

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.06.0727

· 论 著 ·

MicroRNA-150 在结膜黏膜相关淋巴组织淋巴瘤增殖、迁移及侵袭中的作用

李玉珍, 钱 昱, 单 彧, 梁文君, 魏锐利*

第二军医大学长征医院眼科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察结膜黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤中 microRNA-150(miR-150)的表达,探讨 miR-150 在结膜 MALT 淋巴瘤中影响肿瘤细胞增殖、迁移与侵袭的机制。**方法** 使用 qPCR 法检测第二军医大学长征医院收治的 3 例结膜 MALT 淋巴瘤患者肿瘤组织及瘤旁组织中 miR-150 及其可能的下游靶分子 *Cbl-b* 的表达。将 miR-150 抑制物和阴性对照转染人多发性骨髓瘤细胞株 RPMI 8226,采用 CCK-8 法和流式细胞术研究 miR-150 对 RPMI 8226 细胞增殖和凋亡的影响,通过 Transwell 实验研究 miR-150 对 RPMI 8226 细胞迁移和侵袭的影响,用蛋白质印迹法检测 miR-150 对 RPMI 8226 细胞中 *Cbl-b* 表达的调控。**结果** 与瘤旁组织相比,结膜 MALT 淋巴瘤组织中 miR-150 表达上调($P<0.05$, $P<0.01$);抑制 miR-150 后,RPMI 8226 细胞的增殖受到抑制,细胞凋亡明显增加,迁移和侵袭能力降低,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。在结膜 MALT 淋巴瘤组织中,miR-150 下游靶基因 *Cbl-b* 表达下调($P<0.01$);抑制 miR-150 后,RPMI 8226 细胞内 *Cbl-b* 蛋白的表达上调($P<0.01$)。**结论** MiR-150 对淋巴瘤细胞的增殖、迁移和侵袭有促进作用,其表达上调参与了 MALT 淋巴瘤的发生。其机制可能与 miR-150 对下游分子 *Cbl-b* 的抑制性调控有关。

[关键词] 结膜肿瘤;黏膜相关淋巴组织淋巴瘤;microRNA-150;*Cbl-b*;细胞增殖;细胞迁移;肿瘤侵袭

[中图分类号] R 739.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)06-0727-07

Role of microRNA-150 in proliferation, migration and invasion of conjunctival mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma

LI Yu-zhen, QIAN Yu, SHAN Yu, LIANG Wen-jun, WEI Rui-li*

Department of Ophthalmology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of microRNA-150 (miR-150) in conjunctival mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma, so as to investigate its mechanism in proliferation, migration and invasion of conjunctival MALT lymphoma. **Methods** The expressions of *miR-150* and *Cbl-b*, a possible downstream molecule of miR-150, were measured by qPCR in MALT lymphoma tissues and precancerous tissues collected from 3 patients with conjunctival MALT lymphoma in Changzheng Hospital of Second Military Medical University. Then, we transfected miR-150 inhibitor and negative control into human multiple myeloma cell lines RPMI 8226 by cell transfection. CCK-8 assay and flow cytometry (FCM) method were used to investigate the role of miR-150 in the proliferation and apoptosis of RPMI 8226 cells. Transwell assay was used to analyze the effect of miR-150 on the migration and invasion of RPMI 8226 cells. Western blotting analysis was used to examine the regulation of miR150 on *Cbl-b* expression in RPMI 8226 cells. **Results** The expression of miR-150 was significantly increased in the conjunctival MALT lymphoma tissues compared with precancerous tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with negative control group, the proliferation of RPMI 8226 cells was significantly repressed ($P<0.01$), the apoptosis was significantly increased ($P<0.01$), and the migration and invasion were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$) after transfection of miR-150 inhibitor. The

[收稿日期] 2017-02-24 **[接受日期]** 2017-05-31

[基金项目] 上海市自然科学基金(14ZR1414000),上海市卫生和计划生育委员会科研课题面上项目(201445)。Supported by Natural Science Foundation of Shanghai (14ZR1414000) and Program of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (201445)。

[作者简介] 李玉珍,博士,讲师、主治医师。E-mail: liyuzhen100@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885921, E-mail: ruiwei@163.com

expression of Cbl-b was significantly up-regulated in MALT lymphoma tissues, and was significantly increased after inhibiting miR-150 expression. **Conclusion** Up-regulated miR-150 can promote the proliferation, migration and invasion of lymphoma cells and is involved in the generation of conjunctival MALT lymphoma, which may be mediated by inhibiting its downstream target gene Cbl-b.

