

动脉粥样硬化相关LncRNA的研究

汪志伟*, 丁洋, 万圣云#

安徽医科大学第二附属医院, 安徽 合肥

收稿日期: 2022年10月16日; 录用日期: 2022年11月10日; 发布日期: 2022年11月18日

摘要

目的: 筛选并验证新的调控动脉粥样硬化的差异lncRNA, 为该类疾病的治疗和预后提供新的思路。方法: 1) 100 ug/ml ox-LDL刺激人主动脉血管平滑肌细胞24 h作为实验组, 正常人主动脉血管平滑肌细胞作为对照组, 质检合格后, Trizol法提取总RNA, 进行高通量测序, 筛选符合标准的表达上调的差异lncRNA。qPCR验证差异lncRNA。2) shRNA慢病毒载体感染HAVSMC, 检测目的基因敲减后表达量。3) 将人主动脉血管平滑肌细胞分为正常组、ox-LDL处理组、ox-LDL + shBOLA3-AS1、ox-LDL + shPOC1B-AS1、ox-LDL + shGRXCR1-4, 采用CCK8和Transwell法检测各组HAVSMC的增殖迁移能力, ELISA法测定胆固醇水平。结果: 1) 初步筛选三种显著表达上调的lncRNA: BOLA3-AS1、POC1B-AS1、GRXCR1-4。2) 各敲减组中目标lncRNA的表达水平均显著降低($P < 0.05$)。3) 下调三种差异基因表达后, 与ox-LDL处理组相比, 其增殖活性, 迁移能力及胆固醇水平均显著降低($P < 0.01$)。结论: LncRNABOLA3-AS1、POC1B-AS1、GRXCR1-4显著表达上调并参与调控动脉粥样硬化的进程。

关键词

长链非编码RNA, 动脉粥样硬化, 高通量测序, 胆固醇

The Research on Long Noncoding RNA Related to Atherosclerosis

Zhiwei Wang*, Yang Ding, Shengyun Wan#

The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui

Received: Oct. 16th, 2022; accepted: Nov. 10th, 2022; published: Nov. 18th, 2022

Abstract

Objective: Filter and verify new regulatory atherosclerosis LncRNA to provide new ideas for the treatment and prognosis of such diseases. **Methods:** 1) 100 ug/ml ox-LDL stimulates human aortic

*第一作者。

#通讯作者 Email: wshy63@ sina.com

blood vessel smooth muscle cells for 24 h as the experimental group, and normal people's aortic blood vessel smooth muscle cells are used as a control group. After qualified quality inspection, total RNA was extracted by Trizol method for high-throughput sequencing to screen the differential lncRNA with upregulated expression that met the criteria. Differential lncRNA was verified by qPCR. 2) HAVSMC was infected with shRNA lentiviral vector, and the expression of target gene was detected after knockdown. 3) Select the most effective interference targets, divide human aortic blood vessel smooth muscle cells into normal group, ox-LDL treatment group, ox-LDL + shBOLA3-AS1, ox-LDL + shPOC1B-AS1, ox-LDL + shGRXCR1-4. The CCK8 and Transwell Method were used to detect the proliferation migration capabilities of each group of HAVSMC, and the ELISA method was used to determine cholesterol levels. Results: 1) Preliminary screening of three significant expression of lncRNA: BOLA3-AS1, POC1B-AS1, GRXCR1-4. 2) The expression level of the target lncRNA in each knocking group was significantly reduced ($P < 0.05$). 3) After the three different genes are lowered, compared with the ox-LDL processing group, its proliferation activity, migration capabilities and cholesterol levels are significantly reduced ($P < 0.01$). Conclusion: lncRNA BOLA3-AS1, POC1B-AS1, GRXCR1-4 significantly increased and participated in the process of regulating atherosclerosis.

