

MiR-150 缺失增强小鼠 NKT 细胞 IFN- γ 产生并抑制黑色素瘤细胞的肺转移 *

郑全辉^{1)**} 张爱红²⁾ 郑爱华²⁾ 么文博³⁾ 高金明⁴⁾ 张庆波¹⁾ 李娟¹⁾

¹⁾ 河北联合大学基础医学院, 唐山 063000; ²⁾ 河北省唐山市工人医院, 唐山 063000;

³⁾ 河北省唐山市人民医院, 唐山 063000; ⁴⁾ 河北省唐山迁西中医院, 唐山 063000)

摘要 CD1d 限制性 NKT 细胞(自然杀伤 T 细胞)是一群具有免疫调节功能的 T 细胞亚群, 在调控多种免疫应答中发挥重要作用. MicroRNAs 介导的 RNA 干扰已被证明是调控 NKT 细胞发育和功能的关键分子机制, 然而特异 microRNA 在 NKT 细胞发育和功能中的作用目前仍不清楚. 在本研究中, 我们采用 miR-150 基因敲除小鼠以及流式细胞术、ELISA 等方法, 观察 miR-150 对小鼠 NKT 细胞发育和功能的影响. 结果表明: miR-150 基因缺失致小鼠胸腺 NKT 细胞数量减少, 但不影响外周 NKT 细胞的数量; 活化后 miR-150 敲除小鼠 NKT 细胞与野生型小鼠 NKT 细胞相比, IFN- γ 产生增加. 进一步采用小鼠黑色素瘤模型观察 miR-150 对肿瘤细胞转移的影响, 发现 miR-150 敲除显著增强半乳糖神经鞘氨醇(α -Galcer)对小鼠黑色素瘤细胞肺转移的抑制效果. 上述结果为特异 microRNA 调控 NKT 细胞发育和功能的研究提供了新的线索.

关键词 miR-150, NKT 细胞, IFN- γ , 黑色素瘤

学科分类号 R392.11

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00493

NKT 细胞(自然杀伤 T 细胞)是 MHC I 类样分子 CD1d 依赖的自然杀伤性 T 细胞(CD1d dependent natural killer T cells), 因其细胞表面既表达 TCR α 链(小鼠: V α 14-J α 18; 人: V α 24-J α 18)和 V β 链(小鼠: V β 8.2、V β 7、V β 2; 人: V β 11), 同时又表达 NK 细胞受体如 NK1.1、IL-2/15 受体 β (CD122)等而命名^[1]. NKT 细胞产生于胸腺 CD4+CD8+双阳性(DP) T 细胞, 在传统 T 细胞所分布的各组织中都有 NKT 细胞的分布, 但其主要分布于肝、脾、骨髓、胸腺、淋巴结以及外周血中^[2]. NKT 细胞的抗原识别与传统的 T 细胞不同, 不能识别由经典的 MHC I、II 类分子提呈的抗原肽, 而只识别由细胞表面 CD1d 分子提呈的脂类抗原. 海绵提取物中发现 α -半乳糖神经鞘氨醇(α -Galcer)能特异激活 NKT 细胞. 活化 NKT 细胞可迅速产生大量 Th1 和 Th2 型细胞因子如 IL-4 和 IFN- γ , 从而在抗肿瘤、抗感染、抑制自身免疫性疾病及移植免疫耐受中发挥重要的作用^[3-5].

