

microRNA-378i抑制横纹肌肉瘤细胞增殖和迁移

钟佳云 王 教 赵云萍 陈晓燕*

(温州医科大学附属眼视光医院眼视光学和视觉科学国家重点实验室, 温州 325027)

摘要 该文主要研究了microRNA-378i(miR-378i)在人横纹肌肉瘤细胞中的表达水平及其对细胞增殖和迁移能力的影响。通过qRT-PCR(quantitative RT-PCR)法检测在横纹肌组织和横纹肌肉瘤细胞中miR-378i成熟体的水平。采用阳离子脂质体介导的方法将miR-378i成熟体转染入横纹肌肉瘤细胞,通过MTS法检测细胞增殖能力、细胞克隆形成实验检测细胞增殖和生长能力、流式细胞技术检测细胞周期,以及应用xCELLigence细胞功能分析仪检测细胞迁移能力。Western blot方法检测miR-378i对靶基因蛋白质水平的调控。结果显示,在横纹肌肉瘤细胞中,miR-378i成熟体的水平较正常横纹肌组织显著下调。恢复miR-378i的表达水平能显著抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖、细胞克隆形成和迁移能力,并诱导细胞发生G₁或G₂期阻滞。Western blot结果显示,miR-378i能够下调IGF1R β 的蛋白质水平。综上所述,miR-378i能够显著抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖和迁移。

关键词 microRNA-378i; 横纹肌肉瘤; 增殖; 迁移

microRNA-378i Inhibits the Proliferation and Migration of Rhabdomyosarcoma Cells

Zhong Jiayun, Wang Jiao, Zhao Yunping, Chen Xiaoyan*

(State Key Laboratory of Ophthalmology, Optometry and Vision Science, Wenzhou Medical University
Affiliated Hospital of Ophthalmology and Optometry, Wenzhou 325027, China)

Abstract This study investigated the level of microRNA-378i (miR-378i) in rhabdomyosarcoma cells and striated muscle specimen and the influence of proliferation and migration caused by miR-378i in rhabdomyosarcoma cells. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was performed to determine the level of miR-378i in human rhabdomyosarcoma cells and striated muscle specimens. Lipofectimine was used to transfect miR-378i mimics into rhabdomyosarcoma cells to upregulate the expression level of miR-378i. MTS, clone formation experiments, xCELLigence analysis and flow cytometry were performed to detect the proliferation, growth, migration and cell cycle of rhabdomyosarcoma cells, respectively. Western blot was used to identify the protein level of IGF1R β . The results showed that the level of miR-378i in rhabdomyosarcoma cells was significantly decreased compared with striated muscle specimens. Recovery expression level of miR-378i inhibited cell proliferation and migration, decreased the number of clones, and induced G₁ or G₂ phase arrest in rhabdomyosarcoma cells. It was also found that miR-378i could deregulate protein level of IGF1R β . In conclusion, miR-378i inhibited the proliferation and migration of rhabdomyosarcoma cells.

Keywords microRNA-378i; rhabdomyosarcoma; proliferation; migration

收稿日期: 2017-03-13 接受日期: 2017-08-23

温州医科大学附属眼视光医院创新引导课题(批准号: YNCX201102)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88067930, E-mail: xiaoyan_chen@aliyun.com

Received: March 13, 2017 Accepted: August 23, 2017

This work was supported by the Innovation and Guided Project of Wenzhou Medical University Affiliated Hospital of Ophthalmology and Optometry (Grant No. YNCX201102)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88067930, E-mail: xiaoyan_chen@aliyun.com

