEY WORDS] Diabetes mellitus; Vascular smooth muscle cells; Long non-coding RNA; Myocardial infarction associated transcript; MicroRNA-145; Cell viability

大血管病变是糖尿病患者常见的并发症,也是引起患者死亡和致残的主要因素之一^[1]。糖尿病引起的大血管病变是一个复杂的病理生理学过程,其中各种损伤因素造成的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)过度增殖是血管粥样硬化形成、血管壁增厚、管腔狭窄、血管顺应性降低及血管重构的重要环节^[2]。虽然已经明确高血糖是引起 VSMC 过度增殖的因素之一,但其具体的分子生物学机制还有待进一步研究。近期研究显示,长链非编码 RNA 心肌梗死相关转录本(long non-coding RNA myocardial infarction associated transcript, lncRNA-MIAT)在糖尿病引起的血管病变中扮演重要角色,参与调控血管内皮细胞的功能^[3]。但 lncRNA-MIAT 是否在高糖引起的 VSMC 细胞活力异常中发挥调控作用还未见报道。另一方面,本研究通过生物信息学预测发现微小 RNA-145(microRNA-145, miR-145)可能受 lncRNA-MIAT 的调控,而 microRNA-145 被证明是调控 VSMC 活力及增殖的重要分子^[4]。因此本研究假设 lncRNA-MIAT 可以通过调控 microRNA-145 参与高糖引起的 VSMC 活力异常,并设计体外实验加以验证,现报道如下。

材 料 和 方 法

1 主要试剂

清洁级 SD 大鼠(雌雄不限,体质量 200 g 左右),由中山大学实验动物中心提供,动物合格证号为 SCXK(粤)2016-0029。DMEM 培养基、胎牛血清、Lipofectamine 2000 试剂盒、Lipofectamine RNAiMAX、TRIzol 试剂和 TaqMan™ Advanced miRNA cDNA 合成试剂盒均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SYBR® Premix Ex Taq™ 购自宝生物工程(大连)有限公司;pcDNA3.1-MIAT 真核表达质粒、microRNA-145 模拟序列(miR-145 mimic)、microRNA-145 抑制序列(miR-145 inhibitor)及无关序列均购自广州锐博生物;CellTiter-Blue 试剂盒和双荧光素酶报告基因质粒及双荧光素酶报告基因检测系统购自上海普洛麦格生物产品有限公司;microRNA-145 和 U6 的引物购自 QIAGEN。

2 方法

2.1 大鼠主动脉 VSMC 的分离及培养 大鼠经腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠进行麻醉,无菌条件下

剪开腹腔和胸腔,取出主动脉,体视显微镜下分离取出血管中膜组织,充分剪碎获取的中膜组织。将剪碎的组织置入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中竖直放置 5 h,待组织黏附后,平放细胞培养瓶,继续培养。每 3 d 换液 1 次,当组织块周围细胞融合达到 80% 左右时常规传代,取 2 代后的细胞进行鉴定,确认为血管平滑肌细胞后进行后续实验操作。非高糖处理的细胞进行常规培养(培养基葡萄糖浓度为 5 mmol/L),需进行高糖处理的细胞培养于葡萄糖浓度为 25 mmol/L 的培养基中。

2.2 细胞的体外转染 通过向 VSMC 转染 pcDNA3.1-MIAT 真核表达质粒和 MIAT 小干扰 RNA(MIAT small interfering RNA, MIAT-siRNA)分别实现细胞内 lncRNA-MIAT 的过表达和沉默。通过向 VSMC 转染 miR-145 mimic 和 miR-145 inhibitor 分别实现细胞内 microRNA-145 的过表达和沉默。质粒的转染采用 Lipofectamine® 2000 试剂进行,同时使用 pcDNA3.1 空质粒作为转染对照。MIAT-siRNA、microRNA 模拟序列及抑制序列的转染采用 Lipofectamine® RNAiMAX 试剂。使用转染无关序列的细胞作为转染对照。