MicroRNAs (miRNAs) 属于短链非编码 RNA, 长度为 20~23 nt, 通过与靶 mRNA 3'端非翻译区

结合, 导致靶 mRNA 降解或抑制其翻译, 负向调节靶基因的表达^[6]. Zhou 等^[7]发现 microRNAs 在 NKT 细胞的发育和功能调控中发挥关键作用, 然而特异 microRNA 在 NKT 细胞发育和功能中的作用目前还不清楚. miR-150 主要在淋巴细胞中表达, Zhou 等^[8]发现, miR-150 缺失致 B 细胞异常扩增, 体液免疫应答显著增强, 但对 CD4 和 CD8 传统 T 细胞的发育和功能没有影响. 有意思的是, Bezman 等^[9]最近又观察到 miR-150 敲除小鼠 NK 细胞数量减少, IFN- γ 产生降低. 以上结果表明, miR-150 在不同淋巴细胞发育和功能中发挥不同的作用. 在此研究中, 我们发现 miR-150 基因敲除导致小鼠胸腺 NKT 细胞数量减少, 但不影响外周 NKT 细胞数量. α -Galcer 活化 miR-150KO 小鼠 NKT 与 WT 小鼠 NKT 细胞相比, IFN- γ 产生显著

* 河北省唐山市科技局指令性科研项目(12140209A-44).

** 通讯联系人.

Tel: 0315-3725918, E-mail: zquanhui@yahoo.com

收稿日期: 2012-10-10, 接受日期: 2012-11-13

增加. 更为重要的是, 采用 NKT 细胞特异激活剂 α -Galcer 体内处理治疗黑色素瘤细胞的肺转移, 发现与 WT 小鼠相比, miR-150KO 小鼠能够显著增强 α -Galcer 对黑色素瘤细胞肺转移的抑制效果.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠. C57BL/6 背景的 miR-150 基因敲除小鼠(miR-150KO)和野生型对照 C57BL/6 小鼠(WT)由 Qing-Sheng Mi 博士(美国密歇根亨利·福特医院)惠赠, 并在河北联合大学 SPF 级小鼠房繁殖、饲养. 实验选取 5~8 周龄、性别匹配小鼠进行研究. 小鼠实验操作按河北联合大学实验动物管理委员会规定进行. miR-150 敲除小鼠基因型鉴定采用下列引物: 上游 5' CAAGGACA GGAACCCTT-CAGCA 3'; 下游 5' CCATGATGCCTGGAAGAC-ATTTC 3'. miR-150KO 小鼠产生 262 bp 片段, WT 小鼠产生 866 bp 片段.

1.1.2 试剂. MirVana miRNA 提取试剂盒和 TaqMan microRNA 检测试剂盒购自美国 Ambion 公司; α -半乳糖神经鞘氨醇(α -Galcer)及荧光素标记的 CD1d- α -Galcer 四聚体购自日本麒麟公司; 荧光素标记的抗小鼠 TCR- β (H57 - 597)、抗 B220 (RA3-6B2)、抗 IL-4 (11B11)、抗 IFN- γ (XMG1.2) 抗体和细胞内染色试剂盒购自 BD 公司; 大鼠抗小鼠 FcR 单克隆抗体(2.4G2)取自 2.4G2 杂交瘤细胞培养上清; RPMI1640 培养液、IFN- γ 和 IL-4 ELISA 检测试剂盒购自北京达科为生物技术公司; 引物由上海生物工程服务公司合成.

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪分析. 分别分离小鼠胸腺、脾、肝脏、骨髓和淋巴结并制成单细胞悬液, 用含 2% 小牛血清的 PBS 染色缓冲液洗涤 2 次, 加入 2.4G2 封闭, 4℃ 30 min, 然后直接加入 10 μ l (1:10~1:100 稀释的)荧光素标记的单克隆抗体, 4℃ 30 min. 染色缓冲液洗涤 2 次, 采用 BD-LSR II 流式细胞仪收集标本, CELLQuest Pro(BD Biosciences) 软件进行数据分析.

1.2.2 NKT 细胞活化及细胞内染色分析. 将 α -Galcer 首先溶于二甲基亚砜(DMSO), 终浓度为 100 mg/L, 取 2 μ g α -Galcer 于 100 μ l 磷酸盐缓冲液(PBS)中, 经尾静脉注入小鼠体内, 溶剂对照采用相同剂量 DMSO, 4 h 后分离小鼠脾细胞, 1 $\times$ 10⁶ 细胞裂解液处理去除红细胞, 取 2 $\times$ 10⁶ 细胞 / 样