Keywords

lnc RNA, Atherosclerosis, High-Throughput Sequencing, Cholesterol

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)主要影响全身大中型动脉,以脂质代谢的障碍,内皮细胞功能的紊乱,平滑肌细胞的增殖和迁移等为特征[1]。使得动脉血管逐渐狭窄,组织器官缺血坏死。研究表明长链非编码 RNA (lnc RNA)可通过多种途径影响 AS 的进程,譬如调控转录调节蛋白复合物、结合并调节蛋白质,以及干扰蛋白质翻译等[2] [3] [4],并作为其靶点进行干预和治疗。但是目前还不足以完全阐释相关机制。借助高通量测序技术(high-throughput sequencing, HTS)的发展,一些非编码 RNA,譬如 lncRNAs、snoRNAs、和 microRNAs,已经被系统地描述[5]。本研究借助 HTS,利用氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激人主动脉血管平滑肌细胞(Human aortic blood vessel smooth muscle cell, HAVSMC)作为模型,筛选验证表达量显著上调的差异 lnc RNA,并通过功能实验进一步验证其对 AS 的作用。

2. 实验材料和方法

2.1. 实验材料

RPMI1640 和 DMEM、Transwell 试剂盒购自 corning 公司;胎牛血清(FBS)购自 invitrogen 和 Ausbian; Penicillin-Streptomycin(100x)购自 Gibco; 人主动脉血管平滑肌细胞(HA-VSMC)、BOLA3-AS1 shRNA、GRXCR1-4 shRNA、POC1B-AS1 shRNA 慢病毒载体购自上海懿贝瑞生物医药公司; Trizol 购自 Sigma; qPCR 相关购自 Vazyme 和金唯智公司; CCK-8 试剂购自 Sigma 公司。

2.2. 实验方法

2.2.1. 细胞分组及样品质检

将 HA-VSMC 接种于 10%胎牛血清培养基,添加青霉素降低污染,于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养,

取对数生长期细胞分成两组：一组加用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激 24 h, 另一组不加用, 每组三个重复, 用于后续实验。利用 Trizol 法抽提各组样本细胞中的总 RNA, 对总 RNA 经 NanoDrop ND-2000 分光光度计, 测量 RNA 的浓度、A260/280 吸光值比率分别为 1.97、1.97、1.98、1.92、1.93、1.92 显示其 $1.7 < A260/A280 < 2.2$, 表明样本质检符合后续实验要求, 可继续后续实验。

2.2.2. 高通量测序

1) 数据预处理

对上述质检合格样品送上海生物芯片有限公司行高通量测序, 由于原始测序数据中含有测序接头序列, 有些读序中含有质量较低的碱基、末端质量偏低等不合格情况, 这些可能影响到后续分析结果的可靠性, 故采用 Seqtk 软件对原始数据进行预处理, 去除接头序列、低质量读序。

2) 差异 lncRNA 分析

应用 edgeR 软件包进行样本间差异 lncRNA 分析, 在本次实验中, P-value 使用 BH 法进行校正(FDR)。显著性差异基因的筛选标准为: $|\text{Fold Change}| \geq 1.3$ 且 $\text{FDR} < 0.05$ 。根据结果挑选 5 个差异的表达上调的 lncRNA 后续验证。

2.2.3. qPCR 检测基因表达

运用 Trizol 法提取细胞的总 RNA, 分光光度计测定浓度。根据逆转录试剂盒说明书进行反转录成 cDNA 备用。根据筛选出的 lncRNA 设计上游引物和下游引物, 引物序列如下, 见表 1。两步法进行 Real-Time PCR, 其中包括 2 μl 的 cDNA 模板, 各 0.25 μl 的上下游引物。设定程序 95°C , 1 min; 95°C , 10 s; 60°C , 30 s; 循环 45 次。最后数据信息采集与保存。获取相应数据, 并检测每个样本的循环数即 Ct 值, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法来计算各差异基因的相对表达量。

