

网络出版时间:2022-04-19 14:09 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220415.1512.003.html>

miR-143 靶向作用于 TFF3 抑制前列腺癌细胞 PC3 的增殖

郭亮^{1,2},肖峻¹,陶陶¹

摘要 目的 分析 miR-143 对前列腺癌细胞 PC3 增殖和凋亡的影响。方法 实验分为未转染的 PC3 细胞 (PC3 组)、转染 miR-NC 的对照组细胞 (PC3/miR-NC 组) 和稳定表达 miR-143 的 PC3 细胞 (PC3/miR-143 组), 通过免疫荧光和 Real-time PCR 进行鉴定。利用 CCK-8 法和流式细胞术分别分析 miR-143 表达水平变化是否影响 PC3 细胞的增殖和凋亡。再使用在线分析软件预测 miR-143 的靶基因, 随后构建荧光素酶报告基因质粒, 通过荧光素酶报告基因法分析 miR-143 与靶基因的靶向结合位点。结果 在 PC3/miR-143 组中 miR-143 的表达水平高于 PC3 组 ($P < 0.01$) 和 PC3/miR-NC 组 ($P < 0.01$)。CCK-8 检测结果显示 PC3/miR-143 组细胞的增殖能力与 PC3 组 ($P < 0.05$) 和 PC3/miR-NC 组相比下降 ($P < 0.01$)。流式细胞术检测的结果显示, PC3/miR-143 组细胞的凋亡水平与 PC3 组和 PC3/miR-NC 组细胞比较增加 ($P < 0.01$)。在线分析软件预测 miR-143 能够靶向结合三叶因子 3 (TFF3) 的 3'-UTR; 双荧光素酶报告基因的结果进一步证实 miR-143 能够靶向作用于 TFF3 的 3'-UTR, Real-time PCR 的结果表明在过表达 miR-143 能够抑制 PC3 细胞中 TFF3 的表达。在稳定表达 miR-143 的 PC3 细胞中转染 TFF3 真核表达质粒能够抵消 miR-143 的作用。结论 miR-143 通过靶向作用于 TFF3 的 3'-UTR, 抑制其表达, 抑制 PC3 细胞的增殖。

关键词 前列腺癌; miR-143; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 737.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)05-0684-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.05.003

前列腺癌 (prostate cancer, PC) 是男性最常见的恶性疾病, 发病率为 3/10 000。由于世界老年化人口不断增加, 预计到 2030 年, PC 患者将超过 170 万, 新增死亡人数约为 49.9 万^[1]。目前, 分子靶向治疗已成为肿瘤研究的热点。然后, 针对已知的 PC 基因靶点的治疗没有获得满意的效果^[2]。因此, 寻找更有效的分子靶点是当前研究 PC 靶向治疗的重

2022-03-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81702540)

作者单位:¹ 安徽医科大学附属省立医院泌尿外科, 合肥 230001

² 安徽医科大学附属六安医院泌尿外科, 六安 237005

作者简介: 郭亮, 男, 硕士研究生;

肖峻, 男, 副教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xiaojunpp@126.com

要任务之一。microRNAs (miRNAs) 是一类小的非编码 RNA 分子, 参与调节多种生物学过程, 如细胞周期、细胞凋亡、器官发育、组织再生、衰老, 也参与 PC 的发病机制。已有研究^[3]证实 miR-143 在 PC 组织的表达水平低于癌旁组织, 表明 miR-143 与 PC 存在联系。但对于 miR-143 在 PC 发展中的分子机制, 目前还不清楚。该研究中分析了 PC 细胞株 PC3 中 miR-143 的表达水平, 并通过慢病毒建立稳定转染 miR-143 的 PC3 细胞, 分析 miR-143 对 PC3 细胞增殖、凋亡、侵袭和转移的影响。利用生物信息学分析 miR-143 的潜在靶基因, 并使用荧光素酶报告基因系统进行验证。以期为寻找更有效的 PC 治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人 PC3 细胞购自武汉中国典型培养物保藏中心; 胎牛血清、RPMI-1640 培养基、青链霉素液、胰蛋白酶-EDTA 消化液和 Lipofectamine 3000 均购自美国 Thermo Fisher 公司; 细胞培养箱、TRIzol reagent 购自美国赛默飞公司; miScript II RT Kit 试剂盒购自德国 Qiagen 公司; Gene Pharma Hairpin-itTM microRNA RT-PCR Quantitation Kit 购自上海吉玛基因公司; 聚凝胶、嘌呤霉素、CCK-8 检测试剂盒购自北京 Solarbio 公司; Annexin V/FITC 凋亡检测试剂盒购自上海 Beyotime Biotechnology 公司; 双荧光素酶报告基因检测系统购自美国 Promega 公司; 携带 has-miR-143 及其对照 (miR-NC) 的慢病毒购自上海汉恒生物科技有限公司; 包含 TFF3 3'-UTR 的野生型 (WT-pGL3-TFF3)、突变型 (Mut-pGL3-TFF3) 荧光素酶报告基因质粒和真核表达质粒 (pCNDA3.1-TFF3) 购自滁州通用生物技术有限公司; miR-143 mimic 及对照购自上海吉玛制药技术有限公司。ABI StepOne Plus 系统购自美国 Applied Biosystems 公司; 细胞培养箱和 NanoDropTM 1000 微量分光光度计购自美国赛默飞公司; 酶标仪购自美国 Biotek 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人 PC3 细胞使用含 10% FBS 和