品重悬于 RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 10 mmol/L HEPES, 50 mmol/L 2-巯基乙醇), 同时加入 GolgiStop, 37℃ 培养 2 h, 细胞(1 $\times$ 10⁶/100 μ l)首先经细胞表面染色, 冷 PBS 洗涤后加入新鲜配置固定 / 透膜液(1:3 稀释) 0.5 ml, 4℃ 避光孵育 30~60 min, 加入 2 ml 1 $\times$ 固定 / 透膜液洗涤 1 次, 加入 2.4G2 4℃ 封闭 15 min, 直接加入抗小鼠 IFN- γ 和 IL-4 抗体进行细胞内染色, 4℃ 避光孵育 30 min, 2 ml 1 $\times$ 固定 / 透膜液洗涤 2 次, 流式细胞仪分析.

1.2.3 酶联免疫吸附实验(ELISA). 采用结合缓冲液(0.1 mol/L Na₂HPO₄, pH 9.0)稀释抗小鼠 IL-4 和 IFN- γ 抗体至 2 mg/L, 100 μ l/孔加入相应 ELISA 板, 4℃ 包被过夜, 移除包被液, 加入封闭缓冲液(1%BSA), 200 μ l/孔, 室温 2 h, PBS/Tween20 洗涤 3 次后加入 1:50 稀释的 α -Galcer 处理小鼠血清和倍比稀释标准血清, 100 μ l/孔, 室温 4 h, PBS/Tween20 洗涤 3 次后加入底物显色, 450 nm 处测量吸光度(A).

1.2.4 黑色素瘤转移抑制实验. B16BL6 小鼠黑色素瘤细胞在 RPMI1640(10%胎牛血清, 1%青霉素和链霉素)培养液中培养. 细胞在 50%~70% 融合时倒出培养液, 用 2 mmol/L EDTA 消化, 细胞重悬于无钙、镁的 PBS, 浓度为 1 $\times$ 10⁶/ml. 取 100 μ l 细胞悬液经小鼠尾静脉分别接种 miR-150KO 和野生型对照小鼠. 第二天起分别注射 α -Galcer, 100 μ g/kg. 每 3 天注射 1 次, 连续注射 3 次, 试剂对照采用 DMSO 等量注射. 3 周后杀死小鼠分离、固定肺组织, 计数肺组织黑色素瘤的结节数, 结果采用 $\bar{x} \pm s$.

1.2.5 实时定量 RT-PCR. 提取细胞总 RNA, 采用 TaqMan microRNA 检测试剂盒进行反转录和 PCR 扩增, 以 snoRNU202 作为内参照. PCR 扩增产物检测采用 ABI 7900 Real-time PCR system 进行, 结果分析采用以 2 为底的对数值, 并计算相对表达.

1.2.6 统计学分析. 数据分析采用 GraphPad Prism 5 或 Microsoft Excel 统计软件, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用双尾 Student's *t* 检验, *P* < 0.05 为组间有统计学差异.

2 结 果

2.1 MiR-150KO 小鼠 NKT 细胞数量变化

为观察 miR-150 对小鼠 NKT 细胞发育的影

响, 我们采用 miR-150 基因敲除(miR-150KO)小鼠. 基因鉴定及 Real-time PCR 结果显示: miR-150KO 小鼠基因型正确(图 1a), 胸腺及脾脏细胞中 miR-150 的表达较 WT 小鼠显著降低(图 1b). 分别分离 miR-150KO 和 WT 小鼠胸腺及外周免疫器官淋巴细胞、胸腺细胞采用抗 -TCR- β 抗体和 CD1d- α -Galcer 双染色, 外周细胞采用抗 -B220 抗体、抗 -TCR- β 抗体和 CD1d- α -Galcer 三染色, 流式细胞仪分析 miR-150KO 小鼠胸腺及外周 NKT 细

胞的数量变化. 发现与 WT 小鼠相比, miR-150KO 小鼠胸腺 NKT 细胞百分比和细胞数量显著降低(图 1c, d). 在外周免疫器官中, 尽管 miR-150KO 小鼠淋巴结 NKT 细胞百分比和细胞数量较 WT 小鼠出现增加的趋势, 但在 NKT 细胞分布的主要器官如脾脏、骨髓和肝脏, 与 WT 小鼠相比, miR-150KO 小鼠 NKT 细胞百分比和细胞数量没有显著变化(图 1e, f).

