

• 论 著 •

长链非编码 RNA TTN-AS1 通过 miR-3928 调节 p38MAPK 参与宫颈癌进展的机制研究

刘晓娟,谢双双,张 晶,康燕华[△]
河北北方学院附属第一医院妇产科,河北张家口 075002

摘 要:**目的** 探究长链非编码 RNA(LncRNA)TTN-AS1 通过 miR-3928 调节 p38MAPK 参与宫颈癌进展的机制。**方法** 分析肿瘤基因组图谱数据库中宫颈癌患者 TTN-AS1 水平与 MAPK14 水平和患者生存之间的关系。双荧光素酶报告验证靶向关系。通过转染 miR-3928 模拟物和 TTN-AS1 构建 miR-3928 和/或 TTN-AS1 过表达的细胞模型,分析其对细胞生物学行为的影响。**结果** 高水平的 TTN-AS1 的宫颈癌患者具有更短的无进展生存期($P<0.05$)。TTN-AS1 的水平与 MAPK14 的转录水平呈正相关($r=0.320, P<0.05$)。TTN-AS1 通过抑制 miR-3928 促进 p38MAPK 的表达,并促进增殖、迁移、侵袭和抑制凋亡。**结论** TTN-AS1 可通过直接靶向作用于 miR-3928 上调 p38MAPK 的水平发挥参与宫颈癌进展的作用。

关键词:宫颈癌; 长链非编码 RNA; TTN-AS1; p38MAPK
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.05.023 **中图法分类号:**R737.33
文章编号:1673-4130(2021)05-0616-05 **文献标志码:**A

Long non-coding RNA TTN-AS1 regulates p38MAPK through miR-3928 to promote cervical cancer progression
LIU Xiaojuan, XIE Shuangshuang, ZHANG Jing, KANG Yanhua[△]
Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075002, China

Abstract:**Objective** To explore the mechanism by which LncRNA TTN-AS1 regulates p38MAPK to promote cervical cancer progression through miR-3928. **Methods** To analyze the relationship between TTN-AS1 and MAPK14 levels in cervical cancer patients in the TCGA database and patient survival. The dual luciferase report verified the targeting relationship. A cell model of miR-3928 and/or TTN-AS1 overexpression was constructed by transfecting mimic and TTN-AS1 to analyze its effect on cell biological behavior. **Results** Cervical cancer patients with high levels of TTN-AS1 had a shorter progression-free survival ($P<0.05$). The level of TTN-AS1 was positively correlated with the transcription level of MAPK14 ($r=0.320, P<0.05$). TTN-AS1 promotes the expression of p38MAPK by inhibiting miR-3928, and promotes proliferation, migration, invasion and inhibits apoptosis. **Conclusion** TTN-AS1 can directly target miR-3928 to up-regulate the level of p38MAPK to promote cervical cancer.

Key words:cervical cancer; long non-coding RNA; TTN-AS1; p38MAPK

尽管新的诊断技术和治疗方法不断被应用于临床,但是宫颈癌患者的预后仍然不令人满意。研究发现宫颈癌的转移和复发是引起宫颈癌患预后不佳的主要因素,p38MAPK 由 MAPK14 基因编码,是引起宫颈癌进展、转移的重要蛋白^[1],但是其具体的调控机制尚不完全明确。最新研究证实了微小 RNA(miRNA)与肿瘤发生和发展密切相关,miRNA 可通过直接靶向靶基因的信使 RNA(mRNA)诱导其讲解或转录抑制,从而转录后水平上调节基因的表达从而参与肿瘤的发展^[2]。miR-3928 是近年来新发现的与

肿瘤相关的 miRNA,有研究发现下调 miR-3928 的水平可以促进骨肉瘤的进展,提示 miR-3928 具有抑癌作用^[3],但是 miR-3928 在宫颈癌中的作用尚不清楚。此外,miRNA 的靶向作用又被长链非编码 RNA(LncRNA)的靶向调控,LncRNA 会像“海绵”一样吸附 miRNA 从而调控靶基因的表达^[4]。最新研究发现 TTN-AS1 可通过靶向 miR-4677-3p 促进 ZEB1 基因的表达,从而发挥促进肺腺癌细胞迁移和侵袭^[5]。本研究主要分析 RNA TTN-AS1 通过 miR-3928 调节 p38MAPK 参与宫颈癌进展的机制。