网络出版时间: 2017-09-18 17:28:44

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170918.1728.004.html>

横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RMS)是一种在儿童和青少年间最常见的软组织恶性肿瘤^[1],约占15岁以下儿童软组织肉瘤的50%,占儿童所有恶性肿瘤的4%~8%^[2]。RMS亚型分类包括腺泡型横纹肌肉瘤(alveolar rhabdomyosarcoma, ARMS)、胚胎型横纹肌肉瘤(embryonal rhabdomyosarcoma, ERMS)、多形型横纹肌肉瘤(polymorphism rhabdomyosarcoma, PRMS)以及梭形横纹肌肉瘤(spindle cell rhabdomyosarcoma, SRMS)^[3]。其中,最常见的ERMS多发于头颈和眼眶等部位。根据横纹肌肉瘤的分类、发病部位、临床分期不同等因素,治疗方法和预后均存在较大差异。目前没有非常有效的方法治疗横纹肌肉瘤,尽管获得了新的药剂、进行了强化治疗,但是横纹肌肉瘤复发率仍达到17%,发生肿瘤迁移的患者5年存活率只有30%^[4]。阐明横纹肌肉瘤发生发展过程中的分子机制,对早期诊断、有效治疗及预后评估具有重要意义。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长约22个核苷酸的内源性非编码RNA,通过结合于靶mRNA的3'端非编码区(3'UTR)降解mRNA或抑制翻译来下调相应基因的表达水平^[5]。miRNA在众多生理和病理过程发挥重要功能,其中包括在肿瘤发生和发展中起抑制或促进作用^[6-8]。据报道, microRNA-378(miR-378)与前列腺癌、胃癌、肺癌和乳腺癌等多种肿瘤的发生相关^[9-12]。人源miR-378家族中包含10个成员,分别为hsa-miR-378a-3p、hsa-miR-378b、hsa-miR-378c、hsa-miR-378d、hsa-miR-378e、hsa-miR-378f、hsa-miR-378g、hsa-miR-378h、hsa-miR-378i(以下简称miR-378i)和hsa-miR-378j。各个成员的前体均来源于不同染色体,但其成熟体的序列高度同源。本实验室的前期芯片结果表明,miR-378i在横纹肌肉瘤细胞中的表达水平较正常横纹肌组织显著下调。本研究进一步验证miR-378i在正常横纹肌组织和横纹肌肉瘤细胞中的表达水平,深入探究miR-378i对横纹肌肉瘤细胞增殖、迁移和细胞周期等的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验对象

人横纹肌肉瘤细胞系RD、A673和SJCRH30购于全球生物资源中心(ATCC)。

1.2 实验材料

Trizol试剂、Lipo-fectamineTM RNAi/MAX Reagent

均购于Invitrogen公司;DMEM(Dulbecco Modified Eagle's Medium)培养基、RPMI-1640(Roswell Park Memorial Institute)培养基和胎牛血清(FBS)、0.05% Trypsin-EDTA均购于Gibco公司;miR-378i成熟体和随机序列RNA(阴性对照)购于Ambion公司;MTS细胞增殖分析试剂购于Promega公司;细胞迁移能力检测所需的xCELLigence细胞检测板CIM购于ACEA Biosciences公司;定量PCR试剂和探针均购于ABI公司;IGF1R β 抗体购于Santa Cruz公司;荧光二抗购于Licor公司。

1.3 总RNA提取及荧光定量PCR

Trizol试剂提取正常横纹肌组织及横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30中的总RNA。采用ABI公司的TaqMan MicroRNA Assays试剂盒,针对miR-378i的成熟体进行探针法荧光定量PCR分析。按照TaqMan MicroRNA Assays试剂盒的标准操作流程,取20 ng RNA逆转录合成cDNA,然后进行探针法实时荧光定量PCR检测miR-378i成熟体的表达水平,U6为内参。采用 ΔC_t 方法分析miR-378i相对水平。

1.4 细胞培养

人横纹肌肉瘤细胞RD的培养基为含5% FBS的DMEM, A673的培养基为含10% FBS的DMEM, SJCRH30的培养基为含10% FBS的RPMI-1640,上述细胞均置于37 °C、含5% CO₂的培养箱中培养。

1.5 miRNA转染

将对数生长期的RD、A673和SJCRH30细胞接种于多孔培养板中,采用LipofectamineTM RNAi/MAX试剂将miRNA转染至细胞中,每孔转染50 nmol/L的miR-378i成熟体。以相同方法转染随机序列RNA Oligo作为阴性对照(negative control, NC)。

1.6 细胞增殖实验

将对数生长期的RD、A673和SJCRH30细胞接种到96孔板中,每组6个复孔,每孔接种3 000个细胞。细胞培养24 h后转染miR-378i或NC,转染72 h后进行MTS检测^[13],用酶标仪在490 nm波长下读取光密度(D)值。细胞生长抑制率=(对照组D值-实验组D值)/对照组D值 \times 100%。

1.7 细胞克隆形成实验

将miR-378i或NC转染至对数生长期的RD、A673和SJCRH30细胞,转染24 h后用0.05%胰蛋白酶-EDTA消化收集细胞,以每孔2 000个细胞接种于6孔板内,置于37 °C、含5% CO₂的培养箱中培养,直

至出现肉眼可见的克隆,经4%多聚甲醛固定和结晶紫染色后记录结果。

1.8 流式细胞术检测细胞周期

将对数生长期的RD、A673和SJCRH30细胞均匀接种于6孔板中,每孔接种 2×10^5 个细胞,培养24 h后将miR-378i或NC转染至细胞中。继续培养48 h后收集细胞,经固定和碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色后,进行流式细胞术检测,每个样本获取30 000个细胞,通过Modifit软件计算细胞周期各时相的百分率。

