

MicroRNA-133b抑制人横纹肌肉瘤细胞增殖与迁移的研究

王丽花^{1#*} 陈通克^{2#} 姚莎莎¹ 陈晓燕¹ 王 教¹

(¹温州医学院眼视光学院, 温州 325027; ²温州医学院实验动物中心, 温州 325000)

摘要 该研究首先通过Real-time RT-PCR检测发现, microRNA-133b在人横纹肌肉瘤细胞RD和A204中的表达量比正常肌肉组织中的表达量明显降低, 再通过阳离子脂质体介导的方法将microRNA-133b转染入横纹肌肉瘤细胞RD和A204细胞中, 并应用MTS法、Transwell法研究发现, microRNA-133b可明显抑制RD和A204细胞的增殖与迁移; 采用Western blot法检测转染后细胞内与增殖、迁移及细胞周期相关的蛋白表达, 发现microRNA-133b能下调RD和A204细胞中的LIM and SH3 protein 1(LASP1)、c-MET、p-MET、p-AKT、p-ERK1/2、p-Rb的表达水平, 并降低RD和A204细胞中细胞周期蛋白CDK4和CDK6表达量。该研究表明, microRNA-133b是通过下调LASP1、c-MET和p-MET的表达水平, 影响c-MET下游信号分子p-AKT、p-ERK1/2的表达水平, 同时还下调细胞周期相关蛋白如CDK4、CDK6、p-Rb等的表达, 从而影响RD和A204细胞的增殖与迁移。

关键词 MicroRNA-133b; 横纹肌肉瘤; 增殖; 迁移; 细胞周期

软组织恶性肿瘤是常见的小儿恶性疾病, 其中0~14岁儿童中50%的软组织恶性肿瘤是横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)。横纹肌肉瘤的恶性程度较高, 生长迅速, 易转移^[1]。

MicroRNA(miRNA)是一类长约22个核苷酸的内源性非编码单链RNA分子^[2], 其功能是与靶基因mRNA的3'非翻译区(3'UTRs)通过互补性结合, 从而反向调控靶基因的表达^[3]。通过对基因组上miRNA的位点分析和一系列研究表明, miRNA与癌症的发生具有密切联系, 50%以上已知miRNA位于肿瘤相关的基因脆性位点, miRNA既可以作为抑癌基因也可作为癌基因^[4]。起抑癌基因作用的miRNA表达下降或者缺失, 将导致肿瘤形成。具有癌基因功能的miRNA的过表达也将导致肿瘤发生。MicroRNA-133b(miR-133b)是一种在肌肉组织中高表达的miRNA, 在某些类型的肿瘤中呈现差异表达。例如, 与正常结肠和胃组织相比, 结肠癌和胃癌组织中miR-133b的表达量较低^[5]。Chen等^[6]发现miR-1与miR-133位于染色体的同一个位点并同时转录, 却通过不同的靶基因调控骨骼肌细胞的增殖与分化。本实验室前期研究发现, miR-1/206在人的正常肌肉组织中高表达, 在人横纹肌肉瘤组织和人横纹肌肉瘤细胞系RD中低表达, 并阐明了miR-1/206在横纹肌肉瘤的形成

过程中相关的调节机制^[7], 但同为miR-1家族的miR-133b在横纹肌肉瘤中的相关调控机制尚不明确。

本研究首先通过Real-time RT-PCR检测miR-133b在人横纹肌肉瘤细胞与正常肌肉组织中的表达量, 再通过阳离子脂质体介导的方法将miR-133b转染入横纹肌肉瘤细胞使其恢复表达, 并应用MTS法、Transwell法研究miR-133b对横纹肌肉瘤细胞增殖与迁移能力的影响; 采用Western blot法检测转染后细胞内与增殖、迁移及细胞周期相关蛋白表达量的改变, 进而阐明miR-133b在横纹肌肉瘤发生、发展中的相关调节机制, 为横纹肌肉瘤的临床诊断和治疗提供了新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

人横纹肌肉瘤细胞系RD购于美国ATCC(Mannassas, VA), 人横纹肌肉瘤细胞系A204购于中科院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所。