作者简介:刘晓娟,女,副主任医师,主要从事妇科肿瘤研究。 [△] 通信作者,E-mail:467483874@qq.com。
本文引用格式:刘晓娟,谢双双,张晶,等.长链非编码 RNA TTN-AS1 通过 miR-3928 调节 p38MAPK 参与宫颈癌进展的机制研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(5):616-620.

1 材料与方法

1.1 材料 人宫颈癌细胞系 CasKi(ATCC 公司,美国)。DMEM 培养基(Invitrogen 公司,美国)。miR-3928 类似物(mimic)、TTN-AS1 和 p38MAPK 过表达质粒及相应的阴性对照(NC)(Thermo Fisher 公司,美国)。Lipofectamine 2000(Invitrogen 公司,美国)。双荧光素酶报告试剂盒和相应的荧光检测仪(Promega 公司,美国)。细胞计数试剂盒-8(CCK-8)试剂盒(Beyotime 生物技术有限公司,中国)。凋亡检测试剂盒和 FACSCalibur™ 流式细胞仪(BD Biosciences 公司,美国)。Transwell 小室和基质凝胶(BD Biosciences 公司,美国)。PCR 引物由 Genewiz 公司(中国)设计和合成。Trizol 试剂(Invitrogen 公司,美国)。逆转录 cDNA 试剂盒和 SYBR Green PCR Master Mix qPCR 试剂盒(Roche 公司,瑞士)。ABI 7500 PCR 检测系统(Life technology 公司,美国)。放射免疫沉淀法(RIPA)裂解缓冲液(Beyotime 公司,中国)。二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂盒和电化学发光(ECL)试剂盒(北京 Applygen 公司,中国)。p38MAPK、3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体和二抗(Abcam 公司,美国)。聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 生物信息学分析 通过工具网站 GEPIA 分析肿瘤基因组图谱(TCGA)数据库的宫颈癌患者 TTN-AS1 水平与宫颈癌进展情况和与 MAPK14 水平之间的关系。预测 TTN-AS1 靶向 miR-3928 和 miR-3928 靶向 p38MAPK 的结合位点。

1.3 双荧光素酶报告实验 将细胞分为对照组和 miR-3928 模拟组(mimic 组),并分别通过质粒转染 NC 和 miR-3928mimic。在验证 miR-3928 靶向 p38MAPK 时,分别将野生型的 p38MAPK(p38MAPK-wt)或突变的 p38MAPK(p38MAPK-mut)克隆到 pMIR-REPORT 荧光素酶载体中。然后分别通过实时荧光定量聚合酶链反应(qPCR)或蛋白质免疫印迹法(Westernblot)检测各组 miR-3928 和 p38MAPK 的水平。

在验证 TTN-AS1 时靶向 miR-3928 时,分别将 TTN-AS1-wt 和 TTN-AS1-mut 克隆到 pMIR-REPORT 荧光素酶载体中。将 CasKi 细胞接种在 6 孔板中,然后使用 Lipofectamine 2000 将克隆和突变的序列转染至细胞中。使用荧光素酶报告检测仪评估荧光素酶活性。

1.4 qPCR 检测 TTN-AS1、miR-3928 和 p38MAPK mRNA 通过 Trizol 获得细胞中总 RNA,然后验总 RNA 的纯度和浓度。使用 cDNA 试剂盒将 1 μ g RNA 逆转录合成 cDNA(42 $^{\circ}$ C 下 60 min,70 $^{\circ}$ C 下 5 min,然后 4 $^{\circ}$ C 保存)。使用 SYBR Green PCR Master

Mix 进行 qPCR 实验(在 95 $^{\circ}$ C 10 min,40 个循环,94 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C/1 min,60 $^{\circ}$ C 1 min,4 $^{\circ}$ C 保存)。GAPDH 作为 mRNA 和 LncRNA 的内参,U6 作为 miRNA 的内参,通过比较循环阈值($\Delta\Delta C_t$)用于分析 RNA 的表达。