1.9 细胞迁移能力实验

将对数生长期的RD、SJCRH30细胞均匀接种于24孔板中。细胞培养24 h后转染miR-378i或NC。细胞继续培养24 h后转接至CIM板上层,每孔接种30 000个细胞,每个实验组接种4个复孔。利用xCELLigence细胞功能分析仪进行细胞迁移能力监测,选取48 h后的细胞指数进行迁移能力分析。

1.10 Western blot

将对数生长期的RD、A673和SJCRH30细胞均匀接种于6孔板中,每孔接种 2×10^5 细胞。细胞培养24 h后转染miR-378i或NC,继续培养48 h后收集细胞,裂解于蛋白质裂解液中。细胞总蛋白经SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至硝酸纤维素膜上。结合样品蛋白质的膜经5%脱脂奶粉封闭液封闭3 h,分别结合一抗IGF1R β 和带有荧光基团标记的二抗。最后在Odyssey Licor双色红外激光成像仪上进行曝光成像。蛋白质条带经Image Pro Plus软件进行灰度值分析。

1.11 统计学方法

统计学分析采用SPSS 16.0软件,两两比较采用*t*检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 横纹肌肉瘤细胞中miR-378i的表达水平

首先采用实时荧光定量PCR(quantitative RT-

PCR, qRT-PCR)法验证两个正常横纹肌组织和三株横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30中的miR-378i水平。根据qRT-PCR的数据分析(表1),miR-378i在正常横纹肌组织中属于表达丰度较高的microRNA(样品Ct值与内参U6的Ct值相当)。横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30中的miR-378i相对表达水平大幅度降低,相当于正常横纹肌标本中的1/200~1/1000(表1和图1)。因此,miR-378i在横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30中的相对水平较正常横纹肌组织显著下调。

2.2 miR-378i能抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖

采用脂质体转染法将miR-378i成熟体或阴性对照(NC)转染入横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30,使miR-378i达到高水平。然后,进行MTS实验检测细胞的增殖能力。MTS结果显示,转染了miR-378i的横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30的增殖数量分别相当于NC的66.28%($P < 0.01$)、81.14%($P < 0.01$)和74.85%($P < 0.05$)(图2)。这表明,横纹肌肉瘤细胞中miR-378i高水平能够显著抑制肿瘤细胞的增殖能力。

2.3 miR-378i抑制横纹肌肉瘤细胞克隆形成能力

细胞克隆形成实验是反映细胞群体依赖性和增殖能力的常规方法,体现肿瘤细胞在体外的生长和增殖能力。横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30转染miR-378i或NC后,进行克隆形成实验。结果显示,转染miR-378i后的横纹肌肉瘤细胞RD、A673和SJCRH30的克隆形成数量分别是转染NC细胞的54.67%、80.32%和64.12%(图3)。因此,miR-378i能够显著抑制横纹肌肉瘤细胞的克隆形成能力(经*t*检验,NC组与转染组具有显著差异, $P = 0.03$)。

2.4 miR-378i诱导横纹肌肉瘤细胞G₁期阻滞

进一步利用流式细胞术对转染miR-378i或NC的横纹肌肉瘤细胞进行细胞周期检测。结果显示,转染miR-378i后A673细胞处于G₁期的数量较NC

表1 正常横纹肌组织和横纹肌肉瘤细胞中miR-378i水平

Table 1 The level of miR-378i in striated muscle and rhabdomyosarcoma cells

样品名	平均Ct值	U6平均Ct值	相对表达量
Sample name	Mean of Ct	Mean of U6 Ct	Relative level
Muscle 1	20.258	21.317	1.000
Muscle 2	20.366	22.642	2.324
RD	29.880	21.241	0.001
A673	28.909	20.825	0.002
SJCRH30	26.156	19.601	0.005