Table 1. Primer sequence

表 1. 引物序列

目的基因	上游引物序列	下游引物序列	
LncRNF135-1	GATTTCTCCGTTGTGTTTCGTCTTT	AGTGCTCATGTGCTGCTTCC	185
GAPDH	TGACTTCAACAGCGACACCCA	CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA	121
LncUNC93B1-1	CCGTGTCTGTCCTCTTCTCTCT	TCTTCCCTCTCCCTGCCTCA	142
Lnc BOLA3-AS1	TTTCCATTCCCCTCCCTACTCTG	CCCTACACGCTCTCTTCTTACA	144
Lnc GRXCR1-4	TAGACGAACGATGCCGACGA	AAGAAAGCCAAAGCTCCACAA	191
Lnc POC1B-AS1	TTCACGGAGGGAGCAACAAAC	GCCTGAGACACAAACACTGA	106

2.2.4. qPCR 检测基因敲低效率

将人主动脉血管平滑肌细胞分为空白组(CON)、阴性对照组(shCtrl)、实验组。实验组分别转染上海懿贝瑞生物公司提供的 shBOLA3-AS1, shGRXCR1-4, shPOC1B-AS1, 转染 48 h 后, 参照 2.2.3 采用 qPCR 测得各组目标基因的相对表达量, 验证基因敲减能力。

2.2.5. CCK8 检测细胞活力

将人主动脉血管平滑肌细胞及转染 shBOLA3-AS1, shGRXCR1-4, shPOC1B-AS1 48h 后的分为: 正常组(NC); ox-LDL 处理组; ox-LDL + shBOLA3-AS1 组; ox-LDL + shGRXCR1-4 组; ox-LDL + shPOC1B-AS1 组, 每组三个重复, 制成细胞悬液, 收集细胞后接种于 96 孔板, 培养箱中培养一段时间(37°C ,

5% CO₂), 每孔加 10 ul CCK8, 设定 0 h、24 h、48 h、72 h 时间点, 酶标仪测定 450 nm 处的各孔吸光度 (OD), 表示增殖活力, 活力计算公式: 细胞活力(%) = [OD(实验) - OD(空白)]/[OD(对照) - OD(空白)] × 100%。

2.2.6. Transwell 检测细胞迁移能力

分组同 2.2.5, 胰酶消化后, 低血清培养基重悬, 无血清培养基稀释。加细胞悬液 100 uL (含 100000~200000)于小室中, 将小室放入含 600 uL 30% FBS 培养基的下室中, 培养箱培养 24 h, 倒扣吸水纸上去除培养基, 棉拭子擦去非转移细胞, 400 ul 染液染色 5 min, 冲洗晾干, 显微镜下计数膜细胞数目, 以细胞数反应迁移能力。

2.2.7. 检测细胞胆固醇水平

将人主动脉血管平滑肌细胞分组为: 正常组(NC); ox-LDL 处理组; ox-LDL + shBOLA3-AS1; ox-LDL + shGRXCR1-4; ox-LDL + shPOC1B-AS1, 严格按 ELISA 检测试剂盒说明书操作, 设标准品孔, 空白对照孔和待测样品孔, 再通过加样、温育、配液等操作后显色, 37℃避光显色 15 分钟, 然后每孔加终止液 50 μl, 观察颜色变化(蓝色变黄色, 即为终止)。加终止液 15 min 内测定: 以空白孔调零, 500 nm 波长依序测量各孔的吸光度(OD 值)。根据标准品对应的浓度和 OD 值可计算直线回归方程, 再根据待测样品 OD 值计算浓度。

2.3. 统计学分析

采用 SPSS 26.0 进行统计分析, 采用 GraphPad Prism 9.0 作图软件进行统计作图。数据运用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 2 组间均数采用 t 检验, P < 0.05 有统计学意义。

3. 实验结果

3.1. 高通量测序结果

将探针信号均值小于 0.005 的探针予以滤除, 符合筛选标准, 结果显示 568 个显著性上调基因, 428 个显著性下调基因。其中, 初步挑选了 5 个显著表达上调的 lncRNA, 见表 2。

Table 2. Five differentially expressed lncRNAs with significantly up-regulated expression
表 2. 5 个表达显著上调的差异 lncRNA