2.3 细胞分组 根据是否进行高糖刺激及转染处理的不同,将细胞分为非高糖培养(non-high glucose)组和高糖培养(high glucose)组;非高糖培养组再分为 3 个亚组,包括阴性转染对照(negative transfection control)亚组、转染 pcDNA3.1-MIAT 亚组及 pcDNA3.1-MIAT + miR-145 mimic 共转染亚组;高糖培养组也分为 3 个亚组,包括阴性转染对照亚组、转染 MIAT-siRNA 亚组及 MIAT-siRNA + miR-145 inhibitor 共转染亚组。

2.4 RT-qPCR 实验 使用 TRIzol 试剂提取各组细胞样本中的总 RNA。mRNA 的反转录采用 Prime-Script™ RT 试剂盒。反转录结束后,对 cDNA 的进行定量扩增,试剂盒选用 SYBR® Premix Ex Taq™,标准化采用 GAPDH。MicroRNA 的反转录采用 Taq-Man™ Advanced miRNA cDNA 合成试剂盒,反转录结束后使用 miScript SYBR Green PCR 试剂盒对 cDNA 进行荧光定量扩增,标准化采用 U6。获取循环阈值(cycle threshold, Ct)之后采用 2^{-ΔΔCt} 法进行计算目的基因的相对水平。lncRNA-MIAT 的上游引物序列为

5'-ATCCTCGAGACAAAGAGCCCTCTGCACTAG-3', 下游引物序列为 5'-ATCGGATCCGAGCAAATG-GAGACAAAGGAC-3'; GAPDH 的上游引物序列为 5'-CATGTTTCGTCATGGGGTGAACCA-3', 下游引物序列为 5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'。MicroRNA-145 及 U6 均采用商品化的 miScript 引物。

2.5 细胞活力实验 将各组细胞以每孔 5 000 个的密度种植于 96 孔板,于种植后 24 h 及 72 h 分别使用 CellTiter-Blue 试剂盒测定各组细胞 573 nm 波长处的吸光度(A)值,并根据公式计算 72 h 时点相对于 24 h 时点的细胞活力相对变化。细胞相对活力 (%) = 72 h A 值/24 h A 值 × 100%。

2.6 生物信息学分析及双萤光素酶报告基因实验

使用 miRcode lncRNA-microRNA 互作预测系统预测 lncRNA-MIAT 与 microRNA-145 的结合能力,寻找两者可能互补结合的区域。为验证生物信息学分析的结果,采用双萤光素酶报告基因实验确认 lncRNA-MIAT 与 microRNA-145 的结合能力:首先构建不含任何突变的野生型 lncRNA-MIAT 萤光素酶报告基因质粒,命名为 pmirGro-MIAT-WT;同时对 lncRNA-MIAT 中上述生物信息学预测到的结合区域进行突变,构建突变型 lncRNA-MIAT 萤光素酶报告基因质粒,命名为 pmirGro-MIAT-MUT,使用 microRNA-145 mimic(同时使用无关序列作为阴性对照)与上述 2 种萤光素酶报告基因质粒共转染 VSMC,随后采用双萤光素酶报告基因检测系统测定转染后细胞的相对萤光素酶活性。

3 统计学分析

统计学分析采用 R 语言,所有数据以均数 ± 标准差(mean ± SD)的形式表示。两组间的均数差异比较采用独立样本 t 检验;多组间均数差异的比较采用单因素方差分析,随后采用 Bonferroni 校正的 t 检验进行两两比较。以 P < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