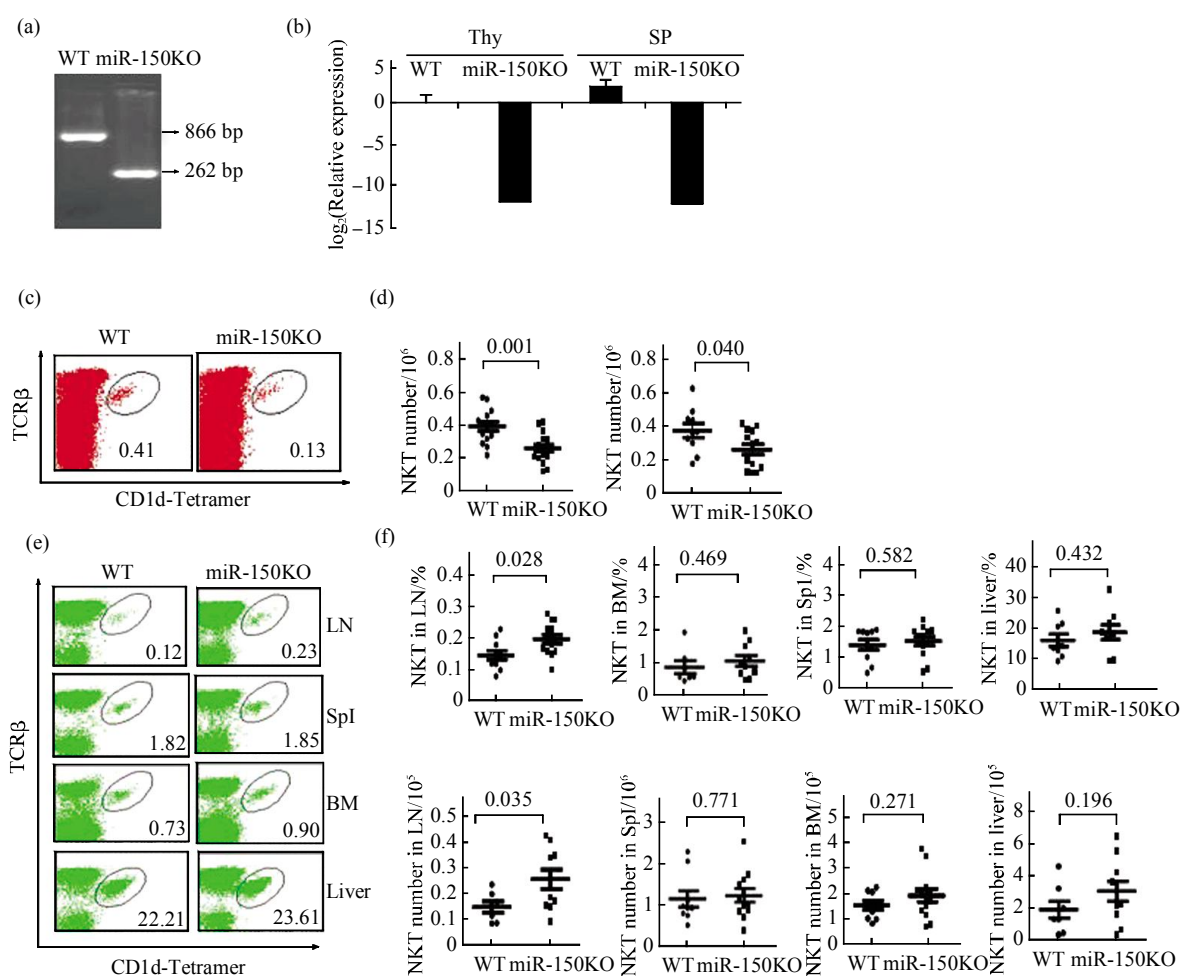


Fig. 1 NKT cell number changes in miR-150KO mice

(a)PCR typing of genomic DNA isolated from the tails of WT and miR-150KO mice. The deletion of miR-150 gene produced a 262 bp PCR product whereas the WT allele resulted in an 866 bp product. (b) Real-time PCR analysis of miR-150 expression from the thymus and spleen of WT and miR-150KO mice. (c) Representative dot plots of thymus NKT cells stained by anti-TCR β antibody and α -Galcer-CD1d tetramer from WT and miR-150KO mice. (d)The frequency(left) and number(right) of TCR β ⁺ CD1d-tetramer⁺ NKT cells from the thymus of WT and miR-150KO mice. Each point represents one individual mouse, and the mean values are indicated by the middle horizontal lines from three to four independent experiments (3~5 mice/experiment). (e)The representative staining of NKT cells (gated on B220-negative cells) in lymph nodes, spleen, bone marrow, and