1×青链霉素液的 RPMI-1640 培养基,培养于 37 ℃ 含 5% CO₂ 的培养箱中。

1.2.2 稳定转染细胞株的建立和实验分组 慢病毒感染在 24 孔板中进行,每孔接种 5×10⁴ 个 PC3 细胞,培养 16 h。用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基稀释慢病毒,同时加入终浓度为 10 mg/L 的聚凝胺,每孔加入 2 ml 稀释的病毒液使得感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 20,于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中继续培养 24 h,随后换成新鲜培养基继续培养 72 h,换成含嘌呤霉素的培养基持续培养 2 周,筛选出稳定表达 miR-143 的 PC3 细胞,记为 PC3/miR-143 组,同时筛选出感染对照慢病毒的 PC3 细胞,记为 PC3/miR-NC 组,在荧光显微镜下观察细胞是否表达绿色荧光,通过 Real-time PCR 检测细胞中 miR-143 的表达水平。以未转染的 PC3 细胞记为 PC3 组。使用 Lipofectamine 3000 将 pCNDA3.1 和 pCNDA3.1-TFF3 质粒分别转染 PC3/miR-143 组的细胞,分别记为 PC3/miR-143 + pCDNA3.1 组和 PC3/miR-143 + pCDNA3.1-TFF3 组,转染操作步骤按照说明书进行。

1.2.3 RNA 提取和 Real-time PCR 细胞中的总 RNA 通过 TRIzol reagent 提取,提取过程参考说明书进行。总 RNA 的纯度和含量通过 NanoDropTM 1000 分光光度计检测和计算 260 nm 与 280 nm 处吸光度值的比值,以及 260 nm 与 230 nm 处吸光度值的比值来评价。使用 miScript II RT Kit 将总 RNA 转录成 cDNA,将 1 μg 总 RNA 加入到含 12 μl DEPC 处理水、2 μl miScript Reverse Transcriptase Mix、2 μl miScript Nucleics Mix 和 4 μl 5× miScript HiSpec buffer 中,在 37 ℃ 孵育 60 min 后,95 ℃ 孵育 5 min,终止反应,冻存于 -20 ℃ 备用。对于 miR-143 的表达水平检测使用 Gene Pharma Hairpin-itTM microRNA RT-PCR Quantitation Kit 在 ABI StepOne Plus 系统上进行,反应条件:95 ℃、10 min 为预变性阶段条件;95 ℃、12 s,62 ℃、40 s,共 40 个循环。以 U6 作为内参,2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-143 的相对表达量。对于 TFF3 mRNA 的定量检测同样在 ABI StepOne Plus 系统上进行,反应条件为 95 ℃、10 min 预变性;95 ℃、5 s,60 ℃、40 s,共 40 个循环。以 GAPDH 作为内参,2^{-ΔΔCt} 法计算 mRNA 的相对表达量。扩增使用的引物为 TFF3 (genbank 登录号: NM_003226), (F) 5'-CCAAGCAAACAATCCAGAGCA-3', (R) 5'-GCTCAGGACTCGCTTCATGG-3'; U6 snRNA (genbank 登录号: NR_004394), (F) 5'-CTCCGCTTCG-