[**Key words**] conjunctival neoplasms; mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma; microRNA-150; Cbl-b; cell proliferation; cell migration; neoplasm invasiveness

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(6): 727-733]

眼附属器淋巴瘤是临床比较常见的一种眼眶恶性肿瘤。原发于眼附属器的淋巴瘤 90% 以上是惰性的小 B 细胞来源肿瘤,以黏膜相关淋巴组织(mucosa-associated lymphoid tissue, MALT)淋巴瘤最为常见^[1-2]。有证据表明 MALT 淋巴瘤的发病机制可能与慢性病原微生物(如细菌、病毒)或自身免疫反应的刺激有关^[3],但目前对 MALT 淋巴瘤的发病机制尚不是十分清楚。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类普遍存在于动植物中、长度约为 22 个核苷酸的内源性非编码小分子 RNA,通过转录后调控 mRNA 参与细胞增殖、分化、凋亡和胚胎发育等一系列重要生命进程^[4]。MiR-150 定位于人类染色体 19q13.33,对 B 细胞和 T 细胞的成熟、胚胎发育以及干细胞分化等具有重要作用^[5]。我们前期研究表明,miR-150 在 MALT 淋巴瘤中表达异常^[6],提示 miR-150 可能参与 MALT 淋巴瘤的发生和发展。Cbl 家族是重要的 E3 泛素连接酶,其成员 Cbl-b 具有抑制肿瘤发生、发展的作用,且该作用与 miRNA 有关,如 Cbl-b 可通过调控 ZEB2 和 miR-200c 抑制胃癌细胞中胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor 1, IGF-1)诱导的上皮间质转化^[7],还可作为 miR-891b 的下游靶点抑制胰腺癌细胞的增殖^[8]。本研究旨在探讨 miR-150 是否参与结膜 MALT 淋巴瘤的发生、发展,以及 Cbl-b 是否作为 miR-150 下游分子在结膜 MALT 淋巴瘤的增殖、迁移和侵袭过程中发挥调控作用,为进一步了解 MALT 淋巴瘤的发生机制及寻找潜在的治疗靶点提供依据。

1 材料和方法

1.1 标本来源及 Cbl-b、miR-150 检测

1.1.1 标本来源 本研究中 3 例眼附属器结膜 MALT 淋巴瘤样本均采集于第二军医大学长征医院眼科 2016 年 7 月至 10 月收治的结膜 MALT 淋巴瘤患者。患者均为男性,年龄 40~70 岁,发病时

间 3 个月至 6 年。采集患者行前路经皮开眶取瘤术所获取的 MALT 淋巴瘤,以及少量瘤旁组织。所有患者除患有结膜 MALT 淋巴瘤外无其他疾病。本研究经第二军医大学长征医院伦理委员会审批通过。所有患者均签署知情同意书。

1.1.2 qPCR 检测 Cbl-b、miR-150 表达 用 TRIzol 试剂(Invitrogen)抽提 MALT 淋巴瘤组织及其瘤旁组织的总 RNA,通过 PrimeScrip 反转录试剂盒将 1 μg 总 RNA 转录成单链 cDNA。于 8 联管中配制 qPCR 体系: JumpStar Taq ReadyMix (Sigma) 10 μL, Evagreen dye 荧光染料 (Biotium) 1 μL, cDNA 25 ng, 引物混合物(各 5 μmol/L) 0.8 μL, 加灭菌水至 20 μL。qPCR 仪为 Roche 公司产品。qPCR 程序如下: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 30 s, 共 43 个循环; 95 °C 30 s; 65 °C 2 min; 然后按照 0.11 °C/s 升温至 95 °C, 在升温过程每升高 0.2 °C 采集一次荧光值; 最后降温至 20 °C 结束反应。qPCR 引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

Tab 1 Primer sequence for qPCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
MiR-150	RT: GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACC ACT GG
	F: ACT GTC TCC CAA CCC TTG TA
	R: GTG CAG GGT CCG AGG T
Cbl-b	F: CAC CCT TCT CCC AAG CAT AA
	R: AGA CCG AAC AGG AGC TTT GA
βActin	F: GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT
	R: AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT

RT: Reverse transcription; F: Forward; R: Reverse

1.2 细胞培养及相关检测

1.2.1 试剂和仪器 MiR-150 抑制物序列(5'-CAC UGG UAC AAG GGU UGG GAG A-3')、模拟物序列(sense 5'-UCU CCC AAC CCU UGU ACC AGU G-3', antisense 5'-CUG GUA CAA GGG UUG GGA GAU U-3')和阴性对照(货号