1.5 Westernblot 检测 p38MAPK 蛋白的表达 在液氮下将细胞研磨,在液氮保护下使用 RIPA 裂解缓冲液裂解,并使用 BCA 蛋白测定试剂盒测量总蛋白含量。然后使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离等量的总蛋白(120 V 下电泳 90 min),然后转移到 PVDF 膜上(50 V,120 min),在含有 5% 脱脂牛奶的封闭溶液中封闭。然后将 PVDF 膜与一抗(1:1 000 稀释)在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,然后加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)偶联二抗在室温下孵育 1 h。使用 ECL 试剂盒可视化蛋白条带,并使用 ImagePD 软件使用 GAPDH 作为内参对蛋白条带的灰度进行定量。

1.6 细胞培养、分组和转染 将 CasKi 细胞在 DMEM 培养基中培养,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂,相对湿度 100%。将细胞分为 4 组,即对照组、mimic 组、mimic+TTN-AS1 组和 TTN-AS1 组。使用 Lipofectamine 2000 试剂盒进行瞬时转染,其中 mimic 组和 mimic+TTN-AS1 组通过转染 miR-3928 mimic 质粒以过表达 miR-3928,mimic+TTN-AS1 组和 TTN-AS1 组转染 p38MAPK 质粒过表达 p38MAPK。对照组转染两种 NC 质粒,在转染 24 h 后收集细胞进行后续试验。

1.7 CCK-8 检测细胞活力 将细胞接种于 96 孔板(每孔 2×10^4 个细胞,100 μ L),在培养第 48 h 加入 10 μ L CCK-8 试剂并在 37 $^{\circ}$ C 下培养,通过酶标仪检测 450 nm 处的吸光度计算相对细胞活力。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡率 将细胞消化后重悬,在 2×10^5 个细胞中分别加入异硫氰酸荧光素(FITC) Annexin V 和 7-氨基放线菌素 D(7-AAD)各 10 μ L 和 5 μ L,然后分别室温、避光下分别孵育 15 min,然后通过进行流式细胞术,通过配套 Cell Quest 软件分析凋亡率。

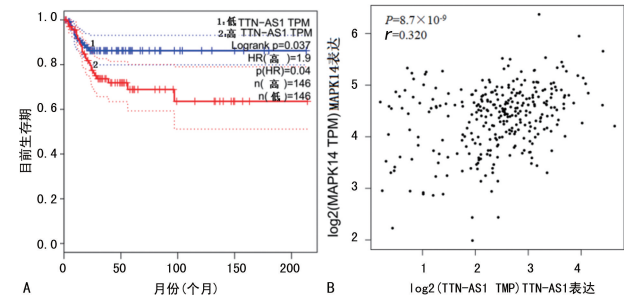
1.9 荷瘤裸鼠实验 在 Transwell 小室的上室加入基质胶,底室加入完全培养基,然后将 2×10^4 个细胞加入至上室培养 48 h。48 h 后洗去未侵入底室的细胞。然后将细胞使用 20% 甲醇固定,并用 0.2% 结晶紫染色。在倒置显微镜下计数每个视野侵入底部室的细胞数目。

1.10 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。所有试验设立 3 个复孔,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。进行单因素方差分析,两两比较使用 t 检验。 $P <$

0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 生物信息学分析结果 在 TCGA 数据库中,根据 GEPIA 的分析结果,发现高水平的 TTN-AS1 的宫颈癌患者具有更短的无进展生存期($P<0.05$),并且 TTN-AS1 的水平与 MAPK14 的转录水平呈正相关($r=0.320, P<0.05$)。见图 1。



注:A 为 GEPIA 数据库中 TTN-AS1 表达与宫颈癌患者无进展生存期的相关性;B 为 GEPIA 数据库中 TTN-AS1 表达与 MAPK14 表达的相关性;TPM 为每千个碱基的转录每百万映射读取的 Transcripts;HR 为生存资料的效应量,比较一段时间内的风险。