收稿日期: 2012-01-04 接受日期: 2012-03-05

浙江省自然科学基金(No.Y2080853)和温州医学院眼视光医院创新引导课题(No.YNCX201102)资助项目

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-88067930, E-mail: wlh0369@yahoo.com.cn

1.2 实验试剂与仪器

DMEM(Dulbecco modified Eagle's medium)培养基、胎牛血清FBS、0.05% Trypsin-EDTA、Lipofectamine™ RNAi MAX Reagent均购于Invitrogen公司, miR-133b和随机序列RNA Oligo(阴性对照, NC)均购于Ambion公司, MTS细胞增殖分析试剂购于Promega公司, Transwell 8 μm 孔径购于Corning Costar公司, 7500型荧光实时定量PCR仪、Real-time RT-PCR所用试剂和探针均购于美国ABI公司, 蛋白抗体购于Cell Signaling Technology公司, 硝酸纤维素膜购于GE公司, SpectraMax M5酶标仪购于Molecular Devices公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 人横纹肌肉瘤细胞RD和A204均采用含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养液, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 细胞接近融合时用胰蛋白酶消化传代, 同时接种细胞进行实验。

1.3.2 转染 将对数生长期的RD和A204细胞接种于多孔培养板, 根据Lipofectamine™ RNAi MAX转染说明书, 配制转染液: 将miRNA和Lipofectamine混合到无血清、无双抗的DMEM培养液中, 混匀, 室温放置15 min后, 每孔转染50 nmol/L的miR-133b, 置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育培养。阴性对照(NC)是以相同方法将随机序列RNA转染入细胞。

1.3.3 细胞增殖实验 将对数生长期的RD和A204细胞接种到96孔板中, 每个实验组有6个复孔, 24 h后按上述方法转染miR-133b或阴性对照(NC), 转染72 h后将细胞培养液换成无血清培养液100 μL /孔, 加入20 μL MTS混合液(PMS:MTS=1:20), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h后, 用酶标仪在490 nm波长下读取光密度值(D)。细胞生长抑制率=(对照组 D 值-实验组 D 值)/对照组 D 值 $\times 100\%$ 。

1.3.4 细胞迁移能力检测 将对数生长期的RD和A204细胞接种到24孔板中, 24 h后按上述方法转染miR-133b或阴性对照(NC), 转染后24 h胰酶消化细胞, 接种 4×10^5 细胞置于Transwell(8 μm 孔径)的上层小室, 继续培养24 h。取出上层小室, 经4%甲醛固定后, 去除滤膜上层细胞, 用苏木精染色, 于光镜下观察滤膜下表面细胞数。随机选择200倍视野5个, 计算平均每一视野中的细胞数, 以穿膜细胞的数目来表示肿瘤细胞的迁移能力。

1.3.5 Real-time RT-PCR Trizol试剂法分别提取

正常肌肉组织、RD、A204细胞的总RNA后, 用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测RNA的完整性。根据ABI公司特殊设计的引物合成cDNA, 再以FAM标记的探针检测miRNA的表达水平, 以U6为内参。Real-time反应体系为20 μL , 扩增条件为: 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸60 s, 体系反应40个循环。

1.3.6 靶基因预测 通过Target Scan Human 6.0 (<http://www.targetscan.org/>)和miRbase(<http://mirbase.org/index.shtml>)生物信息学软件来预测miR-133b可能作用的靶基因。

1.3.7 Western blot检测细胞内相关蛋白的表达情况 将对数生长期的RD和A204细胞接种到6孔板中, 24 h后细胞约30%融合时, 转染miR-133b或阴性对照NC, 转染48 h后, 用RIPA裂解液提取各实验组细胞的总蛋白, 蛋白溶液与上样缓冲液混合后进行10% SDS-PAGE电泳, 将电泳分离后的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 用5%脱脂奶粉-PBST封闭液室温封闭3 h, 用1:800稀释的一抗混合液4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用1:2 000稀释的HRP标记的二抗混合液室温孵育2 h, 最后在暗室进行化学发光和显影。

1.3.8 统计方法 所有数据均采用SPSS 10.0统计软件处理。实验数据以均值 \pm 标准误(means \pm SEM)表示, 两两比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 作为统计学显著差异的标准。