B04005)由上海吉玛制药技术有限公司代为合成, CCK-8试剂盒(日本同仁化学研究所),胎牛血清(FBS)。RPMI 1640培养基(Gibco),Matrigel基质胶(Biotech),Hoechst 33342(Sigma),DMR1E-C转染试剂(Invitrogen),Lipofectamine 3000转染试剂、Opti-MEM培养液(Thermo),兔抗-Cbl-b、小鼠抗-GAPDH(Santa Cruz)。酶标仪(Thermo),Transwell板(Corning),高内涵成像(Perkin Elmer),流式细胞仪(Beckman),离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2.2 RPMI 8226细胞培养 人多发性骨髓瘤细胞 RPMI 8226 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。细胞为悬浮细胞,常规培养于含 10% FBS的 RPMI 1640 培养液中,细胞每 4 d 按照 1:3 比例传代。

1.2.3 RPMI 8226细胞转染 消化收集对数生长期的 RPMI 8226 细胞,PBS 重悬、血细胞计数板计数,弃上清,用 Opti-MEM 培养液重悬细胞;以每孔 3×10^5 的细胞密度接种于 24 孔板。待贴壁后使用 Lipofectamine 3000 和 DMR1E-C 转染试剂将 miR-150 抑制物转染至细胞,转染 24、48 h 后确定转染效率。

1.2.4 细胞增殖实验 收集对数生长期的细胞,以每孔 5×10^4 的细胞密度接种于 96 孔板,设置 4 复孔, 37°C 、5% CO_2 条件下培养 24 h。将 miR-150 抑制物和阴性对照分别转染至细胞,处理 24、48、72、96、120 h 后,加入 CCK-8 溶液 $10\ \mu\text{L}$,于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱内继续孵育 4 h,酶标仪检测(波长 450 nm),绘制生长曲线,并计算细胞相对增殖率[实验组光密度(D)值/空白对照组 D 值 $\times 100\%$]。

1.2.5 细胞凋亡实验 取对数生长期的 RPMI 8226 细胞,将 miR-150 抑制物和阴性对照分别转染至细胞,转染 72 h 后,收集细胞, $112 \times g$ 离心 5 min,用预冷的 PBS 缓冲液洗 2 次;加入 $100\ \mu\text{L}$ 结合缓冲液,加入 7-AAD 和 PE 各 $5\ \mu\text{L}$,室温避光孵育 30 min;加入 $400\ \mu\text{L}$ 结合缓冲液上流式细胞仪检测。

1.2.6 细胞侵袭和迁移实验 细胞侵袭实验:在 Transwell 板上室底部中央垂直加入 $100\ \mu\text{L}$ Matrigel 基质胶, 37°C 温育 30 min。取对数生长期的 RPMI 8226 细胞,转染 miR-150 抑制物和阴性对照。转染 72 h 后, $112 \times g$ 离心 3 min,弃上清;用 PBS 重悬细胞,离心弃上清;用 Opti-MEM 重悬、调整细胞密度为 $3 \times 10^5/\text{mL}$,在 Transwell 板下室加入 $600\ \mu\text{L}$

含 20% FBS 的培养液,上室加入 $150\ \mu\text{L}$ 细胞悬液, 37°C 、5% CO_2 、饱和湿度条件下继续培养 24 h。后吸去上室细胞悬液,取出上室,棉签轻轻擦去上室贴壁细胞,将上室放入 Hoechst 33342 染液中室温染色 5 min,重新放入新的 Transwell 板中,于 20 倍镜下随机选取 10 个视野拍照并分析。

细胞迁移实验:除 Transwell 板上室底部不加 Matrigel 基质胶外,其余步骤同细胞侵袭实验。

1.2.7 蛋白质印迹检测 RPMI 8226 细胞分别转染 miR-150 模拟物、miR-150 抑制物和阴性对照 72 h 后,离心收集细胞并置于 RIPA 裂解液中,研磨后, $12\ 000 \times g$ 4°C 离心 15 min,取上清。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取等量的蛋白样品行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后转移至 PVDF 膜上。将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,随后 4°C 标记一抗(小鼠抗-Cbl-b, 1:300;小鼠抗-GAPDH, 1:5 000) 24 h;然后 TBST 清洗 3 次,每次 10 min;再于二抗中室温孵育 2 h。TBST 清洗 3 次后,使用 ECL 试剂盒显色。蛋白条带灰度值使用 ImageJ 软件进行分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示,瘤旁和肿瘤组织两组间均数的比较采用配对 t 检验,其余实验两组间均数比较采用 Student's t 检验,两组以上均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),增殖率的比较采用双因素方差分析(two-way ANOVA)。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 MiR-150 在眼附属器结膜 MALT 淋巴瘤组织中的表达 结果显示,与瘤旁组织相比,3 例患者淋巴瘤组织中 miR-150 的表达水平平均上调($P < 0.05$, 图 1)。