GCAGGCCACA-3', (R) 5'-AACGCCCTCACGAATTTCGGT-3'; GAPDH, (F) 5'-TGGGTGTGAAC-CACGAGAA-3', (R) 5'-GGCATGGACTGTGGTCAT-GA-3'。

1.2.4 细胞增殖活力检测 使用 CCK-8 试剂盒对不同组细胞的增殖情况进行分析。将处于对数生长期的各组细胞用胰酶消化后用未添加血清的培养基重悬,按照 100 μl/孔(2 000 个细胞)接种 96 孔板,饥饿培养 12 h 后更换完全培养基继续培养,于培养 0、24、48、72、96 h 时每孔分别加入 10 μl CCK-8 溶液,孵育 1 h 后通过酶标仪检测吸光度(A₄₅₀)值。每组细胞进行 6 复孔检测。

1.2.5 细胞凋亡检测 细胞凋亡分析通过 Annexin V-FITC Analysis Kit 在流式细胞仪上进行,操作按照说明书进行。具体为各组细胞在相同的条件下培养 48 h 后用胰酶消化,2 555 r/min 离心 5 min,弃上清液,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 5~10 万重悬的细胞,2 555 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 195 μl Annexin V-FITC Binding buffer 重悬细胞,加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI 染色液,室温避光孵育 15 min,避光置于冰浴中,立即进行检测,使用 Cell Quest software 分析结果。

1.2.6 生物信息学分析 从 Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 数据库中获得 2 个分析 PC 中 miRNA 表达水平的数据集(GSE64333 和 GSE54516),分析 PC 组织和癌旁组织中 miR-143 的表达水平。分别使用在线分析软件 miRanda (<http://www.microrna.org/>)、PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>) 和 TargetScan7.1 (<http://www.targetscan.org/>) 预测 TFF3 3'-UTR 中 miR-143 的结合位点,取三者的交集,构建荧光素酶报告基因质粒进行实验验证。

1.2.7 双萤光素酶报告基因分析 分析 miR-143 与 TFF3 3'-UTR 的相互作用,构建野生型和突变型 TFF3 3'-UTR 荧光素酶报告基因质粒 pGL3-TFF3,以及预测与 miR-143 结合区域点突变的荧光素酶报告基因质粒 Mut-pGL3-TFF3。将荧光素酶报告基因质粒、内参质粒(海肾素荧光)和 miR-143 同时转染 HEK293 细胞。48 h 后根据双萤光素酶报告基因检测系统的说明书操作裂解细胞,加入发光液后在多功能酶标仪上检测结果。利用海肾素荧光作为内参照对结果进行均一化处理。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析(ANOVA)进

行多组间数据的比较,使用 *t* 检验进行数据间两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-143 在 PC 组织中表达水平 对 GEO 数据库中数据集 GSE64333 和 GSE54516 分析显示,与癌旁组织相比,PC 组织中 miR-143 的表达降低($P < 0.0001$)。见图 1。

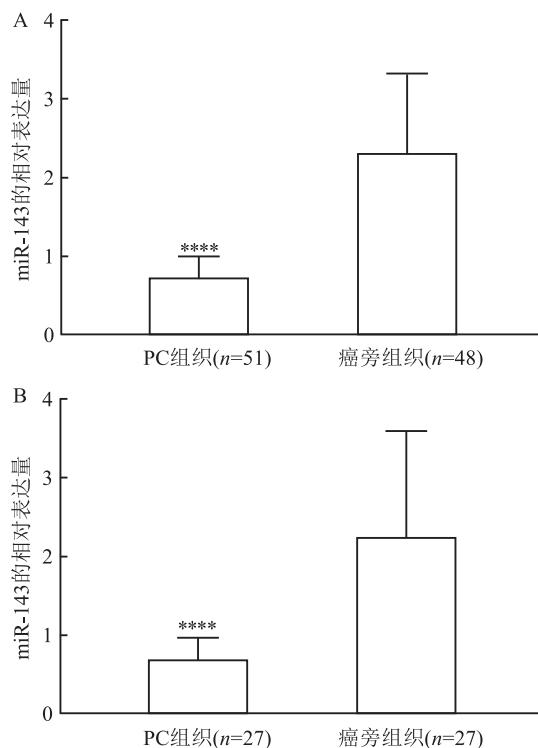


图 1 miR-143 在 PC 和癌旁组织中表达水平分析

A: 数据集 GSE64333 中 miR-143 的表达水平; B: 数据集 GSE54516 中 miR-143 的表达水平; 与癌旁组织比较: *** $P < 0.0001$