1 高糖刺激引起大鼠 VSMC 中 lncRNA-MIAT 的增高及 microRNA-145 水平的降低

非高糖培养组细胞 lncRNA-MIAT 的相对水平为 1.00 ± 0.02,高糖培养组的 lncRNA-MIAT 相对水平为 2.26 ± 0.15,较非高糖培养组显著升高 (P < 0.01)。非高糖培养组细胞 microRNA-145 的相对水平为 1.00 ± 0.05,高糖培养组的 microRNA-145 相对水平为 0.61 ± 0.09,较非高糖培养组显著降低 (P < 0.01),见图 1。该结果提示高糖刺激可以引起

lncRNA-MIAT 水平的升高,但是会抑制 microRNA-145 的表达。

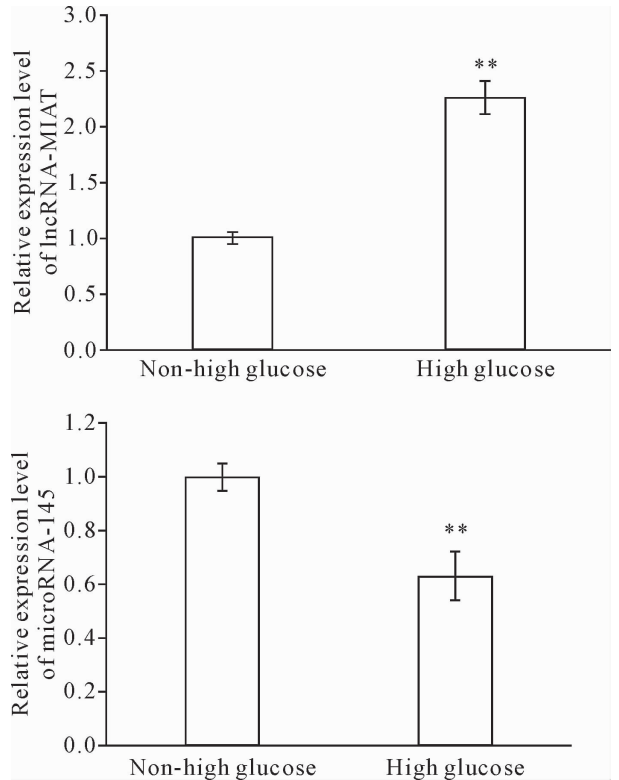


Figure 1. The changes of lncRNA-MIAT and microRNA-145 levels in the VSMC cultured in non-high glucose and high glucose media. Mean ± SD. n = 5. ** P < 0.01 vs non-high glucose group.

图 1 非高糖培养及高糖培养后的血管平滑肌细胞 lncRNA-MIAT 和 microRNA-145 水平的变化

2 lncRNA-MIAT 通过调控 microRNA-145 促进大鼠 VSMC 活力

对于非高糖培养的 VSMC,与阴性转染对照亚组相比,转染 pcDNA3.1-MIAT 亚组 72 h 的细胞相对活力显著升高 (P < 0.01)。对于高糖培养的 VSMC,与阴性转染对照亚组相比,转染 MIAT-siRNA 亚组 72 h 的细胞相对活力显著降低 (P < 0.01)。高糖培养组的阴性转染对照亚组的细胞相对活力显著高于非高糖培养组的阴性转染对照亚组 (P < 0.01)。更为重要的是,在非高糖培养组中,pcDNA3.1-MIAT + miR-145 mimic 共转染亚组的细胞相对活力显著低于转染 pcDNA3.1-MIAT 亚组 (P < 0.01);在高糖培养组,MIAT-siRNA + miR-145 inhibitor 共转染亚组的细胞相对活力显著高于转染 MIAT-siRNA 亚组 (P < 0.01),见图 2、3。上述结果提示高糖处理可诱导 VSMC 活力,lncRNA-MIAT 具有促进 VSMC 活力的作用,而 microRNA-145 具有抑制 VSMC 活力的作用,lncRNA-MIAT 对 VSMC 活力的调控依赖于 micro-