2.2 miR-150 抑制物转染效率测定 RPMI 8226 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液中,为悬浮细胞,圆形,状态较好(图 2A、2B)。转染 48 h 后,荧光显微镜观察 Lipofectamine 3000 和 DMR1E-C 转染 miRNA-FAM 的表达情况。结果显示, Lipofectamine 3000 转染组细胞内未见 FAM 标记的 mi-RNA 信号(图 2C);而 DMR1E-C 转染组中, DMR1E-C $1.5\ \mu\text{L}$ 、miRNA $2\ \mu\text{L}$ 、无血清的转染效果最好(图 2D)。

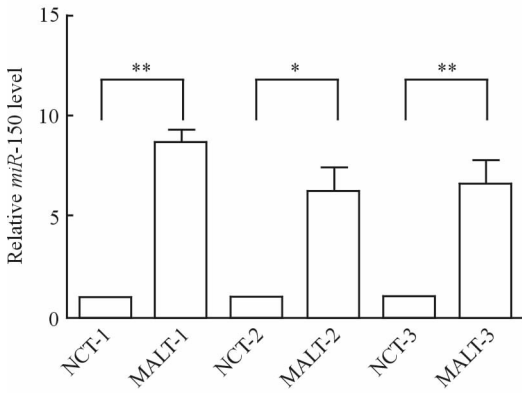


图1 qPCR检测MALT淋巴瘤中miR-150的表达

Fig 1 MiR-150 levels in MALT lymphoma tissues by qPCR

MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue; NCT: Negative adjacent control tissue; 1,2 and 3 indicate the first, second and third patients, respectively. $n=3, \bar{x} \pm s_x$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

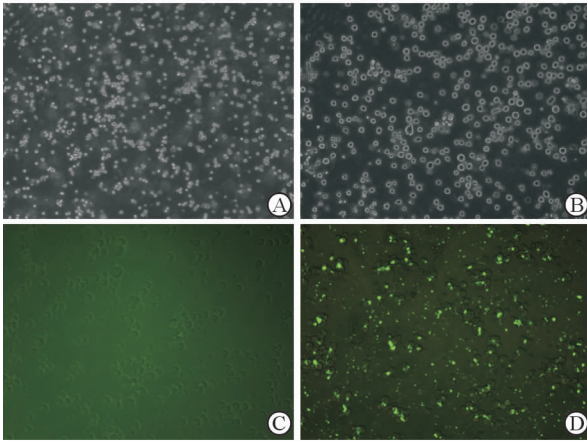


图2 RPMI 8226细胞形态及miR-150抑制物的转染效率

Fig 2 Morphology of RPMI 8226 cells and transfection efficiency of miR-150 inhibitor

A, B: Cultured RPMI 8226 cells; C: RPMI 8226 cells transfected with Lipofectamine 3000 and miRNA-FAM; D: RPMI 8226 cells transfected with DMRIE-C and miRNA-FAM. Original magnification: $\times 40$ (A), $\times 80$ (B-D)

2.3 抑制miR-150对RPMI 8226细胞增殖的影响 与阴性对照组相比,转染miR-150抑制物可以抑制RPMI 8226细胞的增殖,在120 h时差异有统计学意义($P < 0.01$,图3)。相对于阴性对照组,转染miR-150抑制物24、48、72、96、120 h后,细胞相对增殖率分别为121.4%、103.6%、100.7%、87.5%、85.8%。

2.4 抑制miR-150对RPMI 8226细胞迁移与侵袭的影响 通过Transwell实验检测抑制miR-150对RPMI 8226细胞迁移的影响。结果显示,转染72 h后,miR-150抑制物组穿膜细胞数仅为阴性对照组

的(57.7±7.8)%,两组间差异有统计学意义($P < 0.01$,图4A、4C)。通过在Transwell板上室底部中央铺Matrigel基质胶,检测抑制miR-150对RPMI 8226细胞侵袭的影响。结果显示,转染72 h后,miR-150抑制剂组穿膜细胞数仅为阴性对照组的(69.7±1.7)%,两组间差异有统计学意义($P < 0.05$,图4B、4D)。说明抑制miR-150对RPMI 8226细胞的迁移与侵袭均具有抑制作用。