图 1 TTN-AS1 与宫颈癌患者无进展生存期和 MAPK14 的相关性

2.2 TTN-AS1 直接靶向 miR-3928 TTN-AS1 靶向 miR-3928 的结合位点见图 2。然后通过双荧光霉素试验结果验证了同时转染 NC+TTN-AS1-wt 和 NC+TTN-AS1-mut 的细胞的荧光酶素活性分别为 (1.00 ± 0.09)、(1.04 ± 0.12),与 miR-3928 mimic+TTN-AS1-mut 比较(0.98 ± 0.16),miR-3928 mimic+TTN-AS1-wt 细胞的荧光酶素活性显著降低(0.34 ± 0.04),差异有统计学意义($P<0.05$),说明 TTN-AS1 直接靶向 miR-3928。

2.3 miR-3928 靶向抑制 p38MAPK 的表达 miR-3928 靶向 p38MAPK 的结合位点:MAPK14 (位置

6589-6595) 的碱基序列 5' agccaacuggg-gagaGAGCUUCu.....3'与 miR-3928 的碱基序列 3'-cguccgccuuggaauCUCGAAG-5'具有结合位点。然后通过双荧光霉素实验结果验证了同时转染 NC+p38MAPK-wt 和 NC+p38MAPK-mut 的细胞的荧光酶素活性分别为 (1.00 ± 0.07)、(1.02 ± 0.15),与 miR-3928 mimic+p38MAPK-mut 比较 (0.95 ± 0.12),miR-3928 mimic+p38MAPK-wt 细胞的荧光酶素活性显著降低(0.350 ± 0.045),差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步研究也发现,与对照组[分别为 (3.36 ± 0.31)、(2.83 ± 0.34)]比较,转染 miR-3928mimic 后,细胞中 p38MAPKmRNA 和蛋白的水平降低[分别为 (0.83 ± 0.08)、(1.27 ± 0.14)],差异有统计学意义($P<0.05$)。



图 2 TTN-AS1 直接靶向 miR-3928 的结合位点

2.4 各组细胞中 TTN-AS1、miR-3928、p38MAPK mRNA 和蛋白的水平 mimic 组 miR-3928 水平高于对照组,TTN-AS1、p38MAPK mRNA 和蛋白水平低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。TTN-AS1 组 miR-3928 水平低于对照组,TTN-AS1、p38MAPK mRNA 和蛋白水平高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。mimic+TTN-AS1 组 miR-3928 水平低于 mimic 组,TTN-AS1、p38MAPK mRNA 和蛋白水平高于 mimic 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。miR-3928 对 p38MAPK 的抑制作用被 TTN-AS1 阻断,见表 1。

表 1 各组细胞中 TTN-AS1、miR-3928、p38MAPK mRNA 和蛋白的水平比较

组别	TTN-AS1	miR-3928	p38MAPKmRNA	p38MAPK 蛋白
对照组	3.04±0.30	0.81±0.08	3.45±0.29	2.91±0.31
mimic 组	1.57±0.11 *	11.36±0.72 *	0.86±0.08 *	1.26±0.12 *
mimic+TTN-AS1 组	27.46±2.93 #	0.85±0.08 #	3.82±0.39 #	3.11±0.35 #
TTN-AS1 组	34.86±2.40 *	0.24±0.03 *	6.03±0.71 *	4.78±0.55 *

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 mimic 组比较,# $P<0.05$ 。

2.5 各组细胞的细胞生长和凋亡情况比较 mimic 组的细胞活力显著低于对照组,凋亡率高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),TTN-AS1 组的细胞活力高于对照组,细胞凋亡率低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),并且 mimic+TTN-AS1 组的细胞活力高于 mimic 组,细胞凋亡率低于 mimic 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。过表达 TTN-AS1 会阻断 miR-3928 对细胞生长的抑制作用和对凋亡的促进

作用,见表 2、图 3。

表 2 各组细胞的相对细胞活力和凋亡率比较

组别	相对细胞活力	凋亡率(%)
对照组	100.00±1.78	5.20±0.16
mimic 组	90.10±2.04 *	27.97±1.55 *
mimic+TTN-AS1 组	101.36±2.67 #	10.84±1.47 #
TTN-AS1 组	113.93±2.36 *	4.67±0.11 *