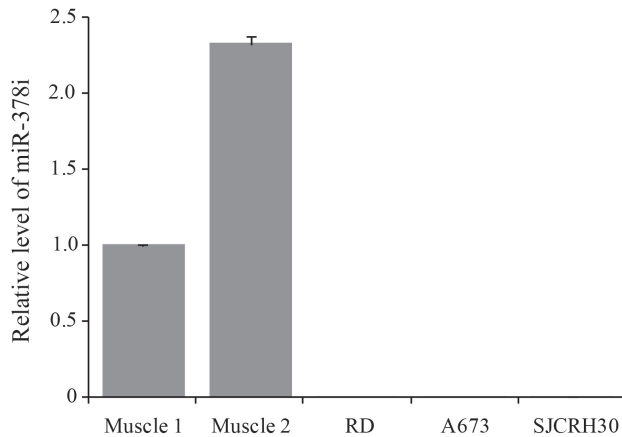
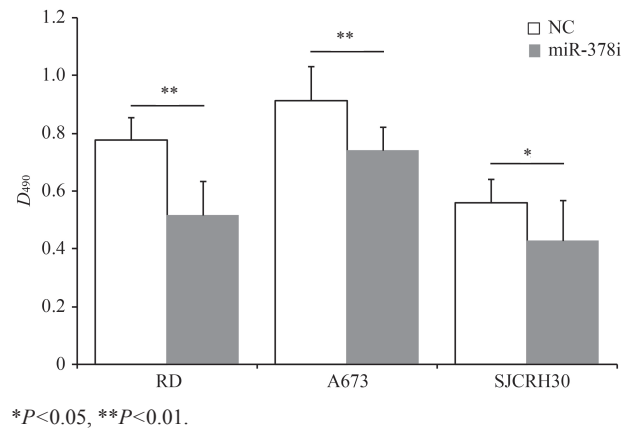


图1 正常横纹肌组织和横纹肌肉瘤细胞中miR-378i水平
Fig.1 The level of miR-378i in striated muscle and rhabdomyosarcoma cells



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图2 miR-378i抑制横纹肌肉瘤细胞的增殖
Fig.2 miR-378i inhibited the proliferation of rhabdomyosarcoma cells

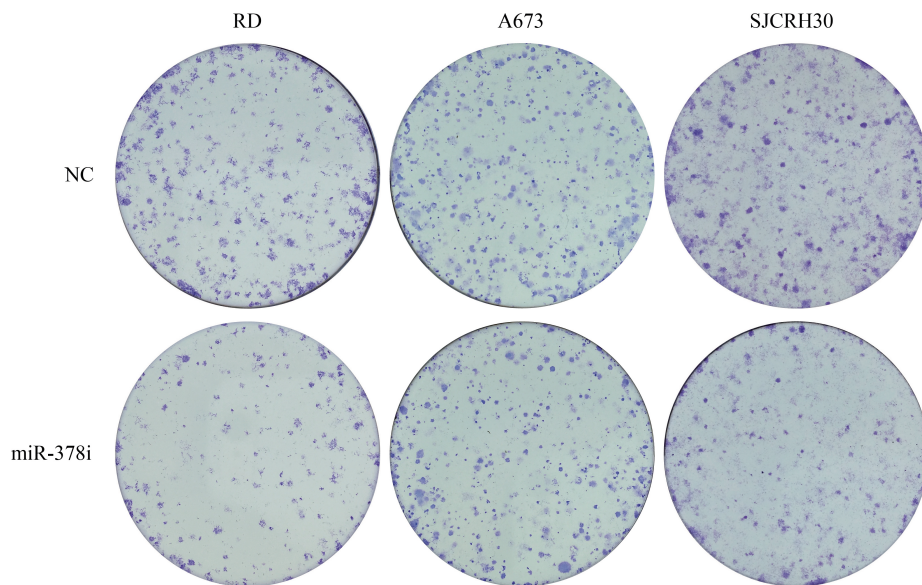


图3 miR-378i抑制横纹肌肉瘤细胞的克隆形成能力
Fig.3 miR-378i inhibited the clone formation of rhabdomyosarcoma cells

升高了13.37%, SJCRH30细胞处于G₁期的数量较NC升高了24.91%(图4)。这说明, miR-378i能够诱导横纹肌肉瘤细胞产生G₁期阻滞现象, 从而影响整个细胞周期。此外, 横纹肌肉瘤细胞RD在恢复miR-378i达到高水平后, 没有出现G₁期阻滞, 但出现了G₂期阻滞, 也对其细胞周期产生了影响。

2.5 miR-378i抑制横纹肌肉瘤细胞迁移

肿瘤细胞的迁移能力是衡量肿瘤发展的重要指标之一。采用xCELLigence细胞功能分析仪对转染miR-378i或NC的横纹肌肉瘤细胞进行迁移能力分析。结果显示, 横纹肌肉瘤细胞RD和SJCRH30转染miR-378i后, 其迁移能力被显著抑制(RD: $P < 0.01$;