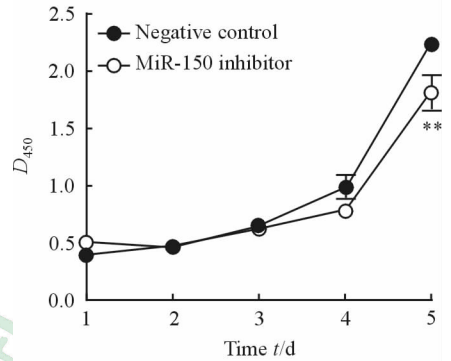


图3 转染miR-150抑制剂后RPMI 8226细胞的增殖曲线

Fig 3 The proliferation curve of RPMI 8226 cells transfected with MiR-150 inhibitor

** $P < 0.01$ vs negative control. $n=4, \bar{x} \pm s_x$

2.5 抑制miR-150对RPMI 8226细胞凋亡的影响 通过流式细胞术检测抑制miR-150对RPMI 8226细胞凋亡的影响。结果显示,正常组细胞凋亡率为(0.07±0.01)%,阴性对照组凋亡率为(6.35±0.64)%,而miR-150抑制物组凋亡率为(17.1±0.42)%。与正常组和阴性对照组相比,miR-150抑制物组细胞凋亡增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,图5)。

2.6 Cbl-b在结膜MALT淋巴瘤组织中的表达以及miR-150对Cbl-b的调控作用 通过qPCR检测3例结膜MALT淋巴瘤患者肿瘤组织中Cbl-b的表达情况。结果显示,与瘤旁组织相比,3例患者MALT淋巴瘤中Cbl-b mRNA的表达水平分别下调了约76%、80%和86% ($P < 0.01$,图6)。为了进一步研究miR-150对Cbl-b的调控作用,通过蛋白质印迹检测抑制和过表达miR-150后RPMI 8226细胞中Cbl-b蛋白的表达。结果显示,与阴性对照组相比,RPMI 8226细胞转染miR-150模拟物后Cbl-b蛋白的表达呈下调趋势但差异无统计学意义($P > 0.05$),而转染miR-150抑制物后Cbl-b蛋白表达上调($P < 0.01$)。

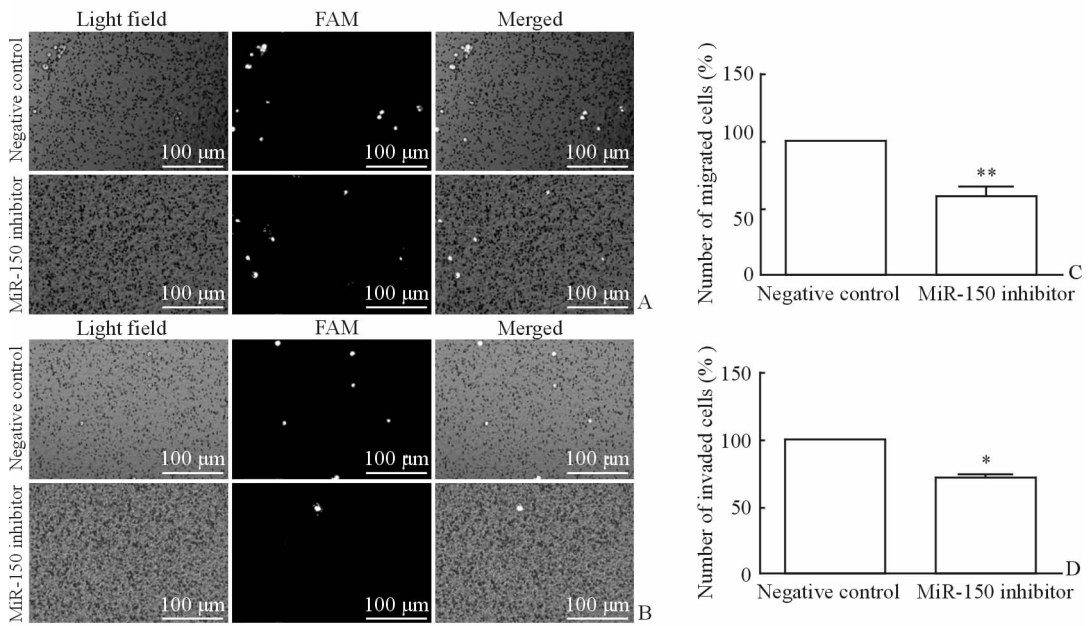


图 4 转染 miR-150 抑制物对 RPMI 8226 细胞迁移和侵袭的影响

Fig 4 Effect of miR-150 inhibitor on the migration and invasion of RPMI 8226 cells

