

# 长链非编码 RNA ZFAS1/miR-150/ROCK1 调控血管平滑肌细胞增殖和迁移\*

王秋, 黄伟剑<sup>△</sup>

(温州医科大学附属乐清医院, 浙江温州 325000)

**[摘要]** 目的: 探讨长链非编码 RNA ZFAS1 是否通过调控微小 RNA-150(miR-150)/ROCK1 促进血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖和迁移, 及其参与动脉粥样硬化发生发展的机制。方法: 用血小板源性生长因子 BB(PDGF-BB)诱导 VSMCs 增殖和迁移。用 real-time PCR 法检测 VSMCs 中 ZFAS1 的表达水平。进一步用小干扰 RNA(siRNA)下调 ZFAS1 表达后, 采用 MTT 和 EdU 法检测 VSMCs 的活力和增殖能力, 采用 Transwell 法检测 VSMCs 的迁移能力, 采用 real-time PCR 检测 miR-150 和 ROCK1 的表达水平, Western blot 检测 ROCK1 蛋白的表达水平。萤光素酶报告基因实验验证 *ROCK1* 为 miR-150 的靶基因。最后, 抑制 miR-150 表达, 检测下调 ZFAS1 表达后 VSMCs 的增殖、迁移及 ROCK1 表达。结果: PDGF-BB 上调 VSMCs 中 ZFAS1 的表达。下调 ZFAS1 表达后, VSMCs 的增殖和迁移受到抑制( $P < 0.05$ ), miR-150 表达水平上升( $P < 0.05$ ), ROCK1 表达水平下降( $P < 0.05$ )。萤光素酶报告基因实验结果显示 miR-150 能直接靶向调控 *ROCK1*。抑制 miR-150 表达后, 能减弱下调 ZFAS1 表达导致的 VSMCs 增殖和迁移的抑制作用( $P < 0.05$ ), 上调 ROCK1 的表达水平( $P < 0.05$ )。结论: ZFAS1 通过调控 miR-150/ROCK1 促进 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖和迁移。

**[关键词]** 长链非编码 RNA ZFAS1; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 细胞迁移; 微小 RNA-150; ROCK1 蛋白

**[中图分类号]** R363.2; R543.5

**[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.11.002

## Long noncoding RNA ZFAS1/miR-150/ROCK1 axis regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells

WANG Qiu, HUANG Wei-jian

(Yueqing Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China. E-mail: [weijianhuang69@126.com](mailto:weijianhuang69@126.com))

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate whether long noncoding RNA ZNF1 (zinc finger NFX1-type containing 1) antisense RNA 1 (ZFAS1) promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) by regulating microRNA-150 (miR-150)/ROCK1, and the involving mechanism of atherosclerosis. **METHODS:** Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) was used to induce proliferation and migration of VSMCs. Real-time PCR was used to detect the content of ZFAS1 in the VSMCs. After further down-regulating the expression of ZFAS1 by siRNA, the viability of VSMCs was detected by MTT assay, and the proliferation was measured by EdU staining. The migration ability of VSMCs was detected by Transwell method. The expression levels of miR-150 and ROCK1 were detected by RT-qPCR, and the protein level of ROCK1 was determined by Western blot. Luciferase reporter assay was used to confirm that *ROCK1* was the target gene of miR-150. Finally, miR-150 expression was inhibited, and the proliferation and migration ability of VSMCs and expression of ROCK1 after down-regulation of ZFAS1 expression were examined. **RESULTS:** PDGF-BB up-regulated the expression of ZFAS1 in the VSMCs. After down-regulating the expression of ZFAS1, the proliferation and migration abilities of VSMCs were inhibited ( $P < 0.05$ ), the expression level of miR-150 was increased ( $P < 0.05$ ), and the expression level of ROCK1 was decreased ( $P < 0.05$ ). The results of luciferase reporter assay showed that miR-150 directly targeted *ROCK1*. Inhibition of miR-150 expression attenuated the inhibition of proliferation and migration of VSMCs by ZFAS1 expression knock-down ( $P < 0.05$ ) and up-regulated the expression level of ROCK1 ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** ZFAS1 promotes the proliferation and migration of VSMCs induced by PDGF-BB by regulating miR-150/ROCK1.