liver from miR-150KO and WT mice. (f) The frequency (up) and cell number (bottom) of NKT cells in the lymph nodes, spleen, bone marrow and liver of miR-150KO and WT mice. Each point represents one individual mouse, and the mean values are indicated by middle horizontal lines from three to four independent experiments (3~5 mice/experiment). Statistical analysis was performed with Prism 5.0 (GraphPad Software). Differences were considered statistically significant when values of $P < 0.05$.

2.2 MiR-150KO 小鼠 NKT 细胞 IFN- γ 产生增加

在受到 TCR 信号刺激时, NKT 细胞能在短时间内产生大量 Th1 和 Th2 型细胞因子, 进而发挥强大的免疫调节功能^[10]. 为观察 miR-150 对 NKT 细胞功能的影响, 我们分别给 miR-150KO 和 WT 小鼠注射 NKT 细胞特异激活剂 α -Galcer, 采用细胞内染色和 ELISA 检测脾脏 NKT 细胞和血清中

IFN- γ 和 IL-4 的产生和分泌. 细胞内染色结果表明, α -Galcer 体内刺激 4 h 后, 与 WT 小鼠相比, miR-150KO 小鼠 IFN- γ 和 IL-4 产生 NKT 细胞均有增加, 其中, IFN- γ 产生 NKT 细胞的增加尤为显著 ($P < 0.01$) (图 2a, b). 与细胞内染色结果一致, ELISA 结果显示: miR-150KO 小鼠血清中 IFN- γ 的量显著增加 (图 2c).