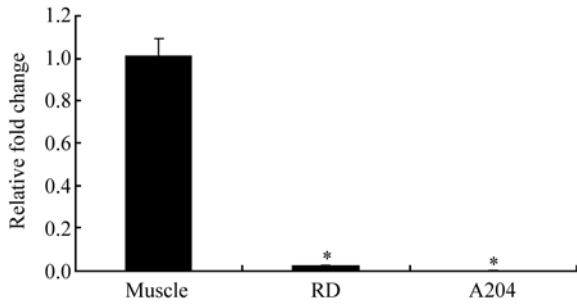
2 结果

2.1 Real-time RT-PCR检测人横纹肌肉瘤细胞中miR-133b的表达水平

经Real-time RT-PCR检测, 得出人正常肌肉组织(muscle)、RD、A204中miR-133b的相对表达量(图1)。RD细胞中miR-133b的表达量与正常肌肉组织相比明显降低, 在A204细胞中几乎检测不到miR-133b的表达, 分析结果有显著的统计学差异($P < 0.01$)。

2.2 MTS法检测转染miR-133b后RD与A204细胞增殖情况

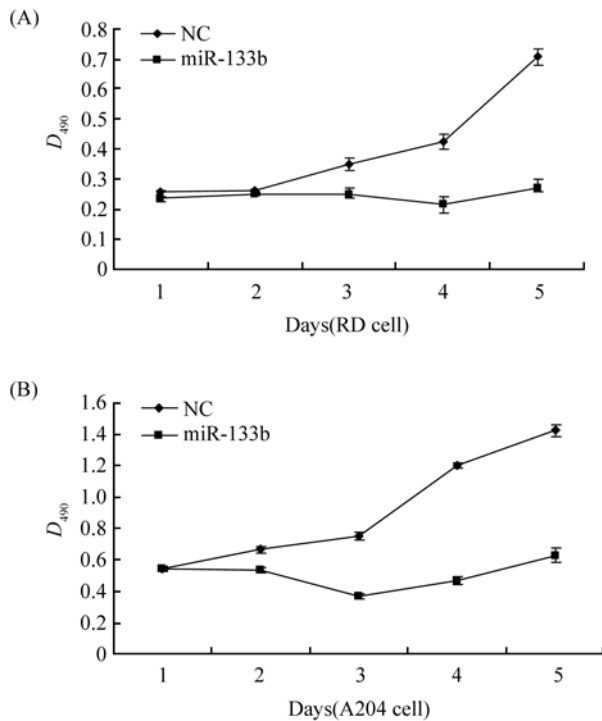
与阴性对照(NC)相比, 转染miR-133b后, RD、A204细胞的增殖能力受到明显抑制(图2A和图2B)。MTS法检测转染miR-133b或阴性对照(NC)1~5天的 D 值, 得出miR-133b能抑制RD、A204细胞的增殖能力, 从第3天起出现统计学差异, 且第5天的抑制率(RD: 60%; A204: 34%)最明显。



* $P < 0.01$.

图1 Real-time RT-PCR检测miR-133b在肌肉组织、RD和A204细胞中的表达量

Fig.1 Real-time RT-PCR analysis shows the expression of miR-133b in muscle, RD and A204 cells



1~5 d代表转染阴性对照(NC)或miR-133b后24, 48, 72, 96, 120 h。
1~5 d represent 24, 48, 72, 96, 120 h after lipofectamine transfection of NC or miR-133b.

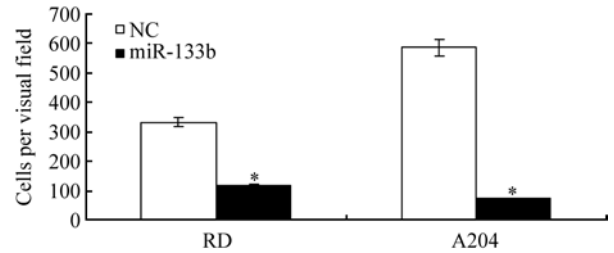
图2 MTS方法检测miR-133b对RD、A204细胞增殖能力的影响

Fig.2 MTS cell proliferation assay shows miR-133b affected the proliferation of RD and A204 cells

2.3 Transwell法检测转染miR-133b后RD与A204细胞的迁移情况

通过脂质体转染技术将阴性对照(NC)或miR-133b转染到RD和A204细胞中, 24 h后通过Transwell

法检测细胞迁移能力, 结果如图3。24 h穿膜细胞数目, 对照组和实验组分别为(RD: 332±16、115±6; A204: 585±29、72±4)。与对照组相比, 转染miR-133b后, RD穿膜细胞数减少65%($P < 0.05$), A204细胞迁移数减少87%($P < 0.01$)。结果表明, miR-133b能明显抑制RD和A204细胞的迁移能力。



* $P < 0.05$.