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 mimic 组比较,# $P<0.05$ 。

2.6 各组细胞侵袭能力比较 mimic 组的细胞侵袭能力 $[(20.37 \pm 2.08)$ 个]低于对照组 $[(37.67 \pm 3.57)$ 个],差异有统计学意义($P < 0.05$),TTN-AS1 组的细胞侵袭能力 $[(57.86 \pm 3.98)$ 个]高于对照组 $[(37.67 \pm 3.57)$ 个],差异有统计学意义($P < 0.05$),

并且 mimic + TTN-AS1 组的细胞侵袭能力 $[(39.40 \pm 3.14)$ 个]高于 mimic 组 $[(20.37 \pm 2.08)$ 个],差异有统计学意义($P < 0.05$)。过表达 TTN-AS1 会部分逆转 miR-3928 对细胞侵袭的抑制作用,见图 4。

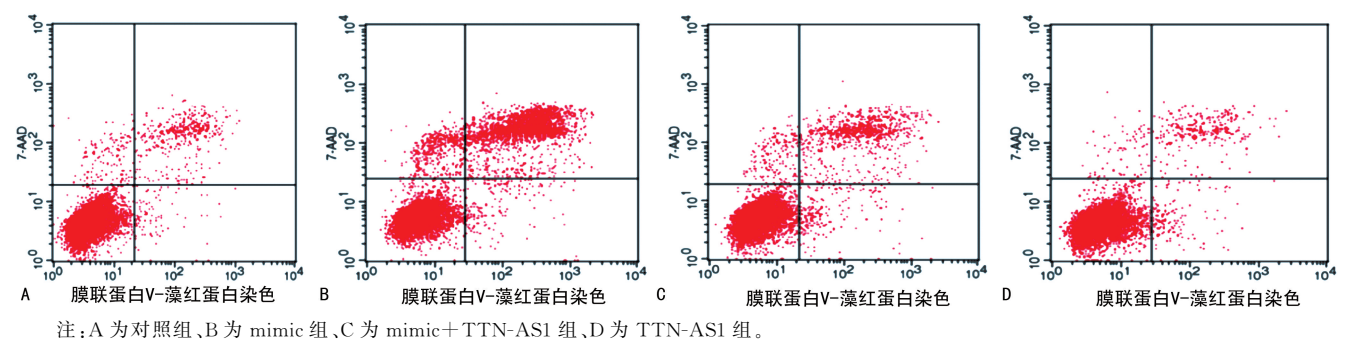
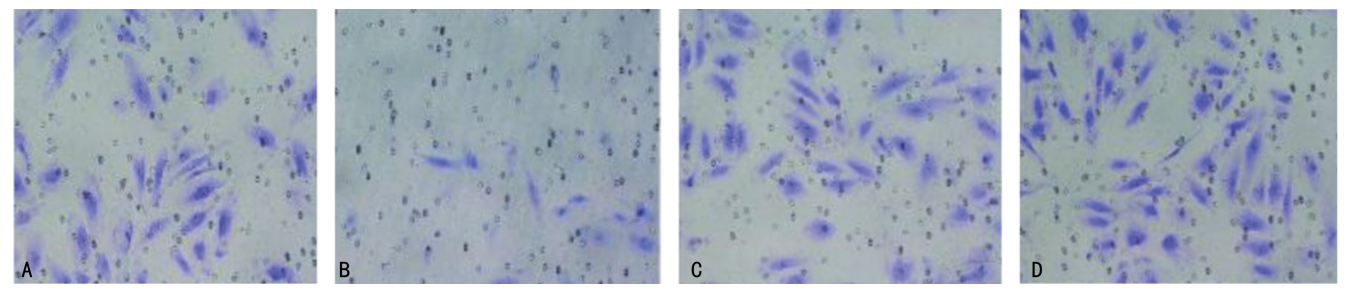