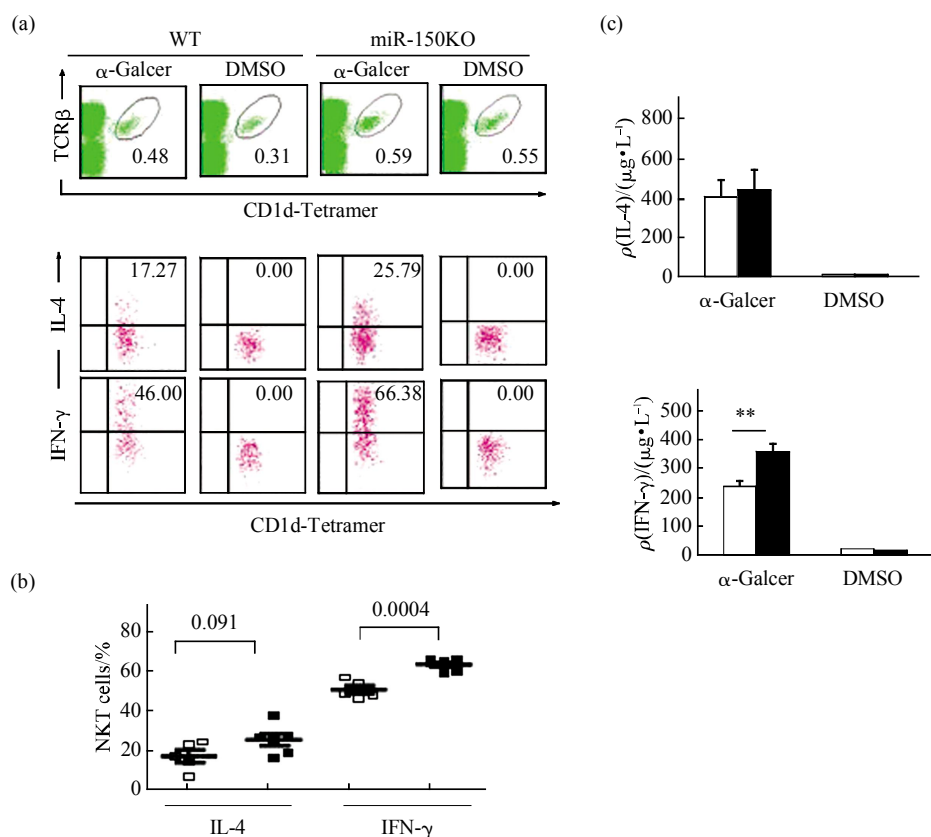


Fig. 2 Increased IFN- γ production in the α -Galcer activated NKT cells in miR-150KO mice

(a) Intracellular staining analysis of IL-4 and IFN- γ expression from spleen NKT cells of WT control and miR-150KO mice after *in vivo* α -Galcer stimulation for 4 h. (b) Percentage of IL-4 and IFN- γ positive NKT cells in the WT and miR-150KO mice after *in vivo* α -Galcer stimulation for 4 h. Results are representative of three independent experiments (3~5 mice/experiment). (c) ELISA analysis of IL-4 and IFN- γ expression from the serum of WT control and miR-150KO mice after *in vivo* α -Galcer or DMSO treatment for 4 h. Results are representative of two independent experiments (3~5 mice/experiment). ** $P < 0.01$. □: WT; ■: miR-150KO.

2.3 MiR-150 敲除抑制小鼠黑色素瘤细胞的肺转移

活化 NKT 细胞由于产生 IFN- γ 等 Th1 型细胞因子而具有广泛的抗肿瘤活性^[11]. 为探讨 miR-150 对小鼠 NKT 细胞抗肿瘤活性的影响, 通过小鼠尾静脉注射 B16BL6 黑色素瘤细胞, 建立 miR-150KO 和 WT 小鼠黑色素瘤肺转移模型, 分别给予 α -Galcer 处理活化 NKT 细胞, 3 周后取各实验组小鼠肺组织, 观察、计数黑色素瘤细胞的肺转移. 结果显示, 与对照 DMSO 处理相比, α -Galcer 处

理显著降低 miR-150KO 和 WT 小鼠黑色素瘤细胞的肺转移 (miR-150KO: $P = 0.005$; WT: $P = 0.003$) (图 3a, b), 进一步证实活化 NKT 细胞的抗肿瘤活性. 有意思的是, 尽管 DMSO 处理 miR-150KO 与 WT 小鼠肺转移黑色素瘤结节数未显示显著性差异, 但 α -Galcer 处理 miR-150KO 小鼠与相应处理的 WT 小鼠相比, 肺黑色素瘤结节数显著降低 ($P = 0.015$) (图 3a, b).