[收稿日期] 2018-11-13

[修回日期] 2019-06-27

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81570364)

△通讯作者 Tel: 13806691086; E-mail: [weijianhuang69@126.com](mailto:weijianhuang69@126.com)

[KEY WORDS] Long noncoding RNA ZFAS1; Vascular smooth muscle cells; Cell proliferation; Cell migration; MicroRNA-150; ROCK1 protein

动脉粥样硬化是心肌梗死、中风、不稳定心绞痛和心脏猝死的潜在原因<sup>[1]</sup>。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是动脉壁的主要成分之一,最近的研究证明 VSMCs 的异常增殖和迁移是动脉粥样硬化发生发展中重要的病理生理基础<sup>[2]</sup>。因此,抑制 VSMCs 增殖和迁移可能在预防动脉粥样硬化的病理过程中起着重要作用,并可能成为一种新的治疗策略。

长链非编码 RNA(long noncoding RNA, lncRNA)是一类长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA。研究表明,lncRNA 在动脉粥样硬化中表达异常,在动脉粥样硬化的发病机制中扮演着重要的角色<sup>[3]</sup>。ZNF1 (zinc finger NFX1-type containing 1) antisense RNA 1 (ZFAS1)是位于染色体 20q13 的 lncRNA,被报道作为肿瘤抑制基因参与肿瘤的发生发展<sup>[4]</sup>。Zhang 等<sup>[5]</sup>报道 ZFAS1 在小鼠心肌梗死模型中表达升高,导致心脏收缩功能障碍。但是,ZFAS1 在动脉粥样硬化中对血管平滑肌细胞的作用尚未见报道。本项工作探讨 ZFAS1 对 VSMCs 增殖和迁移的影响,及其在动脉粥样硬化发生发展中的可能作用机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 实验材料

大鼠 VSMCs 购自 ATCC。胎牛血清及 DMEM 培养液购自 Gibco;血小板源性生长因子 BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 购自 Sigma; MTT 购自上海碧云天生物技术有限公司;EdU 试剂盒购自广州锐博生物公司;Transwell 小室购自 Corning; Lipofectamine 2000、TRIzol 和 qPCR 引物购自 Invitrogen;抗 ROCK1 (Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1) 和 GAPDH 抗体及 II 抗、ECL 发光液购自 Santa Cruz。

### 2 实验方法

**2.1 细胞分组** 血管平滑肌细胞用含 10% 胎牛血清的培养液培养,放置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的恒温培养箱中培养,当细胞汇合度达 80% 时进行传代。当细胞达到 80% 的汇合度时,对细胞进行无血清培养 24 h。将细胞随机分组为对照(control)组、PDGF-BB 组、PDGF-BB + 对照 siRNA (si-NC) 组和 PDGF-BB + ZFAS1-siRNA (si-ZFAS1) 组。Control 组不做任何干预,PDGF-BB 组加入 20 μg/L PDGF-BB 干预;PDGF-BB + si-NC 组和 PDGF-BB + si-ZFAS1 组分别转染对

照 siRNA 和 ZFAS1-siRNA 后用 20 μg/L PDGF-BB 干预。为了进一步验证 ZFAS1 和 miR-150 的调控作用,再将细胞随机分组为以下 4 组:PDGF-BB 组、PDGF-BB + si-ZFAS1 组、PDGF-BB + si-ZFAS1 + anti-NC 组和 PDGF-BB + si-ZFAS1 + anti-miR-150 组。前 2 组处理如前所述,后 2 组在转染 ZFAS1-siRNA 的同时分别转染 miR-150 抑制剂对照(anti-NC)和 miR-150 抑制剂(anti-miR-150)。

**2.2 细胞转染** 将 VSMCs 接种于培养液中培养,放置在 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的恒温培养箱中过夜,然后按照 Lipofectamine 2000 转染试剂盒说明书进行操作,将 si-NC、si-ZFAS1、anti-NC 和 anti-miR-150 转染到细胞中,转染 48 h 后,加入 20 μg/L PDGF-BB 继续培养 24 h。

**2.3 Real-time PCR 检测 ZFAS1、miR-150 和 ROCK1 表达水平** 用 TRIzol 提取细胞的总 RNA,分光光度计测定 RNA 浓度,按照逆转录试剂盒说明书进行反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,在 TaqDNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。ZFAS1 上游引物序列为 5'-ACGTGCAGACATCTACAA-3',下游引物序列为 5'-TACTTCCAACACCCGCAT-3'; miR-150 上游引物序列为 5'-GAAGATCTTCTACTTTGCGCA-3',下游引物序列为 5'-CCGCTCGAGCGGCCCTTGCTG-3';内参照 U6 上游引物序列为 5'-CTCGCTTCGGCAGCA-CATATACT-3',下游引物序列为 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTCT-3'; ROCK1 上游引物序列为 5'-AACATGCTGCTGGATAAATCT-3',下游引物序列为 5'-TGTATCACATCGTACCATGCC-3';内参照 GAPDH 上游引物序列为 5'-GAAGGTGAAGTTCG-GAGT-3',下游引物序列为 5'-GAAGATGGTGATGG-GATT-3'。PCR 条件:94℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,扩增 40 个循环。用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法进行结果分析。

**2.4 MTT 实验检测 VSMCs 活力** 将按上述分组要求处理的细胞调整浓度为 1 × 10<sup>7</sup>/L,取 100 μL 接种于 96 孔板,每组重复 4 个孔,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中过夜,每孔加入 10 μL MTT 溶液,孵育 2 h,测定 450 nm 处各孔的吸光度(A)值,计算出细胞活力。