SJCRH30: $P < 0.05$)(图5)。

2.6 IGF1R为miR-378i的靶基因之一

miRNA通过作用于其靶基因的mRNA才能发挥生物学功能。根据在线miRNA靶基因预测系统 target scan(网址: <http://www.targetscan.org>)的预测结果显示, miR-378i和miR-378a-3p具有相同的种子序列(与靶基因mRNA的3'UTR区域结合部位), 且均在胰岛素样生长因子1型受体(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF1R)3'UTR区的370和5 590位置有结合位点(图6)。据Knezevic等^[14]研究报道, IGF1R为miR-378a-3p的靶基因, miR-378a-3p直接与其mRNA的3'UTR区域结合, 因此推测IGF1R也为miR-378i的

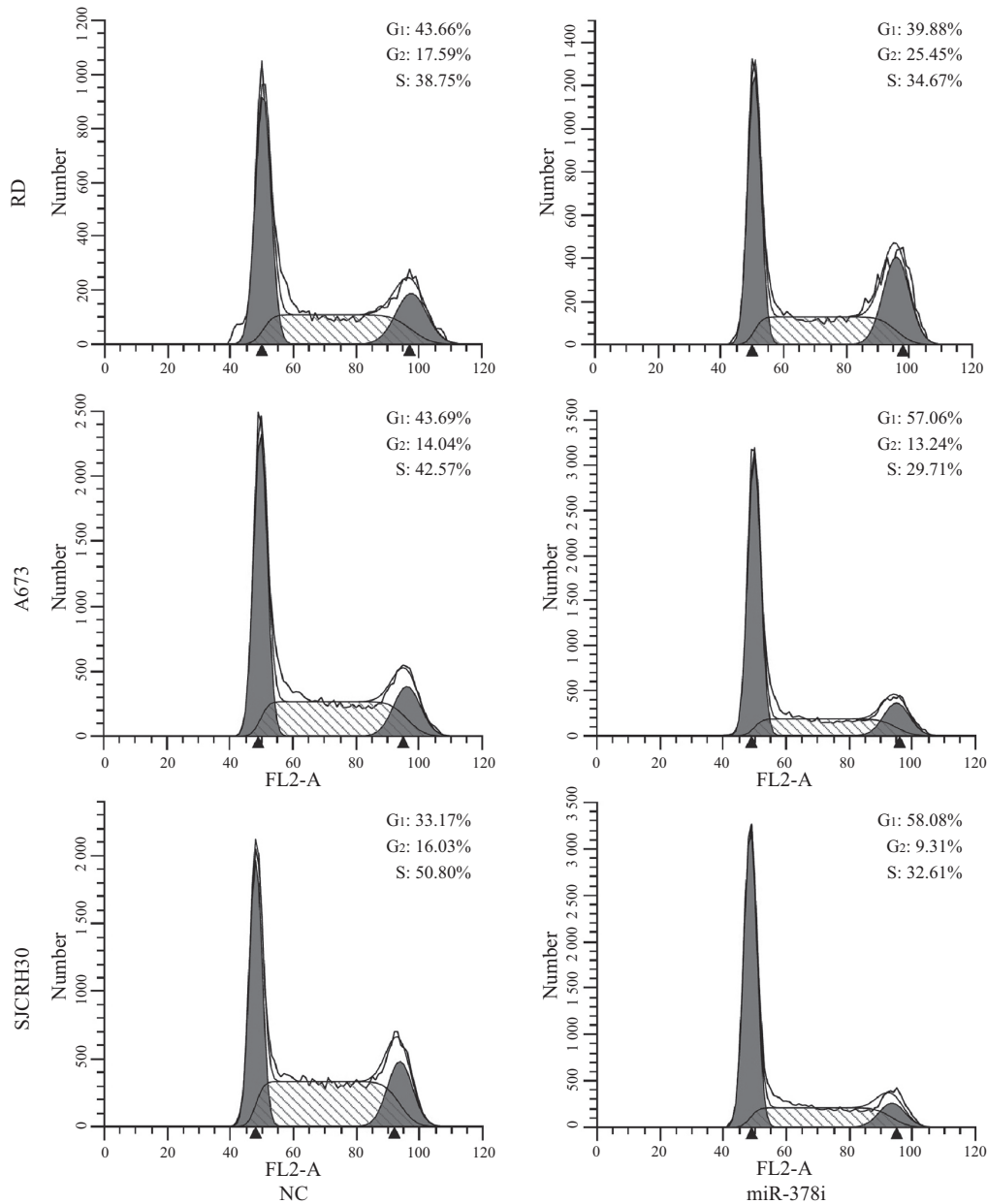


图4 miR-378i对横纹肌肉瘤细胞周期的影响

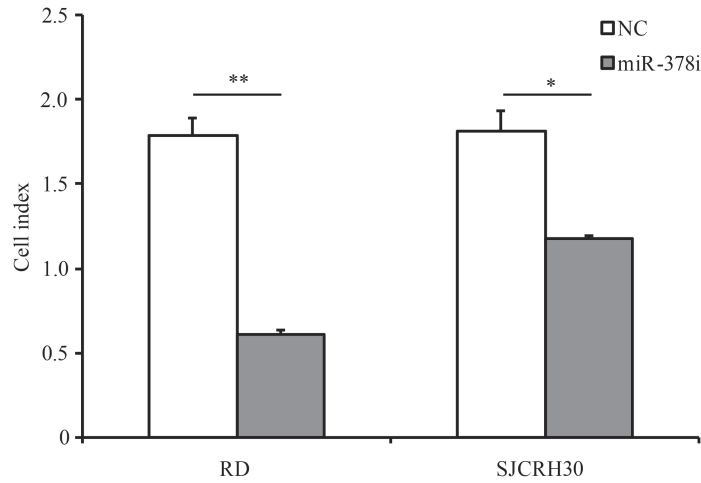
Fig.4 The influence of miR-378i in rhabdomyosarcoma cell cycle