LncRNA ID	Gene name	Log2FC	P-value	result
ENST00000423477	BOLA3-AS1	5.36784	0.000822	up
ENST00000431308	RFN135-1	4.908546	0.002703	up
NONHSAT022490.2	UNC93B1-1	5.133109	0.00132	up
ENST00000507388	GRXCR1-4	Inf	4.05E-06	up
ENST00000605233	POC1B-AS1	Inf	9.00E-13	up

备注: Inf 无穷大。

3.2. QPCR 验证 5 个差异基因

结果表明: 与正常组相比, ox-LDL 组的 lncGRXCR1-4、POC1B-AS1、BOLA3-AS1 的表达显著增加 (P < 0.05), 差异有统计学意义, 见图 1。

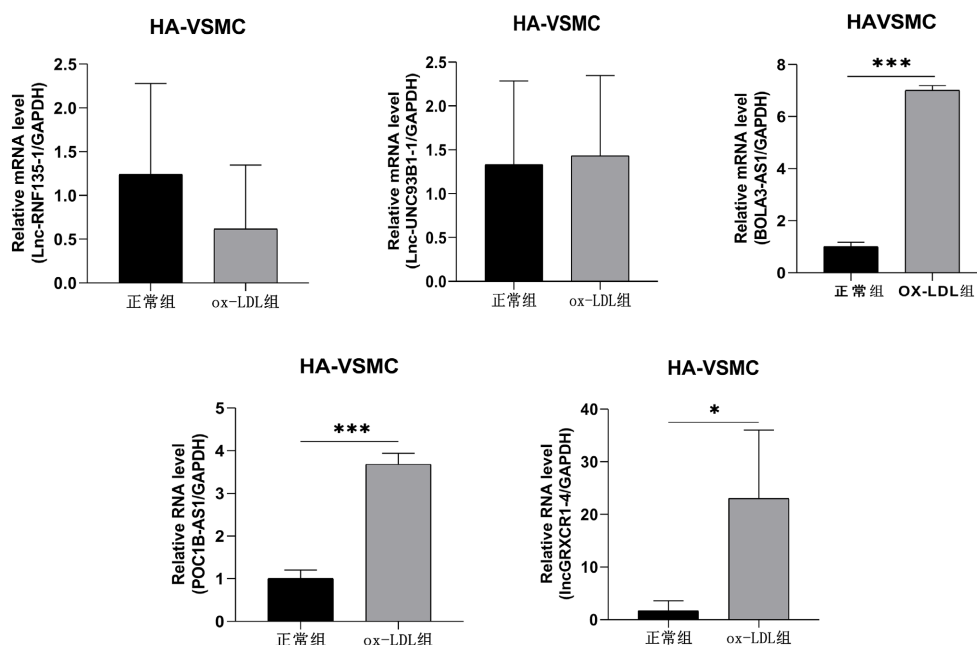


Figure 1. qPCR detection and verification of target lncRNA

图 1. qPCR 检测验证目标 lncRNA

3.3. 敲减 3 种差异基因

qPCR 检测 3 个基因敲减后的表达量, CON 组和 shBOLA3-AS1 组相对表达量 1.001 ± 0.056 、和 0.336 ± 0.004 ; CON 组和 shGRXCR1-4 组相对表达量为 1.001 ± 0.044 和 0.531 ± 0.015 ; CON 组和 shPOC1B-AS1 组相对表达量为 1.000 ± 0.020 和 0.616 ± 0.017 。与 CON 组相比, 各敲减组中 BOLA3-AS1、POC1B-AS1、GRXCR1-4 基因表达水平平均显著降低($P < 0.05$), 有统计学意义, 敲减有效。