A, C; Results of migration by Transwell assay; B, D; Results of invasion by Transwell assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs negative control. $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$

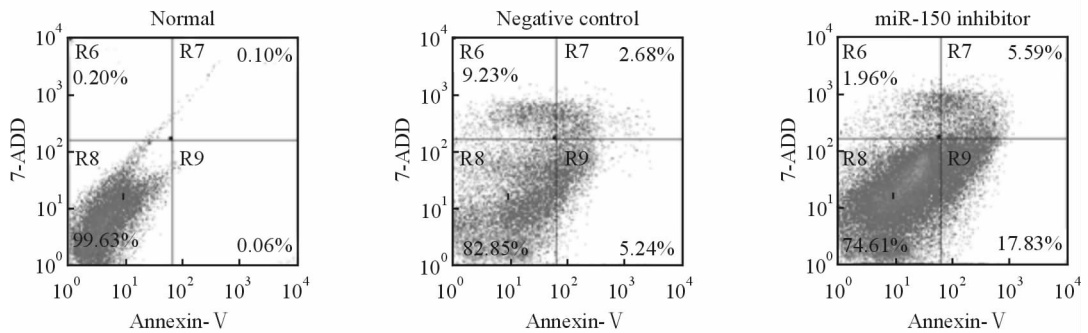


图 5 转染 miR-150 抑制物对 RPMI 8226 细胞凋亡的影响

Fig 5 Apoptosis in RPMI 8226 cells after treatment with miR-150 inhibitor

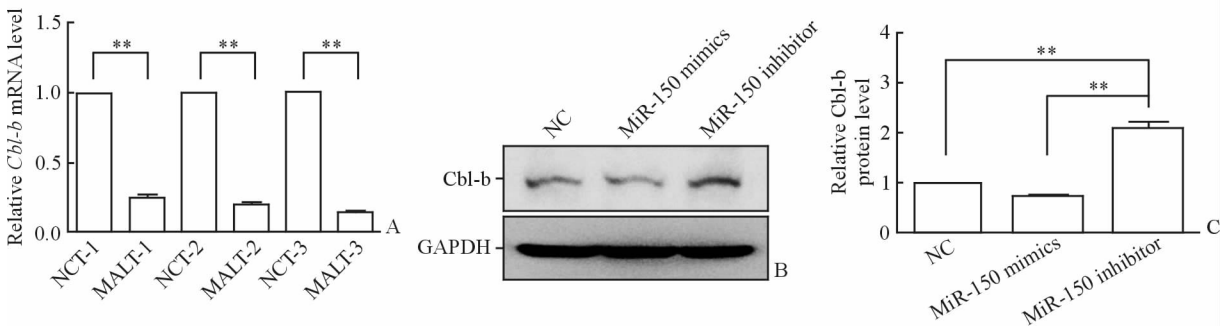


图 6 MALT 淋巴瘤组织中 *Cbl-b* mRNA 的表达以及 miR-150 对 RPMI 8226 细胞中 *Cbl-b* 蛋白表达的影响

Fig 6 *Cbl-b* mRNA expression in MALT lymphoma tissues and effect of miR-150

on *Cbl-b* protein expression in RPMI 8226 cells

A; The expression of *Cbl-b* mRNA related to NCT by qPCR; B, C; Western blotting results of the expression of *Cbl-b* protein. MALT: Mucosa-associated lymphoid tissue; NCT: Negative adjacent control tissue; NC: Normal Control. 1, 2 and 3 indicate the first, second and third patients, respectively. ** $P < 0.01$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$

3 讨论

作为一种在进化过程中高度保守的内源性非编码小RNA,miRNA主要通过转录后的基因沉默调控细胞的生长、增殖、分化、凋亡等生物学过程^[9]。目前研究发现多个miRNA的异常表达参与了淋巴瘤的发生和发展,如miR-15a-16-1的下调或缺失能诱发慢性淋巴细胞白血病;miR-17-92的过表达能加快淋巴瘤的发展;miR-21过表达能诱发前B细胞淋巴瘤,抑制miR-21则导致肿瘤消退^[4, 9-10]。我们前期研究发现,MALT淋巴瘤中miR-200a、miR-200b、miR-200c表达下调,并通过上调cyclin E2参与MALT淋巴瘤的发生、发展^[6]。通常认为miR-150是一种在造血系统中具有肿瘤抑制作用的小片段RNA,研究发现慢性淋巴细胞白血病、大B细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和自然杀伤细胞淋巴瘤等低表达miR-150,而过表达miR-150能抑制这些淋巴瘤细胞的生长^[9, 11-12]。但是,miR-150在滤泡性淋巴瘤中表达上调^[12]。