RNA-145的水平。

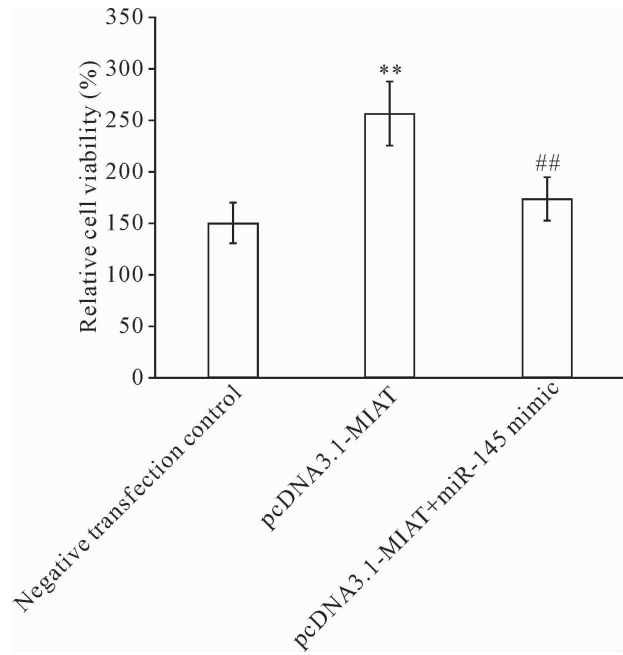


Figure 2. The viability changes of VSMC cultured in non-high glucose medium after transfection. Mean \pm SD. $n = 5$.
** $P < 0.01$ vs negative transfection control group;
$P < 0.01$ vs pcDNA3.1-MIAT group.

图2 非高糖处理培养的血管平滑肌细胞经转染处理后的细胞活力变化

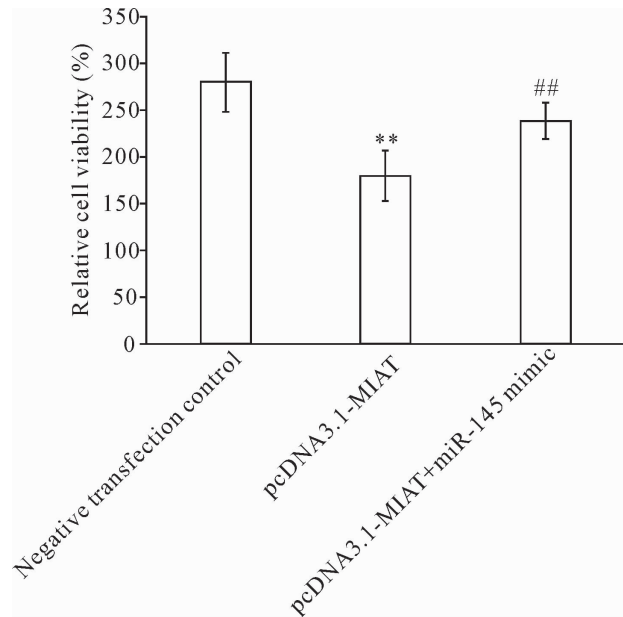


Figure 3. The viability changes of VSMC cultured in high glucose medium after transfection. Mean \pm SD. $n = 5$.
** $P < 0.01$ vs negative transfection control group;
$P < 0.01$ vs MIAT-siRNA group.

图3 高糖培养的血管平滑肌细胞经转染处理后的细胞活力变化

3 lncRNA-MIAT 负向调控 microRNA-145

RT-qPCR 结果显示, 对于非高糖培养的 VSMC,

与阴性转染对照亚组相比, 转染 pcDNA3.1-MIAT 亚组的 microRNA-145 相对水平显著降低 ($P < 0.05$)。对于高糖培养的 VSMC, 与阴性转染对照亚组相比, 转染 MIAT-siRNA 亚组的 microRNA-145 相对水平显著升高 ($P < 0.05$), 见图 4、5。该结果提示 lncRNA-MIAT 可以抑制 microRNA-145 的表达。miRcode lncRNA-microRNA 互作预测系统的结果提示, lncRNA-MIAT 与 microRNA-145 存在互补结合的区域。双萤光素酶报告基因实验的结果显示, 相对于共转染 microRNA-145 mimic 与 pmirGLO-MIAT-MUT 质粒的细胞, 共转染 microRNA-145 mimic 与 pmirGLO-MIAT-WT 质粒的细胞相对萤光素酶活性显著降低 ($P < 0.01$), 见图 6。该结果提示 lncRNA-MIAT 确实可以与 microRNA-145 直接靶向结合, 可能以“核酸海绵”的形式抑制 microRNA-145 的表达。