**2.5 Edu 染色检测 VSMCs 增殖** 将按上述分组要求处理的细胞调整浓度为 1 × 10<sup>7</sup>/L,取 100 μL 接种于 96 孔板培养 24 h 后,加入含 50 μmol/L Edu 的培

养液孵育 2 h。根据试剂盒进行细胞固定以及 DNA 染色, 荧光显微镜下观察, 每孔随机选择 3 个视野, 计算染色细胞核占相应总细胞的百分比。

**2.6 Transwell 实验检测 VSMCs 迁移能力** 将转染 48 h 后的细胞调整浓度为  $1 \times 10^8/L$ , 在上室加入 200  $\mu L$  细胞悬液, 下室加入 500  $\mu L$  含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在细胞培养箱中培养 24 h。取出小室, PBS 清洗 3 次, 用甲醛固定 10 min, 加入 0.1% 的结晶紫溶液进行染色 15 min, PBS 洗 3 次, 用棉签轻轻拭去小室膜内侧细胞, 取下室膜平铺于载玻片上, 显微镜下随机观察 3 个视野的细胞数量。

**2.7 Western blot 检测 ROCK1 蛋白的表达水平** 按上述分组要求处理细胞后, 提取细胞蛋白, 用 BCA 法检测蛋白浓度。取 40  $\mu g$  总蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳结束后将其转至 PVDF 膜, 室温下用 5% 的 BSA 脱脂奶粉封闭 30 min, 加抗 ROCK1 和 GAPDH I 抗体于 4 $^{\circ}C$  孵育过夜, TBST 洗膜后加入 II 抗体于室温下孵育 2 h, TBST 洗膜后用 ECL 液进行化学发光反应并曝光。以 GAPDH 为内参照, 用 Quantity One 软件对条带灰度值进行测量并分析。

**2.8 萤光素酶报告基因实验** 构建野生型和突变型的 ROCK1 萤光素酶报告质粒载体, 将 VSMCs 按每孔  $1 \times 10^5$  接种于 24 孔板, 24 h 后用 Lipofectamine 2000 分别与 anti-NC 和 anti-miR-150 共转染进入 VSMCs, 24 h 后用双萤光素酶报告系统检测海肾和萤火虫萤光素酶活性, 以海肾萤光素酶为内参照, 实验重复 3 次。

### 3 统计学处理

实验数据分析采用 SPSS 20.0 软件, 采用均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 每组实验重复 3 次, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 各组均数间的两两比较采用 SNK-*q* 法, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 1 PDGF-BB 诱导 ZFAS1 表达上调

通过 real-time PCR 检测 VSMCs 中的 ZFAS1 表达, 结果显示, 与 control 组相比, PDGF-BB 组 VSMCs 中的 ZFAS1 表达显著上调 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。

### 2 下调 ZFAS1 表达可抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 增殖

用 siRNA 干扰 ZFAS1 的表达后用 real-time PCR 检测 VSMCs 中 ZFAS1 的表达水平, 结果显示, 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + si-ZFAS1 组中 ZFAS1 表达水平显著下调 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A。MTT 结果

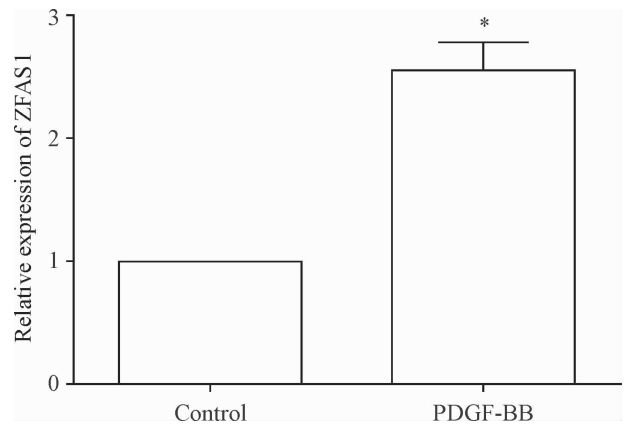


Figure 1. PDGF-BB promoted ZFAS1 expression in vascular smooth muscle cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

### 图 1 PDGF-BB 促进血管平滑肌细胞 ZFAS1 表达

显示, 与 control 组相比, PDGF-BB 组的 VSMCs 活力显著增强 ( $P < 0.05$ ); 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + si-ZFAS1 组 VSMCs 活力显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2B。EdU 染色结果显示, 与 control 组相比, PDGF-BB 组的 VSMCs 增殖能力显著增强 ( $P < 0.05$ ); 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + si-ZFAS1 组 VSMCs 增殖能力显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2C。