3.4. CCK8 检测细胞活性

正常组培养 0 h、24 h、48 h、72 h 的 OD 值分别是: 0.197300 ± 0.001308 、 0.501467 ± 0.014841 、 0.729967 ± 0.026494 、 1.142200 ± 0.009395 ; ox-LDL + shBOLA3-AS1 组培养 0 h、24 h、48 h、72 h 的 OD 值分别是: 0.202967 ± 0.010050 、 0.403133 ± 0.001858 、 0.650067 ± 0.000321 、 0.879867 ± 0.064943 ; ox-LDL + shPOC1B-AS1 组培养 0 h、24 h、48 h、72 h 的 OD 值分别是: 0.194733 ± 0.003044 、 0.404867 ± 0.006837 、 0.618833 ± 0.002548 、 0.859867 ± 0.016916 ; ox-LDL + shGRXCR1-4 组培养 0 h、24 h、48 h、72 h 的 OD 值分别是: 0.186133 ± 0.004412 、 0.314100 ± 0.006767 、 0.520633 ± 0.009672 、 0.767033 ± 0.020232 ; 与正常组相比, ox-LDL + shBOLA3-AS1、ox-LDL + shGRXCR1-4、ox-LDL + shPOC1B-AS1 组细胞活性显著降低($P < 0.01$), 差异有统计学意义。

3.5. 敲减后细胞迁移能力的比较

结果见表 3, 与 ox-LDL 组相比, 基因抑制组细胞迁移水平显著降低($P < 0.01$), 差异有统计学意义。

3.6. 敲减后各组胆固醇浓度的比较

结果见图 2, 与正常组相比, ox-LDL 组胆固醇量明显升高($P < 0.001$); 与 ox-LDL 组相比, 基因抑制组胆固醇含量均显著降低($P < 0.001$), 差异有统计学意义。

Table 3. Cell migration number in each group
表 3. 各组细胞迁移数目

组别	细胞迁移数目($\bar{x} \pm s$)	P 值
正常组	92 ± 17.58	
ox-LDL 组	120 ± 10.41	0.0742
ox-LDL + shBOLA3-AS1	52 ± 10.07	0.0012
ox-LDL + shGRXCR1-4	58 ± 5.57	0.0006
ox-LDL + shPOC1B-AS1	43 ± 8.62	0.0006

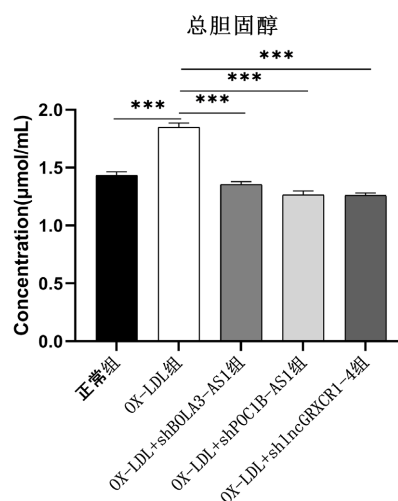


Figure 2. Cholesterol content in each group detected by ELISA

图 2. ELISA 检测各组胆固醇含量

4. 讨论

4.1. 高通量测序与 LncRNA

运用高通量测序技术研究诸多疾病的相关 lncRNA 也逐渐成为热点[6] [7] [8] [9]。Sun 等[10]用高通量测序检测胸主动脉夹层(TAD)和正常主动脉组织,预测异常表达的 lncRNA,并 qPCR 验证 lncRNA XIST 和 p21 在 TAD 中高表达, hasmiR-17-5p 在 TAD 中低表达。Yang 等[11]运用高通量测序,比较 2 型糖尿病患者和正常者之间差异基因,亦发现 441 个 lncRNA,其中 366 个上调,75 个下调。另外, Liao 通过对冠心病组和健康对照组之间进行高通量测序,分析 lncRNACTA-384D8.35 和 CTB-114C7.4 为该类疾病的关键基因[12]。在本次实验里,同样运用高通量测序技术,并以 $P < 0.05$, 差异倍数|FoldChange| > 1.3 作为筛选标准。然而一般默认 FC 的绝对值大于 2,但在本次实验中,以此标准可能会造成实验的差异基因数目过低,导致某些与 AS 确实有关的 lncRNA 被筛除,故以 $FC > 1.3$ 选取表达上调的差异 lncRNA。