2.2 miR-143 在不同细胞中的过表达 通过荧光显微镜观察显示,在 PC3/miR-143 组和 PC3/miR-NC 组中均存在明显的绿色荧光,而在 PC3 组中未观察到荧光信号。Real-time PCR 检测显示 PC3/miR-143 组中 miR-143 的表达量高于 PC3 组($t = 8.877, P = 0.0009$)和感染对照慢病毒的 PC3 组($t = 8.358, P = 0.0011$)。见图 2。

2.3 miR-143 对 PC3 细胞增殖的影响 通过 CCK-8 法检测各组细胞 0 ~ 96 h 增殖情况,结果表明,从 48 h 开始,与 PC3 组相比,PC3/miR-143 组的增殖能力明显下降($F = 167.8, P = 0.0095$);PC3/miR-NC 组增殖能力未见改变。提示 miR-143 能抑制 PC3 细胞的增殖,见图 3。

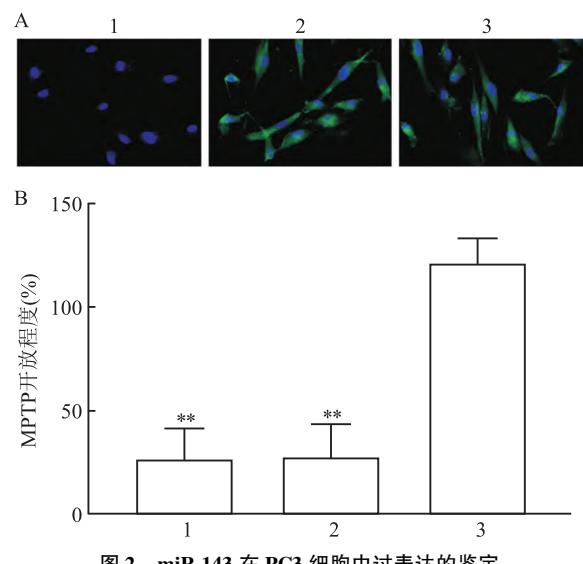


图 2 miR-143 在 PC3 细胞中过表达的鉴定

A: 荧光显微镜观察不同组细胞中 EGFP 的表达 $\times 200$; B: Real-time PCR 检测不同组细胞中 miR-143 的表达水平; 1: PC3 组; 2: PC3/miR-NC 组; 3: PC3/miR-143 组; 与 PC3/miR-143 组比较: ** $P < 0.01$

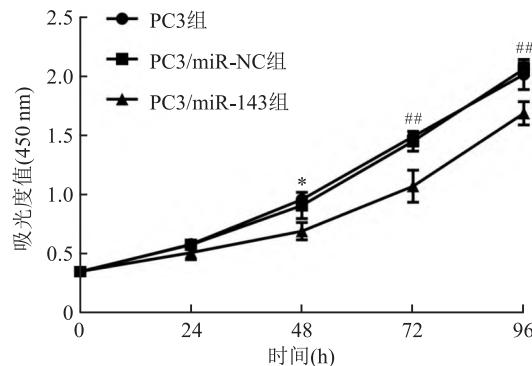


图 3 miR-143 对抑制 PC3 细胞增殖的影响

与 PC3 组比较: * $P < 0.05$; 与 PC3/miR-NC 组比较: # $P < 0.01$

2.4 miR-143 对 PC3 细胞凋亡的影响 流式细胞分析 PC3 组、PC3/miR-NC 组和 PC3/miR-143 组的凋亡比例分别是($3.6\% \pm 0.5\%$)、($3.2\% \pm 0.7\%$)和($10.4\% \pm 1.7\%$)。PC3/miR-143 细胞的凋亡比例高于 PC3 组($t = 6.647, P = 0.003$)和 PC3/miR-NC 组($t = 6.783, P = 0.003$)。提示 miR-143 在 PC3 细胞中具有促进细胞凋亡的作用。见图 4。

2.5 miR-143 靶向作用于 TFF3 3'-UTR 抑制 TFF3 的表达情况 生物信息学软件分析显示 miR-143 与 TFF3 的 3'-UTR 存在结合位点(图 5A);双荧光素酶报告基因分析显示,miR-143 能够靶向作用于 TFF3 的 3'-UTR 抑制其表达,当对 TFF3 的 3'-UTR 中结合位点进行点突变处理后,miR-143 的抑制作用消失(图 5B、C)。Real-time PCR 检测的结果显示,在过表达 miR-143 的 PC3/miR-143 组,TFF3