图 3 流式细胞术检测各组细胞凋亡率



注:A 为对照组、B 为 mimic 组、C 为 mimic+TTN-AS1 组、D 为 TTN-AS1 组。

图 4 Transwell 法检测各组细胞亲侵袭能力

3 讨 论

宫颈癌是女性最常见的恶性肿瘤之一,根据最近的统计报告,2018 年宫颈癌新病例数为 569 847 例, 占有肿瘤的 3.2%。并且 2018 年死于宫颈癌的患者共有 311 365 例,占有恶性肿瘤的 3.3%^[6]。虽然许多早期诊断宫颈癌的新生物标志物被发现,并且靶向药物、免疫疗法等新的治疗手段被不断地应用于宫颈癌的治疗,但由于肿瘤的转移、复发和获得性耐药的发生,仍有一部分患者不能取得较好的预后^[7]。探究宫颈癌转移的分子机制提高是发展新的诊断和治疗策略的基础。

抑癌基因和促癌基因的异常低表达和过表达是导致肿瘤发生和进展的主要机制,p38MAPK 蛋白最初在炎症和应激反应中发现,后来被认为是一种与肿瘤相关的蛋白^[8]。在宫颈癌中,p38MAPK 发挥促癌作用,激活 p38MAPK 相关通路会促进肿瘤细胞迁移和侵袭,是宫颈癌转移的分子机制之一^[9]。并且 p38MAPK 蛋白的表达会受到 miRNA 的靶向调节,miR-374b 可通过抑制 p38MAPK 抑制宫颈癌细胞的增殖并促进凋亡^[10]。HE 等^[11] 研究结果显示人类早期上皮祖细胞增殖能力的升高伴随着 miR-3928 水平的降低,提示 miR-3928 具有抑制细胞增殖的作用。XIA 等^[12] 发现肺组织中 miR-3928 的表达水平与肺

鳞状细胞癌患者的恶性表型和不良预后有关。并且 miR-3928 可具有直接靶向抑制 Dicer 蛋白表达的作用^[13]。本研究预测并验证了 miR-3928 可直接靶向抑制 p38MAPK 的表达。

miRNA 靶向 mRNA 的过程受到 LncRNA 的靶向调控。LncRNA 是一类长链 RNA,其长度超过 200 个核苷酸,不具有蛋白质翻译功能。LncRNA 可以通过竞争内源性 RNA 的方式作为“海绵”“吸附”miRNA,从而调节 miRNA 在 mRNA 降解和翻译中的作用^[14]。LncRNA 通过靶向 miRNA 调节靶基因表达也是调节肿瘤细胞发生和发展的机制之一。本研究结果显示发现高水平的 TTN-AS1 的宫颈癌患者具有更短的无进展生存期,并且 TTN-AS1 的水平与 MAPK14 的转录水平正相关。并且也进一步验证了 TTN-AS1 与 miR-3928 之间存在靶向关系。TTN-AS1 在多种肿瘤中发挥促癌作用,包括口腔鳞状细胞癌、肺腺癌及前列腺癌等^[15-17]。本研究结果显示过表达 TTN-AS1 会显著抑制 miR-3928 的水平,促进 p38MAPK 的表达,并阻断 miR-3928 对 p38MAPK 的抑制作用。过表达 miR-3928 明显降低了细胞活力和细胞侵袭能力。而 TTN-AS1 能够上调细胞活力和细胞侵袭能力,抑制细胞凋亡。过表达 TTN-AS1 会显著阻断 miR-3928 对细胞生长、侵袭的抑制作用和

对细胞凋亡的促进作用。FU 等^[18] 研究显示 TTN-AS1 可通过靶向抑制 miR-134-5p 促进 MBTD1 的表达并抑制骨肉瘤细胞的凋亡和促进耐药。JIA 等^[19] 发现 TTN-AS1 可通过靶向 miR-142-5p/CDK5 促进肺癌细胞的迁移和侵袭。本研究结果显示在宫颈癌中,TTN-AS1 通过靶向 miR-3928 促进细胞生长和侵袭,抑制凋亡。