4.2. 动脉粥样硬化与 LncRNA

动脉粥样硬化的发生发展,使得心脑血管疾病发生率居高不下[13] [14] [15]。研究表明, lncRNA 在 AS 中扮演着重要的角色。Bai 等人[16]证实 lncRNA meg3 使 mir-26a 海绵化,同时促进 samd1 的表达,调节动脉粥样硬化中血管平滑肌细胞的增殖/凋亡平衡,影响 AS 的进展。Wang 等人[17]也研究出 foxc2-as1

通过 mir-1253/foxf1 信号轴进一步促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。另外, lncRNA H19 也有报道显示,表达量增加时,粥样硬化斑块随之也会增大,促进氧化型低密度脂蛋白(ox-ldl)诱导的巨噬细胞的脂质积累,降低 mir-146a-5p 的表达[18]。Liu 等人[19]探讨了长链非编码 RNA MALAT1 在氧化低密度脂蛋白的摄取、脂质积累和总胆固醇水平方面,与 mir-17-5p/abca1 轴的关系。在本次研究中,我们运用 ox-LDL 刺激 HA-VSMC 24 h,然后质检高通量测序,初步筛选并通过 qPCR 验证三种表达显著上调的差异 lncRNA: BOLA3-AS1、POC1B-AS1、GRXCR1-4,可能通过某种分子机制参与调控动脉粥样硬化的进程。查阅目前文献, BOLA3-AS1 与肿瘤预后相关, Wei 等人[20]在研究新的预测胃癌预后相关 lncRNA 标志物时发现, BOLA3-AS1 在胃癌细胞系表达较正常胃细胞系中的上调,并且通过构建风险模型来预测胃癌患者预后。此外,它也可作为糖酵解相关的 lncRNA 来预测子宫内膜癌患者的生存预后, Jiang 等[21]研究发现,包括 BOLA3-AS1 在内的 5 个糖酵解相关的基因,成功的将三个独立队列中的每个人分成了生存结果显著不同的高风险和低风险亚组,达到对子宫内膜癌的稳健的预测效果。还有研究显示,与结肠癌的预后免疫及治疗敏感性有关[22]。同样, POC1B-AS1 也可作为构建子宫内膜癌预后模型的 lncRNA,将计算风险比(HR)用于自噬相关的 lncRNAs,分类为 POC1B-AS1 则为保护因素(HR < 1),且高表达患者的总生存率显著长于低表达患者[23]。另外在结肠腺癌[24],在半月板退化[25]等方面也发挥着一定的调控作用。长链非编码 RNA GRXCR1-4 鲜有文献报道。因此,就三种差异 lncRNA 而言,常作为肿瘤疾病预后模型的因素,在 AS 中扮演的角色尚无法揭示。但也有研究表明,肿瘤与动脉粥样硬化也是相关的[26] [27] [28],包括有共同的危险因素:三高、遗传等,相同的病理机制:炎症,血管新生,细胞增殖凋亡及低密度脂蛋白胆固醇水平升高等。这也证实了差异 lncRNA 是可以影响 AS 的进程。因此,为进一步证实 lncRNABOLA3-AS1、POC1B-AS1、GRXCR1-4 是 AS 进展中的调控原件,在本次研究中,将三种基因通过构建敲低质粒转染的方式,抑制其在 HA-VSMC 中的表达,然后通过 Transwell, CCK8 及 ELISA 方法进行功能实验。检测各组中的细胞活性,增殖迁移能力,及胆固醇水平。发现伴随三种基因的表达量的下降,其平滑肌细胞的增殖迁移能力、胆固醇水平降低。而相对正常组, ox-LDL 处理组却是升高的。故进一步证实长链非编码 RNABOLA3-AS1、POC1B-AS1、GRXCR1-4 在动脉粥样硬化进程中发挥着重要的调控作用。

综上所述,通过高通量测序及 QPCR 等生物技术的应用,筛选验证出 lncRNA BOLA3-AS1、GRXCR1-4、POC1B-AS1 与动脉粥样硬化有关,并且通过降低三种基因表达后发现,人主动脉血管平滑肌细胞的增殖活性、迁移能力,胆固醇水平也随之降低,而这些是造成 AS 重要的危险因素。另外,因为资金和人力、时间的限制,其具体机制并未深入研究,尚不清楚,此外未对表达量显著下降的差异 lncRNA 进行对比分析,造成对 AS 影响结果的片面性。抑制差异基因表达时,亦仅仅单一抑制,未考虑差异基因互作的影响。但是,本次研究亦为 AS 的治疗和预后提供新的干扰靶点,进一步完善与 AS 相关的 lncRNA 家族。