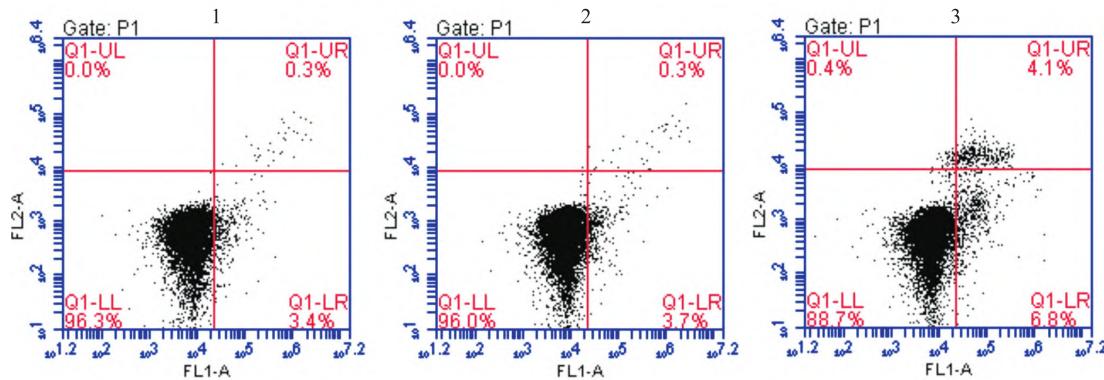


图4 流式细胞术检测 miR-143 对 PC3 细胞凋亡的影响

1:PC3 组;2:PC3/miR-NC 组;3:PC3/miR-143 组

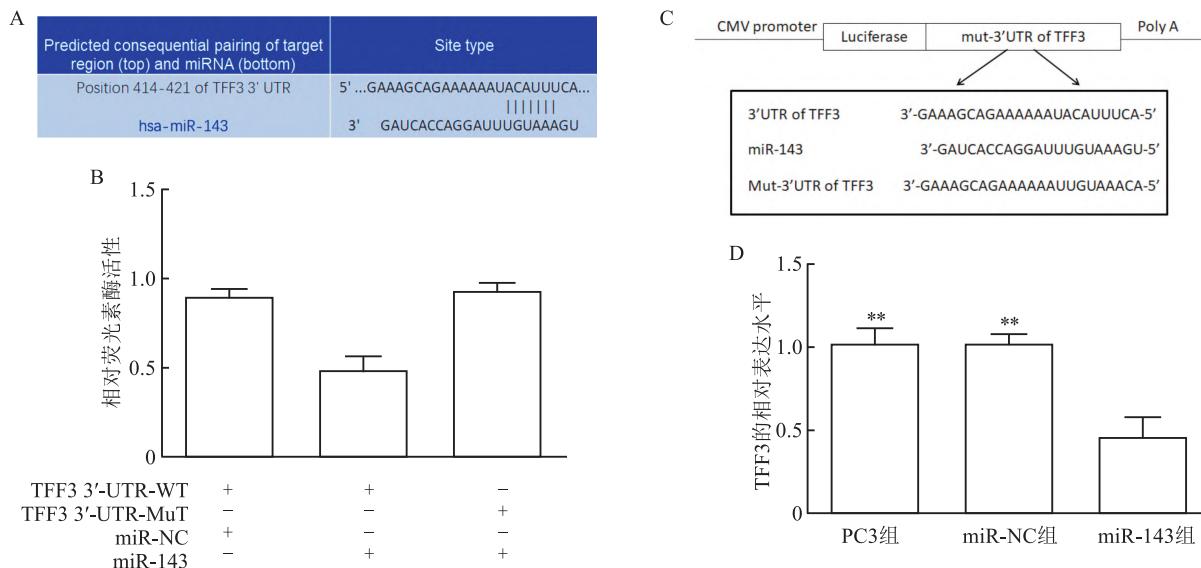


图5 miR-143 靶向作用于 TFF3 3'-UTR 对 TFF3 表达的影响

A: 在线分析软件预测 TFF3 3'-UTR 中 miR-143 的结合位点;B:pGL3-TFF3 和 Mut-pGL3-TFF3 荧光素酶报告基因质粒构建的示意图;C: 双荧光素酶报告基因分析 miR-143 与 TFF3 3'-UTR 的靶向作用;D:Real-time PCR 检测在 PC3 细胞中转染 miR-143 对 TFF3 mRNA 的表达水平的影响;与 miR-143 组比较: ** $P < 0.01$