### 3 下调 ZFAS1 表达可抑制 PDGF-BB 诱导的 VSMCs 迁移

Transwell 实验观察 VSMCs 的迁移能力, 结果显示, 与 control 组相比, PDGF-BB 组的 VSMCs 迁移数目显著增多 ( $P < 0.05$ ); 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + si-ZFAS1 组 VSMCs 迁移数目显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

### 4 ZFAS1 下调 miR-150 的表达

Real-time PCR 检测 miR-150 的表达, 结果显示, 与 control 组相比, PDGF-BB 组 miR-150 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + si-ZFAS1 组 miR-150 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

### 5 ZFAS1 上调 ROCK1 的表达

Real-time PCR 和 Western blot 检测 ZFAS1 对 ROCK1 mRNA 和蛋白表达的影响, 结果显示, 与 control 组相比, PDGF-BB 组 ROCK1 mRNA 和蛋白表达显著增加 ( $P < 0.05$ ); 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + si-ZFAS1 组 ROCK1 mRNA 和蛋白表达显著下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 5。

### 6 miR-150 与 ROCK1 相结合并抑制 ROCK1 表达

生物信息学软件预测 miR-150 和靶基因 ROCK1 有结合位点, 见图 6A。萤光素酶报告基因实验结果显示, 在野生型萤光素酶中转入 anti-miR150 后, 萤光素酶活性显著高于 anti-NC 组的萤光素酶活性

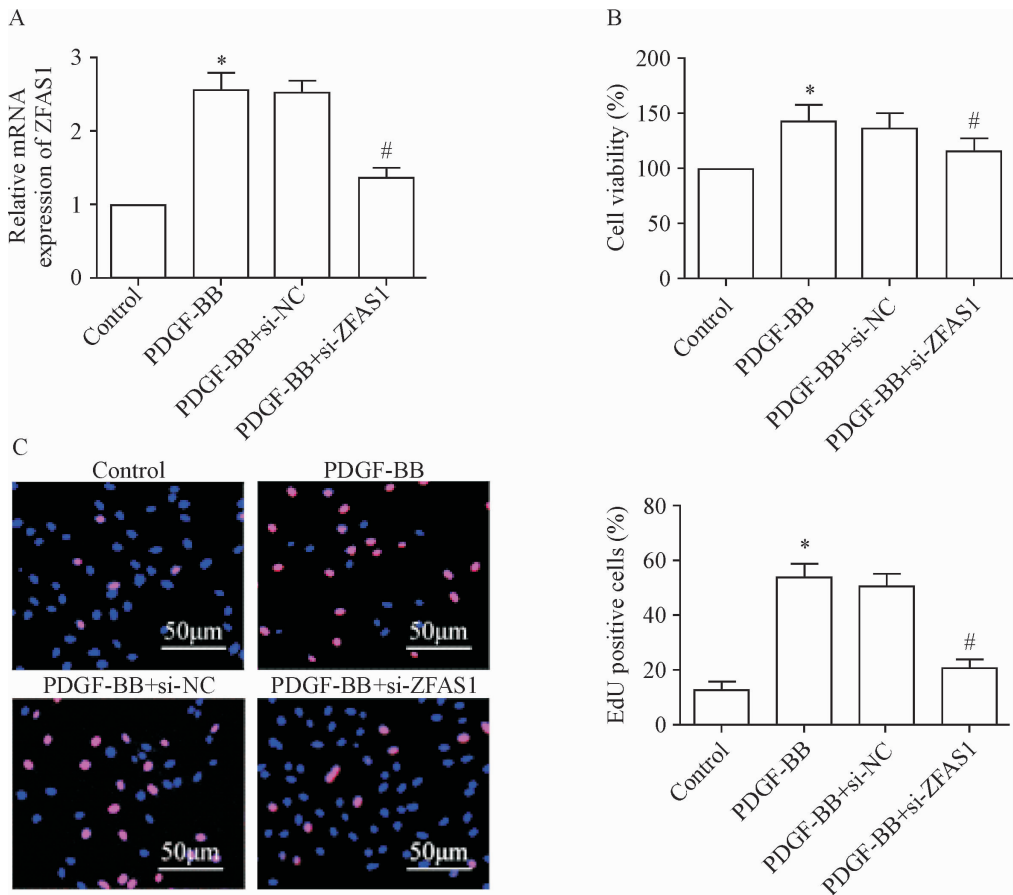


Figure 2. si-ZFAS1 inhibited PDGF-BB-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. A: the mRNA expression of ZFAS1 was detected by real-time PCR; B: the cell viability was detected by MTT assay; C: the cell proliferation was detected by EdU staining. The nucleus is blue and the EdU is red. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs PDGF-BB group.