图3 Transwell法检测miR-133b对RD、A204细胞迁移能力的影响

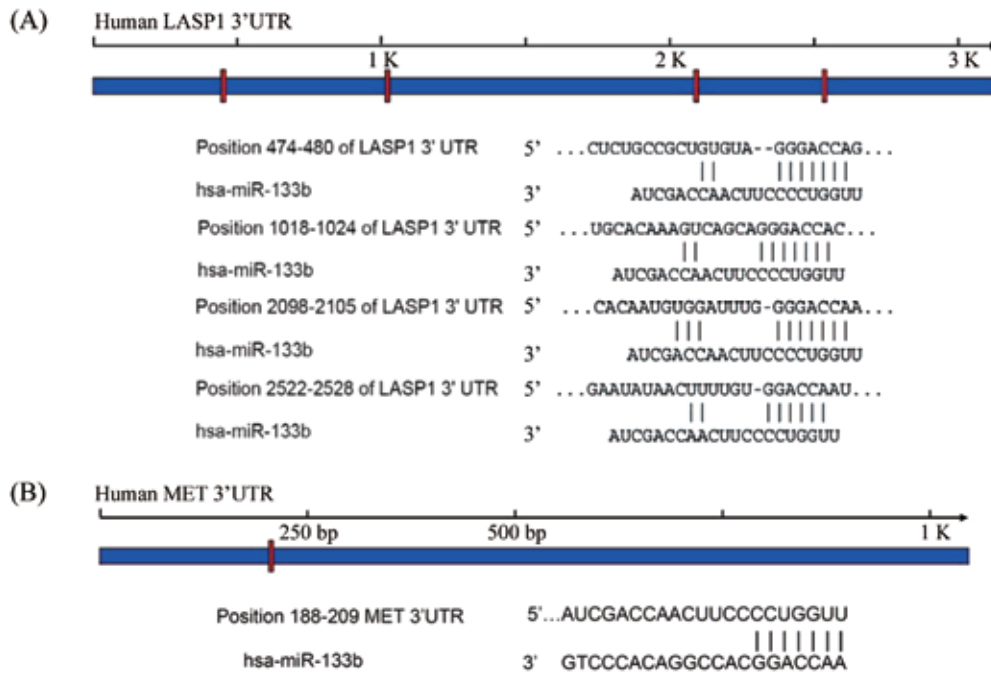
Fig.3 Transwell analysis shows transfection of miR-133b affected the migration of RD cells and A204 cells

2.4 靶基因预测结果

用TargetScan软件进行miR-133b靶基因的预测分析, 在Human *lasp1*的3'UTR区域, miR-133b有4个可能的靶位点(图4A)。用miRbase软件靶基因预测分析发现在Human *met*的3'UTR区域, miR-133b有1个可能的靶位点(图4B)。因此, *lasp1*和*c-met*是miR-133b可能的靶基因。

2.5 Western blot检测转染miR-133b后RD、A204细胞相关蛋白的表达

通过脂质体转染技术将阴性对照(NC)或miR-133b转染到RD、A204细胞中, 48 h后收集细胞提取蛋白, 用Western blot检测LASP1、c-MET和p-MET的表达水平, 以及c-MET下游信号分子p-AKT和p-ERK1/2的表达水平; 同时检测与细胞周期密切相关的蛋白p-Rb、CDK4、CDK6的表达水平。与阴性对照相比, 转染miR-133b后, 在RD和A204细胞中: LASP1、c-MET、p-MET、p-AKT、p-ERK1/2的表达水平降低, p-Rb的表达水平也有明显降低, 细胞周期蛋白CDK4和CDK6的表达量也下调(图5)。