靶基因。IGF1R由IGF1R α 和IGF1R β 两种亚基构成,该两种亚基均来源于同一个mRNA,经不同的翻译后修饰而成。本研究的Western blot结果显示,转染miR-378i的RD和A673细胞中IGF1R β 蛋白质水平较NC下调(图7)。然而, SJCRH30细胞的结果恰好相反,转染miR-378i的IGF1R β 蛋白质水平较NC上调。推测在横纹肌肉瘤中, IGF1R基因可能为miR-378i的靶基因之一。

3 讨论

横纹肌肉瘤是一种在儿童中常见的软组织恶

性肿瘤,恶性程度高、易转移,甚至有20%患者在被诊断时已经发生了转移^[15]。因横纹肌肉瘤的易转移性和高恶性程度及其治疗手段的限制性,亟待寻找早期诊断的分子标记和更加有效的治疗手段。近年来,众多研究表明, miRNA在横纹肌肉瘤的发生、发展过程中具有非常重要的调控作用^[16-18]。本文的结果显示,在横纹肌肉瘤细胞中的miR-378i水平较正常横纹肌组织大幅度下调,提示miR-378i在横纹肌肉瘤的发生、发展过程中可能具有重要的作用。同样, Megiorni等^[19]的研究也表明, miR-378家族(包含miR-378i)在横纹肌肉瘤中较正常横纹肌标本中显



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 miR-378i抑制横纹肌肉瘤细胞迁移

Fig.5 miR-378i inhibited the migration of rhabdomyosarcoma cells

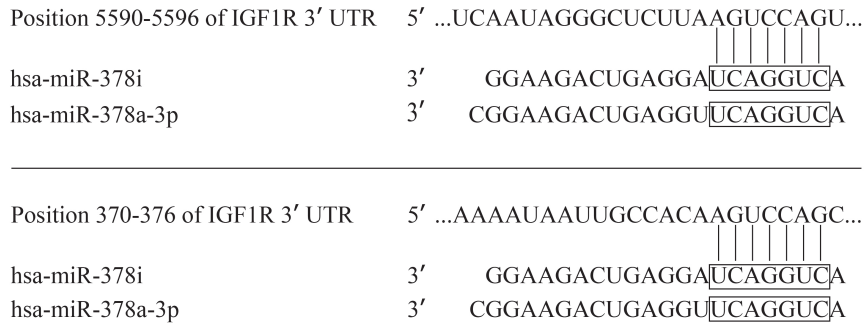
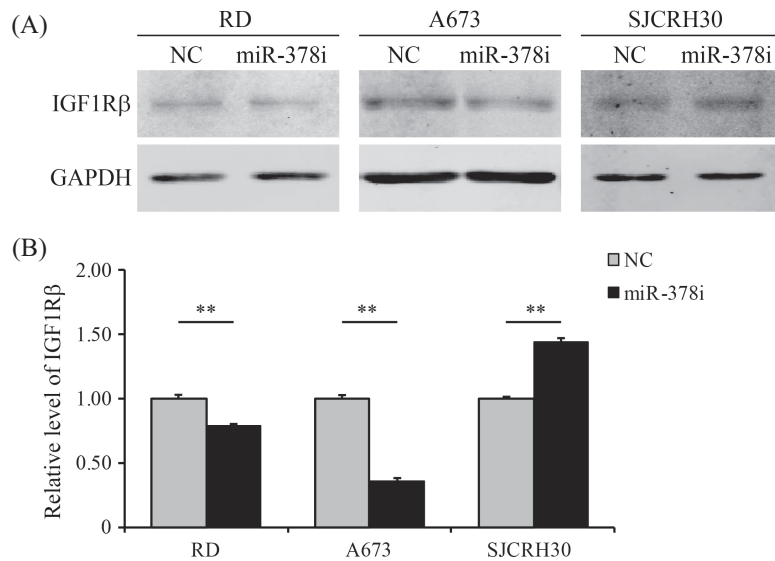