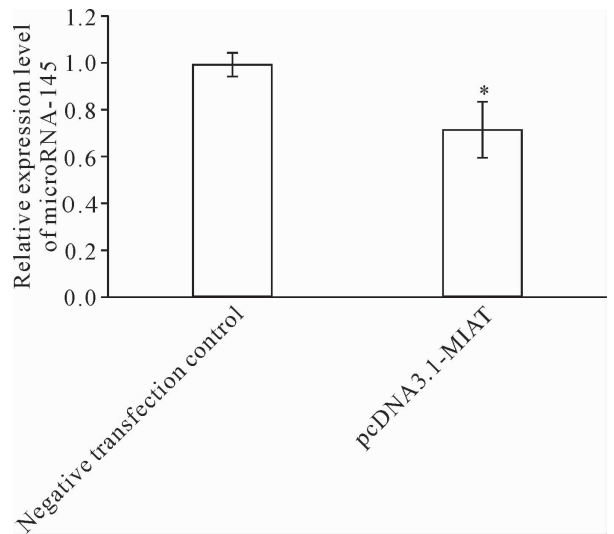


Figure 4. MicroRNA-145 level in VSMC cultured in non-high glucose medium after lncRNA-MIAT over-expression. Mean \pm SD. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs negative transfection control group.

图4 非高糖培养的血管平滑肌细胞中过表达 lncRNA-MIAT 后的 microRNA-145 水平

讨 论

糖尿病患者的大血管病变主要以动脉粥样硬化为主, 超过 80% 左右的糖尿病患者的死亡原因与动脉粥样硬化引起的心脑血管事件相关^[5-6]。糖尿病患者罹患动脉粥样硬化的风险显著提高且病变较非糖尿病患者来说更加弥漫复杂, 预后更差^[7]。糖尿病患者高血糖、高胰岛素血症及血脂蛋白代谢紊乱等损伤因素造成的 VSMC 增殖过度是血管内膜增厚、新生内膜形成、纤维帽子形成及管腔狭窄的主要原因, 被认为是糖尿病患者动脉粥样硬化形成的重

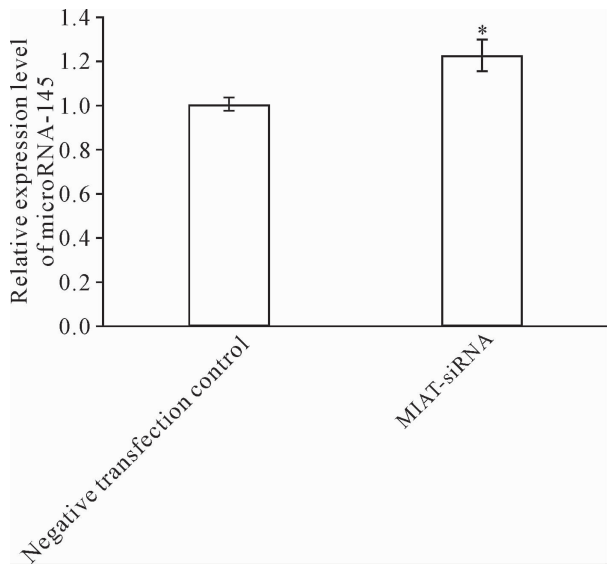


Figure 5. MicroRNA-145 level in VSMC cultured in high glucose medium after lncRNA-MIAT silencing. Mean \pm SD. $n = 5$. * $P < 0.05$ vs negative transfection control group.