参考文献

- [1] 赵小芳, 郑华波, 刘承云. SIRT6 在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(11): 2436-2439.
- [2] Holdt, L.M., Kohlmaier, A. and Teupser, D. (2019) Long Noncoding RNAs of the Arterial Wall as Therapeutic Agents and Targets in Atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*, **119**, 1222-1236. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1692680>
- [3] 李飞飞, 侯欣, 欧敬民, 等. 长链非编码 RRS1-AS1/miR-142-3p/TRIM24 分子轴对脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 中国心血管病研究, 2021, 19(8): 752-756.
- [4] Sun, H., Jiang, Q., Sheng, L. and Cui, K. (2020) Downregulation of lncRNA H19 Alleviates Atherosclerosis through Inducing the Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells. *Molecular Medicine Reports*, **22**, 3095-3102. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11394>

- [5] Reuter, J.A., Spacek, D.V. and Snyder, M.P. (2015) High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, **58**, 586-597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.004>
- [6] Charlebois, R.L., Sathiamoorthy, S., Logvinoff, C., Gisonni-Lex, L., Mallet, L. and Ng, S.H.S. (2020) Sensitivity and Breadth of Detection of High-Throughput Sequencing for Adventitious Virus Detection. *NPJ Vaccines*, **5**, Article No. 61. <https://doi.org/10.1038/s41541-020-0207-4>
- [7] Li, C., Liu, M., An, Y., et al. (2021) Risk Assessment of Type 2 Diabetes in Northern China Based on the Logistic Regression Model. *Technology and Health Care*, **29**, 351-358. <https://doi.org/10.3233/THC-218033>
- [8] Wang, X., Ren, H. and Zhan, Y. (2017) Characterization of Microbial Community Composition and Pathogens Risk Assessment in Typical Italian-Style Salami by High-Throughput Sequencing Technology. *Food Science and Biotechnology*, **27**, 241-249. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0200-5>
- [9] Shen, L., Niu, J., Wang, C., et al. (2019) High-Throughput Screening and Identification of Potent Broad-Spectrum Inhibitors of Coronaviruses. *Journal of Virology*, **93**, e00023-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00023-19>
- [10] Sun, J., Chen, G., Jing, Y., He, X., et al. (2018) LncRNA Expression Profile of Human Thoracic Aortic Dissection by High-Throughput Sequencing. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **46**, 1027-1041. <https://doi.org/10.1159/000488834>
- [11] Yang, F., Chen, Y., Xue, Z.Q., Lv, Y.G., Shen, L., et al. (2020) High-Throughput Sequencing and Exploration of the lncRNA-circRNA-miRNA-mRNA Network in Type 2 Diabetes Mellitus. *BioMed Research International*, **2020**, Article ID: 8162524. <https://doi.org/10.1155/2020/8162524>
- [12] Liao, J., Wang, J., Liu, Y., Li, J. and Duan, L. (2019) Transcriptome Sequencing of lncRNA, miRNA, mRNA and Interaction Network Constructing in Coronary Heart Disease. *BMC Medical Genomics*, **12**, Article No. 124. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0570-z>
- [13] Zhang, Y., Bai, L., Shi, M., et al. (2017) Features and Risk Factors of Carotid Atherosclerosis in a Population with High Stroke Incidence in China. *Oncotarget*, **8**, 57477-57488. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15415>
- [14] Bian, L., Xia, L., Wang, Y., et al. (2018) Risk Factors of Subclinical Atherosclerosis and Plaque Burden in High Risk Individuals: Results from a Community-Based Study. *Frontiers in Physiology*, **9**, Article No. 739. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00739>
- [15] Jayachandran, M. and Qu, S. (2021) Harnessing Hyperuricemia to Atherosclerosis and Understanding Its Mechanistic Dependence. *Medicinal Research Reviews*, **41**, 616-629. <https://doi.org/10.1002/med.21742>