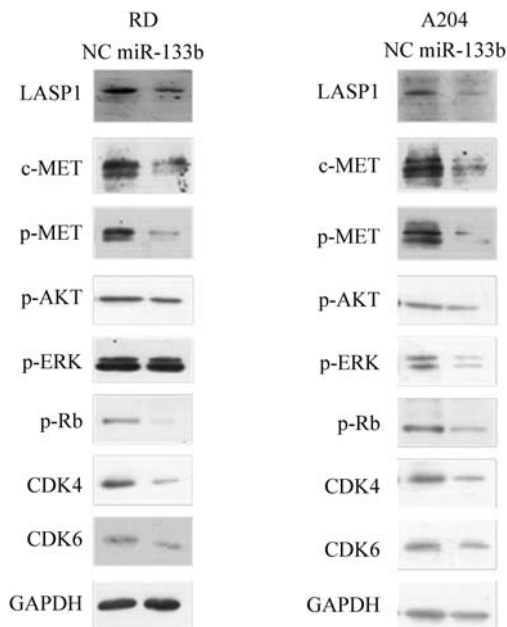


图中蓝色片段代表Human mRNA 3'UTR片段; 红色小片段代表miR-133b与之匹配的结合位点。图中已列出miR-133b与mRNA 3'UTR匹配的具体位点和核苷酸序列。

Specific locations of the binding sites were marked with red color and mRNA 3'UTR with blue color. Alignment between the predicted miR-133b target sites and miR-133b is shown. The conserved "seed" sequence for miR-133b: mRNA pairing is also indicated.

图4 生物信息学方法预测miR-133b的靶基因

Fig.4 Bioinformatics predicted miR-133b target



GAPDH为内参。

GAPDH was used as a loading control.

图5 Western blot检测转染miR-133b后细胞增殖、迁移及周期相关蛋白的表达量

Fig.5 Western blot analysis shows transfection of miR-133b the expression of a few proteins about cell proliferation, migration and cycle in RD cells and A204 cells

3 讨论

横纹肌肉瘤是儿童肿瘤中除白血病以外的最常见恶性肿瘤, 其恶性程度较高、生长迅速、易转移。现行的治疗手段是以手术为主, 结合化疗, 若不及时治疗, 预后极差。miRNA是目前发现最大的一类基因表达调控因子, 它在个体发育、细胞增殖、分化和凋亡、血管形成发育、神经系统发育和个体行为表现等过程中发挥着重要的作用^[8-12]。许多研究发现, 肿瘤细胞和正常组织细胞的miRNA表达谱有明显差异, 这表明miRNA与肿瘤的发生、发展过程有着密切的联系。与正常组织相比, 在结肠癌和胃癌组织中miR-133b的表达量明显降低^[5], 并且Chen等^[6]发现miR-1与miR-133位于染色体的同一个位点、同时转录, 并通过不同的靶基因调控骨骼肌细胞的增殖与分化。而miR-1在横纹肌肉瘤的形成过程发挥了重要的调节作用^[7], miR-133很可能与横纹肌肉瘤的形成有着密切联系。

本研究发现, 与正常肌肉组织相比, RD和A204细胞中的miR-133b的表达量显著降低, 且miR-133b能够显著抑制RD和A204细胞的增殖和迁移。因此,

miR-133b可能在横纹肌肉瘤的发生、发展过程中发挥重要的功能。

通过靶基因预测分析表明, *lasp1*和*c-met*是miR-133b可能的靶基因。LASP1编码的蛋白是一种由261个氨基酸组成的、参与细胞增殖与迁移过程的特殊的黏着斑蛋白。它在乳腺癌、卵巢癌、肝癌等中表达上调,并证实其与肿瘤细胞的增殖与转移有密切联系^[13-16]。Grunewald等^[14]发现,在卵巢癌中LASP1是通过改变斑联蛋白(ZYXIN)的定位来影响细胞的增殖与迁移过程的。本研究的Western blot结果表明,转染miR-133b至RD和A204细胞能使胞内LASP1的表达水平下调,这可能是使RD和A204细胞增殖与迁移受到抑制的原因之一。