图2 si-ZFAS1 抑制 PDGF-BB 诱导的血管平滑肌细胞增殖

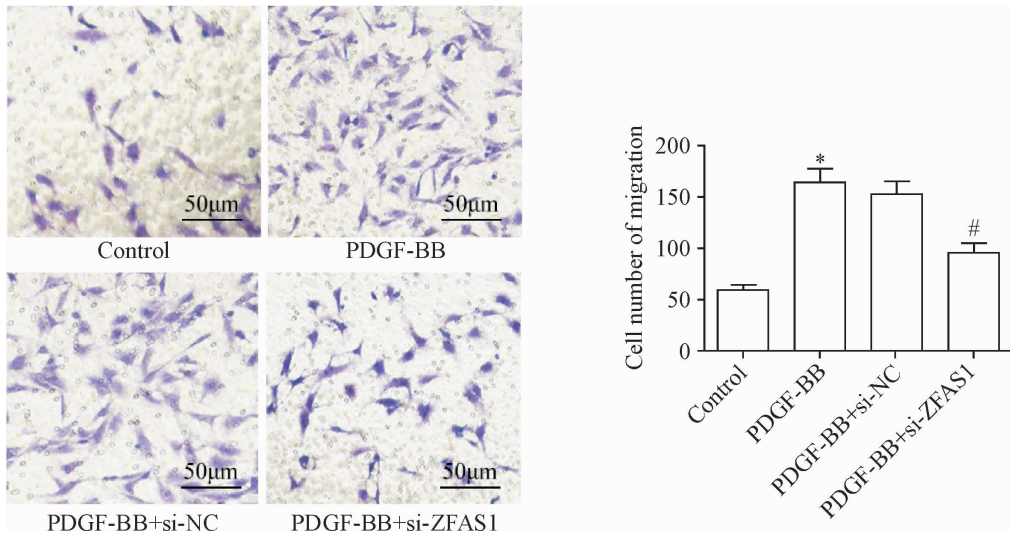


Figure 3. si-ZFAS1 inhibited PDGF-BB-induced migration of vascular smooth muscle cells. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group; #  $P < 0.05$  vs PDGF-BB group.

图3 si-ZFAS1 抑制 PDGF-BB 诱导的血管平滑肌细胞迁移

( $P < 0.05$ ); 而对于突变型荧光素酶, 2 组的荧光素酶活性无显著变化, 见图 6B。用 Western blot 实验检

测到转入 anti-miR-150 后, VSMCs 中的 ROCK1 蛋白表达水平显著上升( $P < 0.05$ ), 见图 6C。

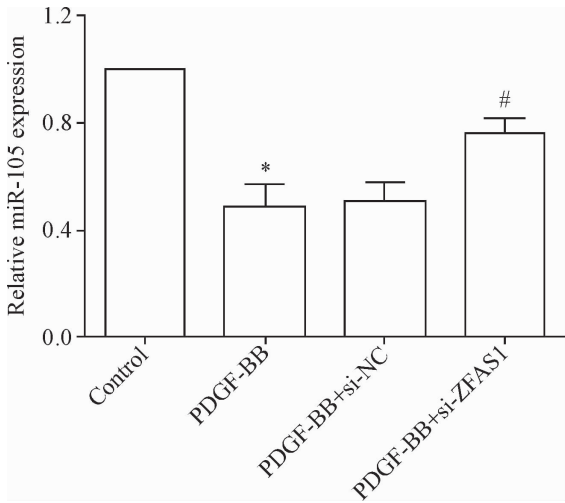


Figure 4. ZFAS1 down-regulated the expression of miR-150. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs PDGF-BB group.

图4 ZFAS1 下调 miR-150 的表达

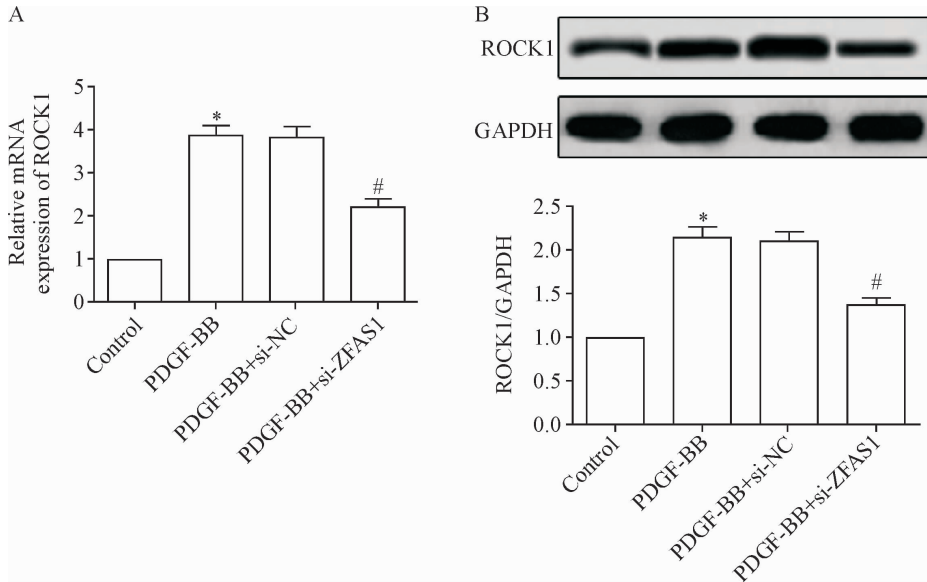


Figure 5. ZFAS1 up-regulated the expression of ROCK1. A: the mRNA expression of ROCK1 was detected by real-time PCR; B: the protein expression of ROCK1 was detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs PDGF-BB group.