- [16] Bai, Y., Zhang, Q., Su, Y., Pu, Z. and Li, K. (2019) Modulation of the Proliferation/Apoptosis Balance of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis by lncRNA-MEG3 via Regulation of miR-26a/Smad1 Axis. *International Heart Journal*, **60**, 444-450. <https://doi.org/10.1536/ihj.18-195>
- [17] Wang, Y.Q., Xu, Z.M., Wang, X.L., et al. (2020) lncRNA FOXC2-AS1 Regulated Proliferation and Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell through Targeting miR-1253/FOXF1 Axis in Atherosclerosis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **24**, 3302-3314.
- [18] Huang, S.F., Zhao, G., Peng, X.F. and Ye, W.C. (2021) The Pathogenic Role of Long Non-Coding RNA H19 in Atherosclerosis via the miR-146a-5p/ANGPTL4 Pathway. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, **8**, Article ID: 770163. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.770163>
- [19] Liu, L., Tan, L., Yao, J. and Yang, L. (2020) Long Non-Coding RNA MALAT1 Regulates Cholesterol Accumulation in ox-LDL-Induced Macrophages via the microRNA-17-5p/ABCA1 Axis. *Molecular Medicine Reports*, **21**, 1761-1770. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10987>
- [20] Wei, J., Zeng, Y., Gao, X. and Liu, T. (2021) A Novel Ferroptosis-Related lncRNA Signature for Prognosis Prediction in Gastric Cancer. *BMC Cancer*, **21**, Article No. 1221. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08975-2>
- [21] Jiang, Y., Chen, J., Ling, J., et al. (2021) Construction of a Glycolysis-Related Long Noncoding RNA Signature for Predicting Survival in Endometrial Cancer. *Journal of Cancer*, **12**, 1431-1444. <https://doi.org/10.7150/jca.50413>
- [22] Guo, J.N., Xia, T.Y., Deng, S.H., Xue, W.N., Cui, B.B. and Liu, Y.L. (2021) Prognostic Immunity and Therapeutic Sensitivity Analyses Based on Differential Genomic Instability-Associated lncRNAs in Left- and Right-Sided Colon Adenocarcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **8**, Article ID: 668888. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.668888>
- [23] Liu, H. and Cheng, Y. (2022) Identification of Autophagy-Related Long Non-Coding RNAs in Endometrial Cancer via Comprehensive Bioinformatics Analysis. *BMC Women's Health*, **22**, Article No. 85. <https://doi.org/10.1186/s12905-022-01667-4>
- [24] Xia, F., Yan, Y. and Shen, C. (2021) A Prognostic Pyroptosis-Related lncRNAs Risk Model Correlates with the Immune Microenvironment in Colon Adenocarcinoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **9**, Article ID: 811734. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.811734>

- [25] Ai, L.Y., Du, M.Z., Chen, Y.R., Xia, P.Y., Zhang, J.Y. and Jiang, D. (2022) Integrated Analysis of lncRNA and mRNA Expression Profiles Indicates Age-Related Changes in Meniscus. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **10**, Article ID: 844555. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.844555>
- [26] Suzuki, M., Tomoike, H., Sumiyoshi, T., *et al.* (2017) Incidence of Cancers in Patients with Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *International Journal of Cardiology: Heart & Vasculature*, **17**, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2017.08.004>
- [27] DiRenzo, D., Owens, G.K. and Leeper, N.J. (2017) “Attack of the Clones”: Commonalities between Cancer and Atherosclerosis. *Circulation Research*, **120**, 624-626. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310091>
- [28] Wang, S.C., Schulman-Marcus, J., Fantauzzi, J., *et al.* (2019) Colon Cancer Laterality Is Associated with Atherosclerosis and Coronary Artery Disease. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, **10**, 30-36. <https://doi.org/10.21037/jgo.2018.09.18>