c-MET是一种由*c-met*原癌基因编码的产物,为肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)受体,参与细胞信息传导、细胞骨架重排的调控,是细胞增殖、分化和运动的重要因素^[17-18]。研究表明,c-MET在横纹肌肉瘤细胞的增殖与迁移过程中发挥重要作用^[19-20],与正常肌肉组织相比,横纹肌肉瘤组织中c-MET的表达量较高^[7]。Hou等^[21]发现,c-MET小分子抑制剂SU11274通过抑制横纹肌肉瘤中c-MET的磷酸化水平,可抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖与迁移。Hu等^[22]通过靶基因预测和荧光素酶分析结果表明,*c-met*是miR-133b发挥负调控作用的靶基因之一。我们之前的研究表明,miR-34a与miR-1/206亦可作用于靶基因*c-met*而起到肿瘤抑制因子的作用^[23]。本研究的Western blot结果也表明,转染miR-133b至RD和A204细胞能使胞内c-MET和p-MET的表达水平明显下调。

为了进一步研究miR-133b在横纹肌肉瘤中的调控机制,我们检测了c-MET下游信号分子AKT和ERK1/2的表达情况。AKT是促进细胞生存和维持细胞正常功能的关键信号分子,并且构成细胞对外应激反应过程中促进细胞生长、抑制细胞凋亡和维持细胞重要功能的信号传递链。ERK1/2活化能促进某些基因的转录与表达,与细胞的增殖和分化密切相关。本研究发现,转染miR-133b后RD和A204细胞中p-AKT和p-ERK1/2的表达水平均有下调。该结果表明miR-133b通过下调c-MET和p-MET的表达水平,从而影响c-MET下游信号分子p-AKT和p-ERK1/2的表达水平,最终影响RD和A204细胞的增殖和迁移。

同时我们检测了一些重要细胞周期蛋白,如CDK4、CDK6、p-Rb等。CDK4在G₀/G₁的转换中发挥功能,CDK6在G₀/G₁和G₁/S的转换中发挥功能,Rb蛋白在细胞周期中最为关键的两个调控点G₁/S和G₂/M起到一种“闸门”的作用,不论cyclin、CDK、CKI,还是其他相关因子对细胞周期的作用都是通过Rb来实现的并最终决定着细胞周期的进程。本研究发现,转染了miR-133b后RD和A204细胞中的CDK4、CDK6和p-Rb发生显著下调,说明miR-133b应该是通过调控CDK4、CDK6等细胞周期相关蛋白,这些蛋白再通过p-Rb对细胞周期进行调控,从而影响细胞周期进程的。

综上所述,miR-133b调控RD和A204细胞的增殖与迁移可能的分子机制是:通过下调LASP1的表达水平,同时还通过下调c-MET和p-MET的表达水平,从而影响c-MET下游信号分子p-AKT和p-ERK1/2的表达水平,最终影响RD和A204细胞的增殖与迁移。MiR-133b还通过调控细胞周期相关蛋白如CDK4、CDK6、p-Rb等的表达,从而抑制了细胞增殖的进程。阐明miR-133b在抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖和迁移过程中的作用机制,将为横纹肌肉瘤的临床诊断和治疗提供新的思路。

参考文献 (References)

- 1 Parham DM, Ellison DA. Rhabdomyosarcomas in adults and children: An update. Arch Pathol Lab Med 2006; 130(10): 1454-65.
- 2 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell 1993; 75(5): 843-54.
- 3 David PB. microRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004; 116(2): 281-97.
- 4 Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101(9): 2999-3004.
- 5 Bandrés E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zárate R, Ramirez N, et al. Identification by real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. Mol Cancer 2006; 5: 29.
- 6 Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet 2006; 38(2): 228-33.
- 7 Yan DS, Dong XD, Chen XY, Wang LH, Lu CJ, Wang J, et al. MicroRNA-1/206 targets c-Met and inhibits rhabdomyosarcoma development. J Biol Chem 2009; 284(43): 29596-604.
- 8 Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal devel-