图5 ZFAS1 上调 ROCK1 的表达

## 讨论

VSMCs 的增殖和迁移是动脉粥样硬化的重要机制之一,抑制 VSMCs 增殖和迁移可以延缓动脉粥样硬化进展。本研究通过 PDGF-BB 诱导 VSMCs 增殖和迁移,显示增殖和迁移的 VSMCs 中 ZFAS1 的表达上调,而下调 ZFAS1 后,VSMCs 的增殖和迁移受到抑制。这些结果表明 ZFAS1 在动脉粥样硬化中起着促进 VSMCs 增殖和迁移的作用。

ZFAS1 作为新的 lncRNA 在乳腺癌患者中被首次报道,随后被报道在多种肿瘤中扮演致癌基因角

## 7 ZFAS1 通过调节 miR-150/ROCK1 调控 VSMCs 增殖和迁移

用 Starbase 和 TargetScan 软件分析得到,ZFAS1 和 ROCK1 与 miR-150 具有相同的结合位点,见图 7A。用 real-time PCR 检测加入 anti-miR-150 的 VSMCs 中的 miR-150 表达水平,结果显示,与 PDGF-BB + si-ZFAS1 组相比,PDGF-BB + si-ZFAS1 + anti-miR-150 组中 miR-150 表达显著下降( $P < 0.05$ ),见图 7B。进一步用 real-time PCR 检测 ROCK1 mRNA 表达,结果显示,与 PDGF-BB + si-ZFAS1 组相比,PDGF-BB + si-ZFAS1 + anti-miR-150 组中 ROCK1 mRNA 表达显著上调( $P < 0.05$ ),见图 7C。此外,与 PDGF-BB + si-ZFAS1 组相比,PDGF-BB + si-ZFAS1 + anti-miR-150 组中 VSMCs 增殖和迁移能力显著增强( $P < 0.05$ ),见图 7D ~ F。

色<sup>[6]</sup>。近年来 ZFAS1 在心血管疾病中的作用也被报道。已有研究报道 ZFAS1 可以作为急性心肌梗死的独立预测因子<sup>[7]</sup>。Wu 等<sup>[8]</sup>报道 ZFAS1/miR-150 轴通过调节 CRP 参与急性心肌梗死诱导的心肌细胞凋亡的分子机制。lncRNA 可以作为竞争性内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 与 miRNA 相互作用,参与调控靶基因的表达,在心血管疾病的发生发展中起重要作用<sup>[9]</sup>。lncRNA TUG1 在自发性高血压大鼠的主动脉中高表达,TUG1 通过调控 miR-145/FGF10 促进 VSMCs 在高血压状态下的增殖和迁移<sup>[10]</sup>。Ahmed 等<sup>[11]</sup>表明 lncRNA NEAT1 促进 VSMCs