的表达水平低于 PC3 组 ($t = 6.417, P = 0.002$) 和 PC3/miR-NC 组 ($t = 6.322, P = 0.002$) (图 5D)。

2.6 TFF3 抵消 miR-143 对 PC3 细胞增殖的抑制作用 在 PC3/miR-143 组中转染 TFF3 真核表达质粒,通过 CCK-8 法检测各组细胞 0~96 h 增殖情况,结果显示,转染 TFF3 后 PC3/miR-143 组的增殖能力明显增加 ($F = 120.9, P = 0.0087$),见图 6。

2.7 TFF3 抵消 miR-143 对 PC3 细胞凋亡的促进作用 流式细胞技术分析 PC3 组、PC3/miR-143 组、PC3/miR-143 + pCDNA3.1 组和 PC3/miR-143 + pCDNA3.1-TFF3 组的凋亡比例分别是 ($4.6\% \pm 0.6\%$)、($11.2\% \pm 1.1\%$)、($12.1\% \pm 1.5\%$) 和 ($5.1\% \pm 1.2\%$)。PC3/miR-143 + pCDNA3.1-TFF3 组的凋亡比例低于

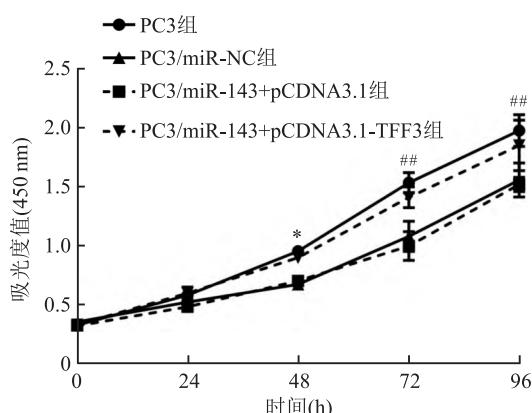


图6 转染 TFF3 后 miR-143 对抑制 PC3 细胞增殖的影响

与 PC3/miR-143 组比较: * $P < 0.05$; 与 PC3/miR-143 + pCDNA3.1 组比较: ** $P < 0.01$

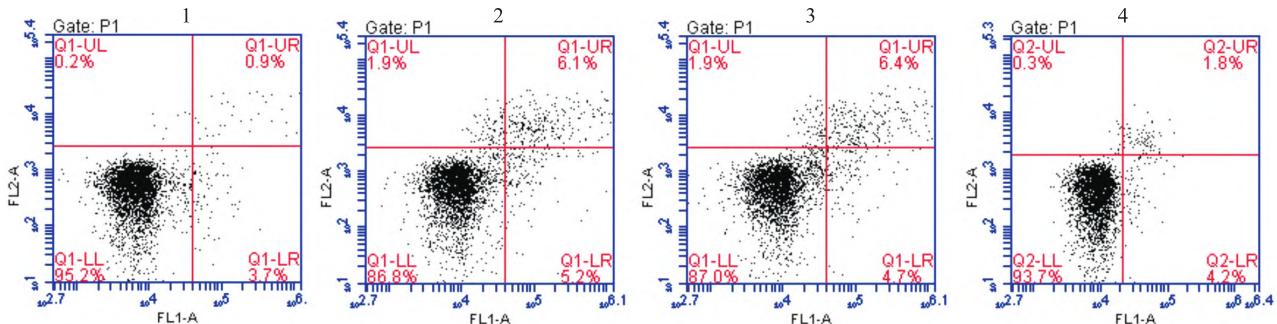


图 7 流式细胞术检测 TFF3 对 PPC3/miR-143 细胞凋亡的影响

1:PC3 组;2:PC3/miR-143 组;3:PC3/miR-143 + pCDNA3.1 组;4:PC3/miR-143 + pCDNA3.1-TFF3 组

PC3/miR-143 + pCDNA3.1 组 ($t = 7.244, P = 0.001$) 和 PC3/miR-143 组 ($t = 5.549, P = 0.0052$)。提示 TFF3 能够抵消 miR-143 的促凋亡作用。见图 7。