- opment. FEBS Lett 2005; 579(26): 5911-22.
- 9 Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303(5654): 83-6.
- 10 Naguibneva I, Ameyar-Zazoua M, Poleskaya A, Ait-Si-Ali S, Groisman R, Souidi M, *et al.* The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. *Nat Cell Biol* 2006; 8(3): 278-84.
- 11 Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006; 439(7074): 283-9.
- 12 Gammell P. MicroRNAs: Recently discovered key regulators of proliferation and apoptosis in animal cells. *Cytotechnology* 2007; 53(1/2/3): 55-63.
- 13 Tomasetto C, Régnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, Lidereau R, *et al.* Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17. *Genomics* 1995; 28(3): 367-76.
- 14 Grunewald TG, Kammerer U, Winkler C, Schindler D, Sickmann A, Honig A, *et al.* Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation. *Br J Cancer* 2007; 96(2): 296-305.
- 15 Wang B, Feng P, Xiao Z, Ren EC. LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2009; 50(3): 528-37.
- 16 Traenka C, Remke M, Korshunov A, Bender S, Hielscher T, Northcott PA, *et al.* Role of LIM and SH3 protein 1 (LASP1) in the metastatic dissemination of medulloblastoma. *Cancer Res* 2010; 70(20): 8003-14.
- 17 Lesko E, Majka M. The biological role of HGF-MET axis in tumor growth and development of metastasis. *Front Biosci* 2008; 13: 1271-80.
- 18 Socoteanu MP, Mott F, Alpini G, Frankel AE. c-Met targeted therapy of cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14(19): 2990-4.
- 19 Sharp R, Recio JA, Jhappan C, Otsuka T, Liu S, Yu Y, *et al.* Synergism between INK4a/ARF inactivation and aberrant HGF/SF signaling in rhabdomyosarcoma genesis. *Nat Med* 2002; 8(11): 1276-80.
- 20 Jankowski K, Kucia M, Wysoczynski M, Reza R, Zhao DL, Trzyna E, *et al.* Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res* 2003; 63(22): 7926-35.
- 21 Hou J, Dong J, Sun L, Geng L, Wang J, Zheng J, *et al.* Inhibition of phosphorylated c-Met in rhabdomyosarcoma cell lines by a small molecule inhibitor SU11274. *J Transl Med* 2011; 9: 64.
- 22 Hu G, Chen DJ, Li XR, Yang KY, Wang HX, Wu W. MiR-133b regulates the MET proto-oncogene and inhibits the growth of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther* 2010; 10(2): 190-7.
- 23 Yan DS, Zhou XT, Chen XY, Hu DN, Dong XD, Wang J, *et al.* MicroRNA-34a inhibits uveal melanoma cell proliferation and migration through downregulation of c-Met. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50(4): 1559-65.

The Mechanism of MicroRNA-133b-mediated Inhibition of Human Rhabdomyosarcoma Cell Proliferation and Migration

Wang Lihua^{1#*}, Chen Tongke^{2#}, Yao Shasha¹, Chen Xiaoyan¹, Wang Jiao¹

(¹*School of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China;*

²*Laboratory Animal Center, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)*

Abstract The Real-time RT-PCR assay showed microRNA-133b was highly expressed in human muscle tissues but downregulated in rhabdomyosarcoma cell line RD and A204. MicroRNA-133b was transfected into RD and A204 cells by lipofectamine. The proliferation of RD and A204 cells was examined by MTS cell proliferation assay and the migration of RD and A204 cells was examined by Transwell migration assay. The results showed that microRNA-133b can inhibit the proliferation and migration of RD and A204 cells. The expression level of cell proliferation, migration and cell cycle related proteins was determined by Western blot. MicroRNA-133b down-regulated the expression of LASP1, c-MET, phosphorylated-MET, phosphorylated-AKT, phosphorylated-ERK1/2, phosphorylated-Rb, CDK4 and CDK6 in RD and A204 cells. These results indicate that microRNA-133b inhibits proliferation and migration of rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of LASP1, c-MET, phosphorylated-MET, phosphorylated-AKT, phosphorylated-ERK1/2, phosphorylated-Rb, CDK4 and CDK6.

Key words microRNA-133b; rhabdomyosarcoma; proliferation; migration; cell cycle

Received: January 4, 2012 Accepted: March 5, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y2080853) and Innovation Fund of the Affiliated Eye Hospital of Wenzhou Medical College (No.YNCX201102)

[#]These authors contributed equally to this work

^{*}Corresponding author. Tel: 86-577-88067930, E-mail: wlh0369@yahoo.com.cn