图6 miR-378i和miR-378a-3p的靶基因预测结果

Fig.6 The prediction of target gene of miR-378i and miR-378a-3p



A: 横纹肌肉瘤细胞中miR-378i下调IGF1R β 的蛋白质水平; B: IGF1R β 经内参GAPDH校正后的相对灰度扫描值; NC: 转染阴性对照序列; miR-378i: 转染miR-378i成熟体; ** $P < 0.01$.

A: miR-378i downregulated the level of IGF1R β ; B: the relative grey level of IGF1R β with corrected by GAPDH; NC: transfected with negative control; miR-378i: transfected with miR-378i mimics; ** $P < 0.01$.

图7 miR-378i下调IGF1R β 的蛋白质水平

Fig.7 miR-378i downregulated the level of IGF1R β

著下调, 预示miR-378家族(包括miR-378i)有望作为横纹肌肉瘤早期诊断和预后评估的分子标记。

肿瘤的发生和发展需要肿瘤细胞的大量增殖和迁移。在横纹肌肉瘤细胞中转染miR-378i成熟体, 恢复其正常表达水平后, 进一步研究miR-378i对横纹肌肉瘤细胞增殖、迁移和克隆形成能力的影响。结果表明, 横纹肌肉瘤细胞的增殖、迁移和克隆形成能力均受miR-378i的显著抑制。以上结果说明, miR-378i具有抑制横纹肌肉瘤发展和转移的重要功能。流式细胞术的结果表明, miR-378i能够诱导横纹肌肉瘤细胞发生G₁期或者G₂期阻滞, 从而影响正常的细胞周期进程, 进而抑制肿瘤细胞的增殖。Megiorni等^[19]的研究也表明, miR-378a-3p能够促进横纹肌肉瘤细胞的凋亡, 且miR-378a-3p能够诱导横纹肌肉瘤细胞产生G₂期阻滞。由此可见, miR-378家族在横纹肌肉瘤的发生、发展中具有重要的调控作用。

miRNA对其靶基因的调控为转录后水平调控, 通过miRNA的种子序列结合靶基因mRNA的3'UTR区从而抑制其翻译。一个miRNA可具有多个靶基因, 一个靶基因也可由多个miRNA调控。miR-378家族中的miRNA均具有一致的种子序列, 预示着家族中各miRNA可能具有相同的靶基因。Megiorni等^[19]的研究表明, 在横纹肌肉瘤中IGF1R为miR-378a-3p的靶基因。因此推测, 在横纹肌肉瘤中IGF1R也为miR-378i的靶基因之一。IGF1R是一种跨膜受体, 在乳腺癌、直肠癌、肺癌等多种肿瘤中具有重要作用, 能够调控肿瘤细胞的增殖、侵袭、凋亡等进程^[20-23]。本研究结果显示, 转染了miR-378i的RD和A673中的IGF1R β 亚基水平平均较NC下调, 表明IGF1R基因可能为miR-378i的靶基因。

然而, 转染miR-378i的SJCRH30中的IGF1R β 的水平较NC上调, 可能因IGF1R β 还受其他调控因子的调控所致。同时, miR-378i在横纹肌肉瘤中也可能调控着其他靶基因。进一步研究并全面阐明miR-378i及miR-378家族调控横纹肌肉瘤发生、发展的分子机制, 将为miR-378i成为横纹肌肉瘤的有效治疗药物提供理论依据。

参考文献 (References)

- 1 McDowell HP. Update on childhood rhabdomyosarcoma. Arch Dis Child 2003; 88(4): 354-7.
- 2 Ognjanovic S, Linabery AM, Charbonneau B, Ross JA. Trends