3 讨论

近十年来,越来越多的研究^[4]证明 miRNA 在癌症的发展和进展中起着重要作用。miRNA 表达水平异常与 PC 的发生有关,miR-9-5p 能够抑制 PC 的增殖^[5],而 miR-34a 能够促进 PC 的转移^[6]。在砷诱导获得癌表型的前列腺干细胞中,有几种 miRNA 的表达水平发生改变,其中 miR-143 的表达水平下降最明显^[7]。提示 miR-143 参与了 PC 的发生,但其分子机制还不是很清楚。该研究对 GEO 数据库中关于 PC miRNA 表达水平的数据集 GSE64333 和 GSE54516 分析也表明,PC 组织中 miR-143 的表达下降。本研究分析了 PC3 细胞中 miR-143 的作用,在 PC3 细胞中转染 miR-143 mimics 能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。生物信息学分析显示,miR-143 可能靶向作用于 TFF3 基因的 3'-UTR,抑制其表达。在本研究中 Real-time PCR 和 Western blot 的结果均显示在 PC3 中稳定表达 miR-143 能够抑制 TFF3 mRNA 和蛋白的表达。

TFF3 是一种分泌肽,主要在胃肠道黏膜上皮中表达,参与肠道黏膜损伤后修复。除了参与黏膜修复外,TFF3 还参与肿瘤细胞的侵袭转移和抗凋亡信号的激活。在乳腺癌^[8]、胃癌^[9]、胰腺癌^[10]、结直肠癌^[11]和 PC^[12]中均观察到 TFF3 的表达异常增加。Garraway et al^[13]均报告 TFF3 在 PC 组织中高于正常前列腺组织(分别为 42% vs 10% 和 47% vs 18.8%),提示 TFF3 是 PC 的生物标志物。在 PC 细胞中过表达 TFF3 能够促进细胞增殖、侵袭和转移。本研究表明 miR-143 在 PC3 中表达降低,TFF3 在

PC3 中表达增加。先前的研究提示在多种肿瘤中 miR-143 的表达水平均下降。在鼻咽癌中 miR-143 能够靶向作用于 FMNL1,抑制肿瘤转移^[14];在骨肉瘤中 miR-143 能够靶向作用于 FOSL2,抑制其肺转移^[15]。一项研究^[16]显示,在 PC 中,姜黄素能够上调 miR-143 的表达,抑制肿瘤的发生发展;此外,在去势治疗抵抗的 PC 细胞中下调 TFF3 的表达能够抑制细胞侵袭。另一项研究^[17]显示,在 PC 细胞中下调 TFF3 的表达能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,增加放疗敏感性。本研究在稳定表达 miR-143 的 PC3 细胞中转染 TFF3 真核表达质粒,能够抵消 miR-143 的作用,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。上述结果表明在 PC 中 miR-143 可能通过靶向抑制 TFF3 的表达,发挥抑癌作用。

综上所述,该研究表明,在 PC3 细胞中过表达 miR-143 能够下调 TFF3 表达,发挥抑制 PC 细胞增殖作用;提示 miR-143 和 TFF3 基因是治疗 PC 的潜在靶点。后期还需要进行临床和体内实验,进一步明确 miR-143 和 TFF3 基因在 PC 中的作用机制。

参考文献

- Szeliski K, Adamowicz J, Gastecka A, et al. Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers [J]. Cent European J Urol, 2018, 71(4):420–6.
- Gandhi J, Afridi A, Vatsia S, et al. The molecular biology of prostate cancer: current understanding and clinical implications [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2018, 21(1):22–36.
- Li W H, Wu H J, Li Y X, et al. MicroRNA-143 promotes apoptosis of osteosarcoma cells by caspase-3 activation via targeting Bcl-2 [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 80:8–15.
- Mishra S, Yadav T, Rani V. Exploring miRNA based approaches in cancer diagnostics and therapeutics [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, 98:12–23.
- 郭亮,肖峻,陶陶. miR-9-5p 对前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(7):1052

-7.