为了探讨miR-150在MALT淋巴瘤中的作用及机制,我们首先通过qPCR方法检测本院收治的3例结膜MALT淋巴瘤组织中miR-150的表达。结果表明,与瘤旁组织相比,MALT淋巴瘤组织中miR-150表达均存在不同程度的上调。这一结果与我们的前期研究^[6]以及Gebauer等^[13]的研究结果一致。此外,Thorns等^[4]发现miR-150在胃黏膜相关淋巴组织结外边缘区B细胞淋巴瘤中也具有较高水平的表达。上述研究提示miR-150可能是一种潜在的检测MALT淋巴瘤的肿瘤标志物。由于临床上结膜MALT淋巴瘤常被误诊为慢性结膜炎或过敏性结膜炎,该结果有望为临床上对结膜MALT淋巴瘤的诊断提供依据。

MiR-150对不同的肿瘤细胞具有不同的细胞生物学功能,如miR-150对直肠癌肿瘤细胞的侵袭和迁移具有抑制作用^[14],而对肺癌细胞的增殖和迁移却具有促进作用^[5]。在MALT淋巴瘤中上调的miR-150的细胞生物学功能尚不清楚。MALT淋巴瘤是一种发生于结外边缘区的B细胞淋巴瘤,其主要细胞类型有滤泡性、套细胞、弥漫性大B细胞和小淋巴细胞性淋巴瘤。RPMI 8226细胞是一种常用的人源性B细胞淋巴瘤细胞系,在本研究中用于

探讨眼附属器MALT淋巴瘤的发生机制。通过在RPMI 8226细胞中转染miR-150抑制物研究miR-150对肿瘤细胞的调控机制,结果显示,与阴性对照组相比,抑制miR-150可以抑制RPMI 8226细胞的增殖、促进凋亡,并且抑制RPMI 8226细胞的迁移和侵袭。表明miR-150对RPMI 8226细胞的迁移和侵袭均具有促进作用。以上结果提示,miR-150表达上调能够促进RPMI 8226细胞增殖、迁移和侵袭,从而抑制细胞的凋亡,进而促进MALT淋巴瘤的发生、发展。

既往研究表明,miR-150通过调控下游靶基因参与T细胞和B细胞的发育^[15]。Ghisi等^[16]发现,miR-150调控Notch3的3'UTR抑制T细胞的发育。我们前期通过targetscan程序发现结膜MALT淋巴瘤中miR-150的靶点蛋白包括Cbl-b等信号分子。Cbl-b属于E3泛素连接酶,包含N末端酪氨酸激酶结合(TKB)结构域、E3泛素化(RING)结构域、C末端的脯氨酸富集区和泛素相关结合域(UBA)^[17]。研究表明,Cbl-b通过TKB结合磷酸化的表皮生长因子受体(EGFR)、血管内皮生长因子受体2(VEGFR2)或血小板源性生长因子受体(PDGFR)胞内段,泛素化并促进这些受体内吞至溶酶体降解或回收利用,防止细胞增殖信号过度活化从而抑制肿瘤发生^[18]。本研究发现,3例MALT淋巴瘤患者肿瘤组织中Cbl-b mRNA的表达下调。我们推测Cbl-b的下调可能是由于miR-150的上调所致,Cbl-b的下调参与到MALT淋巴瘤的发生和发展过程。细胞实验结果进一步验证了我们的推测,抑制miR-150可以显著上调Cbl-b蛋白,而给予miR-150模拟物则部分抑制了Cbl-b蛋白的表达。

本研究结果表明,miR-150在结膜MALT淋巴瘤中高表达,并对RPMI 8226细胞的增殖、迁移和侵袭具有促进作用,对细胞凋亡具有抑制作用,miR-150下游分子Cbl-b的表达在结膜MALT淋巴瘤中显著下调。以上研究表明miR-150在结膜MALT淋巴瘤的发生、发展过程中具有促进作用,为将miR-150作为一个肿瘤标志物用于结膜MALT淋巴瘤的临床诊断提供了理论依据,并提示miR-150可能成为治疗结膜MALT淋巴瘤的一个潜在靶点。

[参考文献]