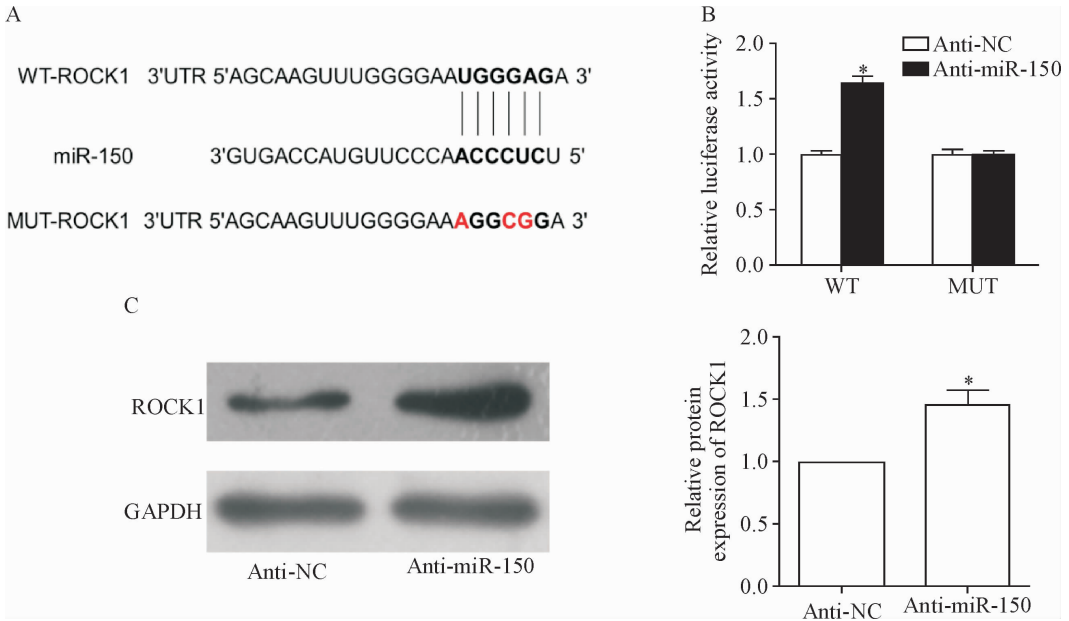


Figure 6. miR-150 bound to the 3'-UTR of ROCK1 and regulated the protein level of ROCK1 in VSMCs. A: the binding sites of miR-150 on the ROCK1 mRNA 3'-UTR; B: the relative luciferase activity was detected by dual-luciferase reporter assay; C: the expression of ROCK1 protein was detected by Western blot. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs anti-NC group.

图 6 miR-150 靶向调控 ROCK1 的表达

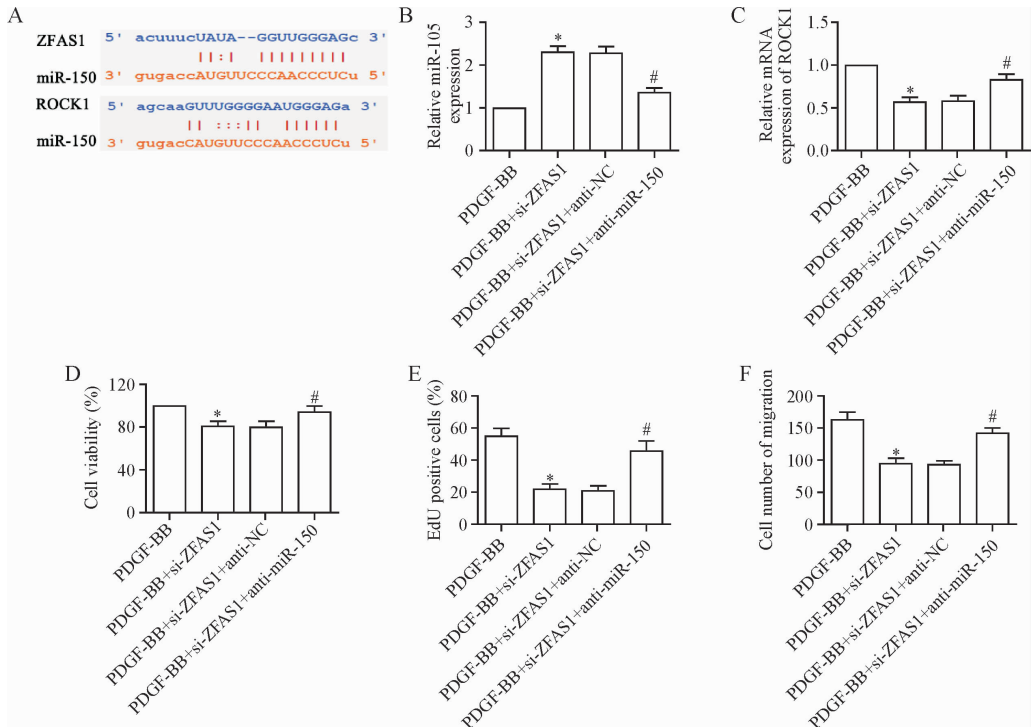


Figure 7. ZFAS1 regulated proliferation and migration of VSMCs by regulating miR-150/ROCK1. A: bioinformatic analysis for the binding sites of ZFAS1 or ROCK1 to miR-150; B: the expression of miR-150 was detected by RT-PCR; C: the expression of ROCK1 mRNA was detected by RT-PCR; D: the VSMC viability was detected by MTT assay; E: the VSMC proliferation was detected by EdU staining; F: the VSMC migration was detected by Transwell assay. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs PDGF-BB group; #  $P < 0.05$  vs PDGF-BB + si-ZFAS1 group.