- in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the united states (1975-2005). Cancer 2009; 115(18): 4218-26.
- 3 Crist WM, Anderson JR, Meza JL, Fryer C, Raney RB, Ruymann FB, et al. Intergroup rhabdomyosarcoma study-IV: results for patients with nonmetastatic disease. J Clin Oncol 2001; 19(12): 3091-102.
- 4 Pappo AS, Anderson JR, Crist WM, Wharam MD, Breitfeld PP, Hawkins D, et al. Survival after relapse in children and adolescents with rhabdomyosarcoma: A report from the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group. J Clin Oncol 1999; 17(11): 3487-93.
- 5 Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. Development 2007; 134(9): 1635-41.
- 6 Pasquinelli AE, Hunter S, Bracht J. MicroRNAs: a developing story. Curr Opin Genet Dev 2005; 15(2): 200-5.
- 7 Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer 2006; 6(11): 857-66.
- 8 Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. Trends Mol Med 2006; 12(12): 580-7.
- 9 Chen QG, Zhou W, Han T, Du SQ, Li ZH, Zhang Z, et al. MiR-378 suppresses prostate cancer cell growth through downregulation of MAPK1 *in vitro* and *in vivo*. Tumor Biol 2016; 37(2): 2095-103.
- 10 Deng HX, Guo YN, Song HJ, Xiao BX, Sun WL, Liu Z, et al. MicroRNA-195 and microRNA-378 mediate tumor growth suppression by epigenetical regulation in gastric cancer. Gene 2013; 518(2): 351-9.
- 11 Chen LT, Xu SD, Xu H, Zhang JF, Ning JF, Wang SF. MicroRNA-378 is associated with non-small cell lung cancer brain metastasis by promoting cell migration, invasion and tumor angiogenesis. Med Oncol 2012; 29(3): 1673-80.
- 12 Browne G, Dragon JA, Hong DL, Messier TL, Gordon JAR, Farina NH, et al. MicroRNA-378-mediated suppression of Runx1 alleviates the aggressive phenotype of triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells. Tumor Biol 2016; 37(7): 8825-39.
- 13 Chen XY, Wang J, Shen HJ, Lu J, Li CX, Hu DN, et al. Epigenetics, microRNAs, and carcinogenesis: functional role of microRNA-137 in uveal melanoma. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011; 52(3): 1193-9.
- 14 Knezevic I, Patel A, Sundaresan NR, Gupta MP, Solaro RJ, Nagalingam RS, et al. A novel cardiomyocyte-enriched microRNA, miR-378, targets insulin-like growth factor 1 receptor: implications in postnatal cardiac remodeling and cell survival. J Biol Chem 2012; 287(16): 12913-26.
- 15 McDowell HP, Foot AB, Ellershaw C, Machin D, Giraud C, Bergeron C. Outcomes in paediatric metastatic rhabdomyosarcoma: results of The International Society of Paediatric Oncology (SIOP) study MMT-98. Eur J Cancer 2010; 46(9): 1588-95.
- 16 Novák J, Vinklárék J, Bienertová-Vaškú J, Slabý O. MicroRNAs involved in skeletal muscle development and their roles in rhabdomyosarcoma pathogenesis. Pediatr Blood Cancer 2013; 60(11): 1739-46.
- 17 Tombolan L, Zampini M, Casara S, Boldrin E, Zin A, Bisogno G, et al. MicroRNA-27a contributes to rhabdomyo-sarcoma cell proliferation by suppressing RARA and RXRA. PLoS One 2015; 10(4): e0125171.
- 18 Rao PK, Missiaglia E, Shields L, Hyde G, Yuan B, Shepherd

- CJ, *et al.* Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells. *FASEB J* 2010; 24(9): 3427-37.
- 19 Megiorni F, Cialfi S, McDowell HP, Felsani A, Camero S, Guffanti A, *et al.* Deep sequencing the microRNA profile in rhabdomyosarcoma reveals down-regulation of miR-378 family members. *BMC Cancer* 2014; 14: 880.
- 20 Motalebnezhad M, Aghebati-Maleki L, Jadidi-Niaragh F, Nickho H, Samadi-Kafil H, Shamsasenjan K, *et al.* The insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) in breast cancer: biology and treatment strategies. *Tumour Biol* 2016; 37(9): 11711-21.
- 21 Shali H, Ahmadi M, Kafil HS, Dorosti A, Yousefi M. IGF1R and c-met as therapeutic targets for colorectal cancer. *Biomed Pharmacother* 2016; 82: 528-36.
- 22 Nurwidya F, Andarini S, Takahashi F, Syahrudin E, Takahashi K. Implications of insulin-like growth factor 1 receptor activation in lung cancer. *Malays J Med Sci* 2016; 23(3): 9-21.
- 23 Werner H, Sarfstein R, LeRoith D, Bruchim I. Insulin-like growth factor 1 signaling axis meets p53 genome protection pathways. *Front Oncol* 2016; 6: 159.