图5 高糖培养的血管平滑肌细胞中沉默 lncRNA-MIAT 后的 microRNA-145 水平

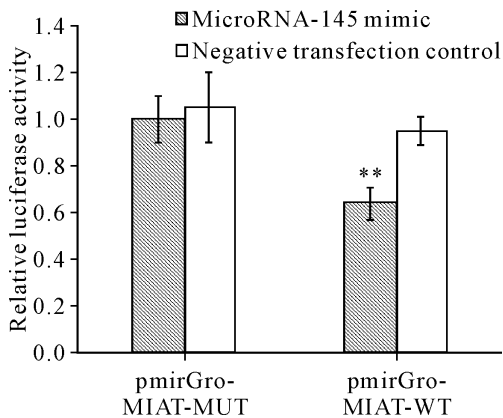


Figure 6. Relative luciferase activity changes of the VSMC detected by dual-luciferase reporter assay. Mean \pm SD. $n = 5$. ** $P < 0.01$ vs pmirGro-MIAT-MUT.

图6 双萤光素酶报告基因实验中细胞的相对萤光素酶活性变化

要病理生理学环节^[8-9]。因此采用干预手段防止 VSMC 的增殖过度可能对糖尿病大血管病变的防治具有重要意义。高血糖是糖尿病患者的共同标志性的特征,且被证实是糖尿病患者发生动脉粥样硬化的一个独立风险因素^[10-11],因此探讨高糖引起 VSMC 过度增殖的机制并设计干预措施的临床意义更为重大。

lncRNA 是一类转录本超过 200 个核苷酸单位的非编码 RNA,虽不编码蛋白质,但在染色质重构、转录调控、转录后调控及蛋白质代谢等方面均发挥重要的作用,因此参与各种疾病的调控^[12-13]。本研

究主要关注 lncRNA-MIAT 在高血糖引起的 VSMC 过度增殖中扮演的角色。lncRNA-MIAT 已经被证实参与糖尿病并发的血管病变。如 Yan 等^[3]的研究发现,在糖尿病大鼠模型的视网膜微血管组织中存在 lncRNA-MIAT 的高表达,在高糖环节培养的血管内皮细胞中也存在 lncRNA-MIAT 高表达且可以促进血管内皮细胞的功能紊乱。但是还没有研究证实 lncRNA-MIAT 在是否参与糖尿病患者大血管的病变,且没有研究表明其是否与高糖下 VSMC 的增殖过度有关。本研究通过体外细胞实验发现,高糖刺激后的大鼠 VSMC 出现了 lncRNA-MIAT 的高表达,而敲减细胞内 lncRNA-MIAT 的表达后,高糖刺激诱导的细胞活力增高作用被减弱。上调非高糖培养环境下 VSMC 的 lncRNA-MIAT 后,我们发现细胞的活力增加。因此本研究认为 lncRNA-MIAT 具有促进 VSMC 活力的作用,可参与高糖引起的 VSMC 活力异常。

lncRNA 发挥调控作用的机制比较复杂,其中一个较为重要的机制是竞争性内源 RNA 学说,即 lncRNA 可以作为“核酸海绵”,吸附相应的可与之互补的 microRNA,导致该 microRNA 的游离分子减少,间接导致该 microRNA 的靶基因水平发生改变^[14]。基于这个学说,本研究认为 lncRNA-MIAT 可能通过某个 microRNA 分子发挥作用。通过生物信息学分析我们发现,lncRNA-MIAT 可以和若干 microRNA 分子互补,这些 microRNA 中包括 microRNA-145。之所以进一步关注 microRNA-145,是因为已经有研究证实 microRNA-145 是 VSMC 中含量最丰富的 microRNA,不但可以调控 VSMC 的表型也可以调控其增殖和迁移。有研究指出,高血糖可以抑制 VSMC 的 microRNA-145 表达,而 microRNA-145 本身具有抑制 VSMC 增殖的作用,因此 microRNA-145 很可能参与糖尿病引起的血管病变,特别是参与该过程中 VSMC 的损伤^[15]。在生物信息学分析的基础上,本研究通过转染改变了 VSMC 的 lncRNA-MIAT 水平,同时检测了 microRNA-145 的表达变化,结果提示 lncRNA-MIAT 能够抑制 microRNA-145 的水平。进一步的双萤光素酶报告基因实验表明 lncRNA-MIAT 确实可以和 microRNA-145 互补结合。此外,本研究也发现 microRNA-145 在高糖刺激的 VSMC 中低表达,且确实发挥抑制 VSMC 活力的作用,与既往研究一致。综合这些结果,我们认为 lncRNA-MIAT 可以通过调控 microRNA-145 来实现对高糖刺激下 VSMC 活力的影响。当然,根据竞争性内源 RNA 学说,lncRNA-MIAT 如能对 microRNA-145 实现调控,则同时能改