综上所述,miR-3928 靶向抑制 p38MAPK 的表达,TTN-AS1 可通过直接靶向 miR-3928 上调 p38MAPK 的水平。TTN-AS1 通过靶向调控 miR-3928/p38MAPK 促进 CasKi 细胞的增殖和侵袭并抑制凋亡。关于 TTN-AS1 和 miR-3928 在宫颈癌患者中的临床意义值得进一步研究,关于 TTN-AS1 和 miR-3928 通过 p38MAPK 调节宫颈癌进展的作用尚待进一步的体内研究。

参考文献

[1] HSIEH W T, LIN H Y, CHEN J H, et al. Latex of *Euphorbia antiquorum*-induced S-phase arrest via active ATM kinase and MAPK pathways in human cervical cancer HeLa cells[J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30 (10): 1205-1215.

[2] HATA A, KASHIMA R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2016, 51(3):121-134.

[3] XU H, LIU X, ZHAO J. Down-regulation of miR-3928 promoted osteosarcoma growth [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33(5):1547-1556.

[4] HAUPTMAN N, GLAVAC D. Long non-coding RNA in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(3):4655-4669.

[5] ZHONG Y B, WANG J, LV W, et al. LncRNA TTN-AS1 drives invasion and migration of lung adenocarcinoma cells via modulation of miR-4677-3p/ZEB1 axis[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10):17131-17141.

[6] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6):394-424.

[7] MENDIVIL A A, RETTENMAIER M A, ABAID L N, et al. Survival rate comparisons amongst cervical cancer patients treated with an open, robotic-assisted or laparoscopic radical hysterectomy: a five year experience [J]. *Surg Oncol*, 2016, 25(1):66-71.

[8] ZHONG W F, WANG X H, PAN B, et al. Eupatilin induces human renal cancer cell apoptosis via ROS-mediated MAPK and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(4):2894-2897.

[9] MINJUAN F, YIDONG W, KUNLUN C, et al. IL-17A promotes the migration and invasiveness of cervical cancer cells by coordinately activating MMPs expression via the p38/NF- κ B signal pathway [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (9):e108502.

[10] LI G C, CAO X Y, LI Y N, et al. MicroRNA-374b inhibits cervical cancer cell proliferation and induces apoptosis through the p38/ERK signaling pathway by binding to JAM-2[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9):7379-7390.

[11] HE T R, SUN R H, LI Y, et al. Effects of brain-derived neurotrophic factor on microRNA expression profile in human endothelial progenitor cells[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(6):1005-1009.

[12] XIA E, KANEMATSU S, SUENAGA Y, et al. MicroRNA induction by copy number gain is associated with poor outcome in squamous cell carcinoma of the lung[J]. *Sci Rep*, 2018, 18, 8(1):15363-15364.

[13] CHANG L, HU W, YE C, et al. miR-3928 activates ATR pathway by targeting dicer[J]. *RNA Biol*, 2012, 9 (10): 1247-1254.

[14] CHEN X, MA C, CHEN C, et al. Integration of lncRNA-miRNA-mRNA reveals novel insights into oviposition regulation in honey bees[J]. *Peer J*, 2017, 5 (1): 3881-3883.

[15] LIN C, ZHANG N, WANG Y, et al. Functional role of a novel long noncoding RNA TTN-AS1 in esophageal squamous cell carcinoma progression and metastasis[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(2):486-498.

[16] LUO J, LIU Z. Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes the progression of lung adenocarcinoma by regulating PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(1):140-147.

[17] LUO J F, XU J, ZHENG J Z. Long non-coding RNA TTN-AS1 promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis in prostatic cancer by sponging miR-193a-5p [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23 (18): 7816-7825.

[18] FU D, LU C, QU X, et al. LncRNA TTN-AS1 regulates osteosarcoma cell apoptosis and drug resistance via the miR-134-5p/MBTD1 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11 (19):8374-8385.

[19] JIA Y, DUAN Y, LIU T, et al. LncRNA TTN-AS1 promotes migration, invasion, and epithelial mesenchymal transition of lung adenocarcinoma via sponging miR-142-5p to regulate CDK5 [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (8): 573-575.