图 7 ZFAS1 通过调节 miR-150/ROCK1 调控 VSMCs 增殖和迁移

增殖和迁移。本研究观察到 ZFAS1 促进 VSMCs 增殖和迁移,但是,ZFAS1 在动脉粥样硬化中对 VSMCs

的具体作用尚未报道,ZAFS1 可以下调 miR-150 的表达同时上调 ROCK1 的蛋白表达水平,进一步通过

生物信息学检测到 ZFAS1 和 miR-150 具有结合位点,揭示 ZFAS1 或许是通过调节 miR-150/ROCK1 轴参与动脉粥样硬化的发展。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源性小的非编码 RNA 分子,通过结合靶基因,降解靶基因 mRNA 或者抑制靶基因 mRNA 的翻译,从而在转录后水平调控基因的表达<sup>[12]</sup>。miRNA 在细胞分化、增殖、迁移和凋亡中起关键作用,参与各种疾病的发展,包括心血管疾病,并被作为临床诊断和治疗靶点来研究<sup>[13]</sup>。miR-214 通过抑制靶基因 *NCKAP1* 表达抑制 VSMCs 增殖和迁移<sup>[14]</sup>。miR-132 通过调控靶基因 *PTEN* 表达降低 VSMCs 增殖和迁移<sup>[15]</sup>。ROCK 是丝氨酸苏氨酸蛋白激酶,调节肌动蛋白细胞骨架,已有越来越多的研究证据表明 ROCK1 在心血管系统中扮演重要作用<sup>[16]</sup>。ROCK1 缺乏可抑制巨噬细胞趋化,减少修饰 LDL 摄取和防止泡沫细胞形成从而减轻动脉粥样硬化<sup>[17]</sup>。miR-145 通过调控 ROCK1 减轻高糖导致的 VSMCs 增殖和迁移<sup>[18]</sup>。本研究通过生物信息学检测到 *ROCK1* 是 miR-150 的靶基因,并用萤光素酶报告基因实验证实了靶向关系,并进一步观察到在 VSMCs 中抑制 ZFAS1 后,anti-miR-150 可以上调 ROCK1 表达,促进 VSMCs 的增殖迁移,由此可以推测 ZFAS1 可能通过抑制 miR-150 表达促进 VSMCs 增殖和迁移。

综上所述,本研究明确了 ZFAS1 通过调控 miR-150/ROCK1 促进 VSMCs 增殖和迁移。这表明抑制 ZFAS1 表达可能是防治动脉粥样硬化的新靶点。但是,关于 ZFAS1 是否在动脉粥样硬化动物体内发挥相关作用及其具体机制尚不清楚,仍需进一步深入研究。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis[J]. *J Cell Biol*, 2015, 209(1): 13-22.
- [2] Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 692-702.
- [3] Wang Y, Song X, Li Z, et al. Long non-coding RNAs in coronary atherosclerosis[J]. *Life Sci*, 2018, 211: 189-197.
- [4] Chen X, Zeng K, Xu M, et al. SP1-induced lncRNA-ZFAS1 contributes to colorectal cancer progression via the miR-150-5p/VEGFA axis[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 982.
- [5] Zhang Y, Jiao L, Sun L, et al. LncRNA ZFAS1 as a SERCA2a inhibitor to cause intracellular Ca<sup>2+</sup> overload and contractile dysfunction in a mouse model of myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2018, 122(10): 1354-1368.
- [6] He A, He S, Li X, et al. ZFAS1: a novel vital oncogenic lncRNA in multiple human cancers [J]. *Cell Prolif*, 2018, 52(1): e12513.
- [7] Zhang Y, Sun L, Xuan L, et al. Reciprocal changes of circulating long non-coding RNAs ZFAS1 and CDR1AS predict acute myocardial infarction[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22384.
- [8] Wu T, Wu D. Knockdown of long non-coding RNA-ZFAS1 protects cardiomyocytes against acute myocardial infarction via anti-apoptosis by regulating miR-150/CRP [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(10): 3281-3289.
- [9] Viereck J, Thum T. Circulating noncoding RNAs as biomarkers of cardiovascular disease and injury [J]. *Circ Res*, 2017, 120(2): 381-399.
- [10] Shi L, Tian C, Sun L, 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.
- [11] Ahmed ASI, Dong K, Liu J, et al. Long noncoding RNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) is critical for phenotypic switching of vascular smooth muscle cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(37): E8660- E8667.
- [12] Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA regulation of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 703-720.
- [13] Nazari-Jahantigh M, Egea V, Schober A, et al. MicroRNA-specific regulatory mechanisms in atherosclerosis[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 89(Pt A): 35-41.
- [14] Afzal TA, Luong LA, Chen D, et al. NCK associated protein 1 modulated by miRNA-214 determines vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and neointima hyperplasia[J]. *J Am Heart Assoc*, 2016, 5(12): e004629.
- [15] Chen WJ, Chen YH, Hsu YJ, et al. MicroRNA-132 targeting *PTEN* contributes to cilostazol-promoted vascular smooth muscle cell differentiation [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 274: 1-7.
- [16] Liao JK, Seto M, Noma K. Rho kinase (ROCK) inhibitors[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(1): 17-24.
- [17] Wang HW, Liu PY, Oyama N, et al. Deficiency of ROCK1 in bone marrow-derived cells protects against atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice [J]. *FASEB J*, 2008, 22(10): 3561-3570.
- [18] Chen M, Zhang Y, Li W, et al. MicroRNA-145 alleviates high glucose-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells through targeting ROCK1 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 99: 81-86.