变 microRNA-145 靶基因的水平,但本研究没对这些 microRNA-145 的靶基因进行探讨,这是本研究的缺陷。一些报道证实, microRNA-145 参与调控 VSMC 功能的靶基因主要有 *MMP-9*、*KLF4*、*KLF5*、*ELK1*、肌动蛋白调节蛋白基因、血管紧张素转换酶等。未来研究可以着眼于探讨 lncRNA-MIAT 对上述基因的调控。

总之,本研究的结果提示 lncRNA-MIAT 可能通过抑制 microRNA-145 促进 VSMC 的活力,这可能是高血糖导致 VSMC 活力增加的一个机制。靶向抑制 lncRNA-MIAT 可能有利于糖尿病大血管病变的防治。

【参 考 文 献】

- [1] Nozue T, Fukui K, Koyama Y, et al. Effects of sitagliptin on coronary atherosclerosis in patients with type 2 diabetes: a serial integrated backscatter-intravascular ultrasound study[J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2016, 6(4):153-162.
- [2] 张文通, 李俊, 吴玉婷, 等. 山柰酚-3-O-芸香糖苷对血管平滑肌细胞增殖、迁移及 TGFBR1 信号通路活化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(5):832-838.
- [3] Yan B, Yao J, Liu JY, et al. LncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA[J]. *Circ Res*, 2015, 116(7):1143-1156.
- [4] Li Y, Huang J, Jiang Z, et al. MicroRNA-145 regulates platelet-derived growth factor-induced human aortic vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting CD40[J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(4):1813-1825.
- [5] Goldfine AB, Shoelson SE. Therapeutic approaches targeting inflammation for diabetes and associated cardiovascular risk[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1):83-93.
- [6] Whelton SP, McEvoy JW, Lazo M, et al. High-sensitivity cardiac troponin T (hs-cTnT) as a predictor of incident diabetes in the atherosclerosis risk in communities study [J]. *Diabetes Care*, 2017, 40(2):261-269.
- [7] Rhee SY, Kim YS. Peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Metab J*, 2015, 39(4):283-290.
- [8] Yang J, Chen L, Ding J, et al. MicroRNA-24 inhibits high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting HMGB1 [J]. *Gene*, 2016, 586(2):268-273.
- [9] Shiny A, Regin B, Mohan V, et al. Coordinated augmentation of NFAT and NOD signaling mediates proliferative VSMC phenotype switch under hyperinsulinemia [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 246:257-266.
- [10] Das S, Senapati P, Chen Z, et al. Regulation of angiotensin II actions by enhancers and super-enhancers in vascular smooth muscle cells[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):1467.
- [11] Chen J, Dai M, Wang Y. Paeonol inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by high glucose via Ras-Raf-ERK1/2 signaling pathway in coculture model [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014:484269.
- [12] Dechamethakun S, Muramatsu M. Long noncoding RNA variations in cardiometabolic diseases[J]. *J Hum Genet*, 2017, 62(1):97-104.
- [13] Leung A, Natarajan R. Noncoding RNAs in vascular disease[J]. *Curr Opin Cardiol*, 2014, 29(3):199-206.
- [14] Ming GF, Wu K, Hu K, et al. NAMPT regulates senescence, proliferation, and migration of endothelial progenitor cells through the SIRT1 AS lncRNA/miR-22/SIRT1 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3):1382-1388.
- [15] Riches K, Alshaniwani AR, Warburton P, et al. Elevated expression levels of miR-143/5 in saphenous vein smooth muscle cells from patients with Type 2 diabetes drive persistent changes in phenotype and function[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74:240-250.

(责任编辑:林白霜,罗森)