[1] DEMIRCI H, SHIELDS C L, KARATZA E C,

- SHIELDS J A. Orbital lymphoproliferative tumors; analysis of clinical features and systemic involvement in 160 cases[J]. *Ophthalmology*, 2008, 115: 1626-1631.
- [2] STACY R C, JAKOBIEC F A, HERWIG M C, SCHOENFIELD L, SINGH A, GROSSNIKLAUS H E. Diffuse large B-cell lymphoma of the orbit: clinicopathologic, immunohistochemical, and prognostic features of 20 cases[J]. *Am J Ophthalmol*, 2012, 154: 87-98.
- [3] KELLEY S R. Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) variant of primary rectal lymphoma: a review of the English literature [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2017, 32: 295-304.
- [4] THORNS C, KUBA J, BERNARD V, SENFT A, SZYMCZAK S, FELLER A C, et al. Deregulation of a distinct set of microRNAs is associated with transformation of gastritis into MALT lymphoma[J]. *Virchows Arch*, 2012, 460: 371-377.
- [5] CAO M, HOU D, LIANG H, GONG F, WANG Y, YAN X, et al. miR-150 promotes the proliferation and migration of lung cancer cells by targeting SRC kinase signalling inhibitor 1[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50: 1013-1024.
- [6] CAI J, LIU X, CHENG J, LI Y, HUANG X, LI Y, et al. MicroRNA-200 is commonly repressed in conjunctival MALT lymphoma, and targets cyclin E2 [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2012, 250: 523-531.
- [7] LI H, XU L, LI C, ZHAO L, MA Y, ZHENG H, et al. Ubiquitin ligase Cbl-b represses IGF-1-induced epithelial mesenchymal transition via ZEB2 and microRNA-200c regulation in gastric cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13: 136.
- [8] DONG Q, LI C, CHE X, QU J, FAN Y, LI X, et al. MicroRNA-891b is an independent prognostic factor of pancreatic cancer by targeting Cbl-b to suppress the growth of pancreatic cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 82338-82353.
- [9] HOTHER C, RASMUSSEN P K, JOSHI T, REKER D, RALFKLÆR U, WORKMAN C T, et al. MicroRNA profiling in ocular adnexal lymphoma: a role for MYC and NFKB1 mediated dysregulation of microRNA expression in aggressive disease[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54: 5169-5175.
- [10] ARRIBAS A J, CAMPOS-MARTÍN Y, GÓMEZ-ABAD C, ALGARA P, SÁNCHEZ-BEATO M, RODRIGUEZ-PINILLA M S, et al. Nodal marginal zone lymphoma: gene expression and miRNA profiling identify diagnostic markers and potential therapeutic targets[J/OL]. *Blood*, 2012, 119: e9-e21. doi: 10.1182/blood-2011-02-339556.
- [11] ZHAO J J, LIN J, LWIN T, YANG H, GUO J, KONG W, et al. MicroRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma[J]. *Blood*, 2010, 115: 2630-2639.
- [12] FERREIRA B I, GARCÍA J F, SUELA J, MOLLEJO M, CAMACHO F I, CARRO A, et al. Comparative genome profiling across subtypes of low-grade B-cell lymphoma identifies type-specific and common aberrations that target genes with a role in B-cell neoplasia[J]. *Haematologica*, 2008, 93: 670-679.
- [13] GEBAUER N, KUBA J, SENFT A, SCHILLERT A, BERNARD V, THORNS C. MicroRNA-150 is up-regulated in extranodal marginal zone lymphoma of MALT type[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2014, 11: 51-56.
- [14] MA Y, ZHANG P, WANG F, ZHANG H, YANG J, PENG J, et al. miR-150 as a potential biomarker associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer[J]. *Gut*, 2012, 61: 1447-1453.
- [15] ZHOU B, WANG S, MAYR C, BARTEL D P, LODISH H F. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 7080-7085.
- [16] GHISI M, CORRADIN A, BASSO K, FRASSON C, SERAFIN V, MUKHERJEE S, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development; targeting of NOTCH3 by miR-150[J]. *Blood*, 2011, 117: 7053-7062.
- [17] ZHANG J, LIU Q, LANGDON W Y. Cbl-b; roles in T cell tolerance, proallergic T cell development, and cancer immunity[J/OL]. *Inflamm Cell Signal*, 2014, 1: e146. doi: 10.14800/ics.146.
- [18] RAO N, DODGE I, BAND H. The Cbl family of ubiquitin ligases: critical negative regulators of tyrosine kinase signaling in the immune system[J]. *J Leukoc Biol*, 2002, 71: 753-763.