- [6] Chakravarthi B V S K, Chandrashekhar D S, Agarwal S, et al. miR-34a regulates expression of the stathmin-1 oncoprotein and prostate cancer progression [J]. Mol Cancer Res, 2018, 16(7): 1125–37.
- [7] Zhang C, Xiong J, Yang Q, et al. Profiling and bioinformatics analyses of differential circular RNA expression in prostate cancer cells [J]. Future Sci OA, 2018, 4(9): FSOA340.
- [8] Ishibashi Y, Ohtsu H, Ikemura M, et al. Serum TFF1 and TFF3 but not TFF2 are higher in women with breast cancer than in women without breast cancer [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):4846.
- [9] Taniguchi Y, Kurokawa Y, Takahashi T, et al. Prognostic value of trefoil factor 3 expression in patients with gastric cancer [J]. World J Surg, 2018, 42(12):3997–4004.
- [10] Jahan R, Ganguly K, Smith L M, et al. Trefoil factor (s) and CA19.9: A promising panel for early detection of pancreatic cancer [J]. Ebio Medicine, 2019, 42:375–85.
- [11] Yusup A, Huji B, Fang C, et al. Expression of trefoil factors and TWIST1 in colorectal cancer and their correlation with metastatic potential and prognosis [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(1):110–20.
- [12] Abou-Ouf H, Ghosh S, Box A, et al. Combined loss of TFF3 and PTEN is associated with lethal outcome and overall survival in men with prostate cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2019, 145(7):1751–9.
- [13] Garraway I P, Seligson D, Said J, et al. Trefoil factor 3 is overexpressed in human prostate cancer [J]. Prostate, 2004, 61(3): 209–14.
- [14] Cui F, Ji Y, Wang M, et al. miR-143 inhibits proliferation and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells via targeting FMNL1 based on clinical and radiologic findings [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):16427–34.
- [15] Sun X, Dai G, Yu L, et al. miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2 [J]. Sci Rep, 2018, 8(1):606.
- [16] Cao H, Yu H, Feng Y, et al. Curcumin inhibits prostate cancer by targeting PGK1 in the FOXD3/miR-143 axis [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2017, 79(5):985–94.
- [17] Perera O, Evans A, Pertziger M, et al. Trefoil factor 3 (TFF3) enhances the oncogenic characteristics of prostate carcinoma cells and reduces sensitivity to ionising radiation [J]. Cancer Lett, 2015, 361(1):104–11.

miR-143 targeting TFF3 inhibits proliferation of prostate cancer cell line PC3

Guo Liang^{1,2}, Xiao Jun¹, Tao Tao¹

(¹Dept of Urinary Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Urinary Surgery, The Affiliated Lu'an Hospital of Anhui Medical University, Lu'an 237005)

Abstract **Objective** To investigate the effect of miR-143 on the proliferation and apoptosis of prostate cancer cell line PC3. **Methods** The experiment was divided into non transfected PC3 cells group (PC3 group), transfected with miR-NC group (PC3/miR-NC group) and PC3 cells stably expressing miR-143 group (PC3/miR-143 group), and identified by immunofluorescence and real-time PCR. The effect of miR-143 on the proliferation of PC3 cells by CCK-8 method. The effect of miR-143 on PC3 cells apoptosis was analyzed by flow cytometry. The online analysis software was used to predict the target genes of miR-143, and then the luciferase reporter gene detection plasmid was constructed. The targeted binding sites of miR-143 and target genes were analyzed by luciferase assay. **Results**

The expression level of miR-143 in PC3/miR-143 group was significantly higher than that of PC3 group ($P < 0.01$) and PC3/miR-NC group ($P < 0.01$). CCK-8 test showed that the cell proliferation ability of PC3/miR-143 group decreased significantly compared with PC3 group ($P < 0.05$) and PC3/miR-NC group ($P < 0.01$). The results of flow cytometry showed that the apoptosis level of PC3/miR-143 group was significantly higher than that of PC3 group and PC3/mir-nc group ($P < 0.01$). Online analysis software predicted that miR-143 could target 3'-UTR binding to Trefoil Factor 3 (TFF3); The results of dual luciferase reporter gene further confirmed that miR-143 could target the 3'-UTR of TFF3. Real time PCR results showed that overexpression of miR-143 could significantly inhibit the expression of TFF3 in PC3 cells. Transfection of TFF3 eukaryotic expression plasmid into PC3/miR-143 group could counteract the effect of miR-143. **Conclusion** MiR-143 inhibits the expression of TFF3 and the proliferation of PC3 cells by targeting the 3'-UTR of TFF3.

Key words prostate cancer; miR-143; proliferation; apoptosis