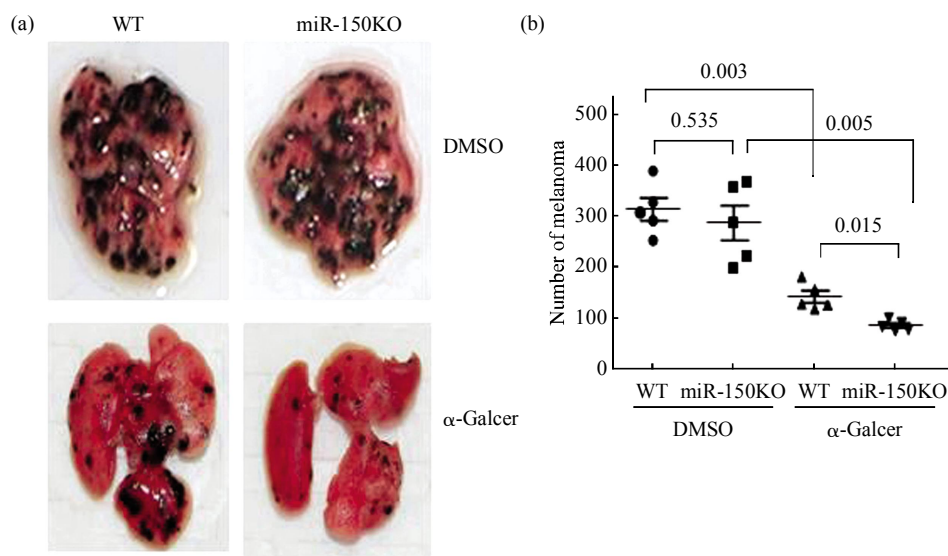


Fig. 3 miR-150 knockout decreases lung metastasis of B16BL6 melanoma in α -Galcer treated mice

WT and miR-150KO mice were first inoculated *via* the tail with 1×10^5 /ml B16BL6 melanoma cells, and then treated with α -Galcer of 100 μ g/kg for three times, one time every 3 days. Mice were euthanized 3 weeks after tumor inoculation. (a) Representative example of B16BL6 melanoma colonies on the lungs of WT and miR-150KO mice given DMSO reagent control (up) or NKT cell stimulator α -Galcer (bottom). (b) Distribution of the number of tumor colonies on the lung of WT and miR-150KO mice treated with either DMSO or α -Galcer. Results are representative of three independent experiments (4~6 mice/experiment).

3 讨 论

NKT 细胞是近年来新发现的一个保守的 T 细胞亚群, 起源于胸腺 CD4+CD8+ 双阳性 T 细胞. 胸腺 NKT 前体细胞在经历 CD44⁻NK1.1⁻、CD44⁺NK1.1⁻和 CD44⁺NK1.1⁺三个发育阶段后成为成熟 NKT 细胞. 有意思的是, 在 CD44⁺NK1.1⁻发育阶段, 一部分 NKT 细胞离开胸腺进入肝脏、脾脏、骨髓和淋巴结等外周免疫器官并进一步发育成熟. 因此, NKT 细胞的发育、成熟既发生在胸腺, 也发生在外周免疫器官^[12]. 我们以往的研究结果发现, miR-150 缺失引起小鼠胸腺 NKT 细胞数量减少, 细胞发育受阻于 CD44⁺NK1.1⁻发育阶段^[13]. 然而, 在外周免疫器官中, miR-150KO 小鼠与对照 WT 小鼠相比, NKT 细胞的比例和数量并没有显著变化, 提示 miR-150KO 小鼠有更多 CD44⁺NK1.1⁻发育阶段的 NKT 细胞自胸腺进入外周免疫器官发育. 与 Savage 等的研究结果一致^[14-15], 非成熟 CD44⁺NK1.1⁻NKT 细胞易于进入淋巴结, 与 WT 小鼠相比, miR-150KO 小鼠淋巴

结 NKT 细胞的比例和数量显示增加的趋势.

与 miR-150 在 NK 细胞中的作用不同^[9], 在本实验中, 我们发现 miR-150 实际上负向调控 NKT 细胞的功能. 细胞内染色结果表明, TCR 活化 miR-150 敲除小鼠 NKT 细胞 IFN- γ 产生显著增加, 同时, IL-4 的产生也有增加的趋势. ELISA 结果显示, α -Galcer 处理 miR-150KO 小鼠与相应处理 WT 小鼠相比, 血清 IFN- γ 的量也显著增加, 进一步证实 miR-150 主要负向调控 NKT 细胞 IFN- γ 的产生和分泌. 不容否认的是, 活化 NKT 细胞可能进一步通过调节其他细胞的细胞因子产生和分泌, 从而间接改变血清中 IL-4 和 IFN- γ 的含量. 如 IFN- γ 促进 Th1 细胞的生成, 而 Th1 细胞也是 IFN- γ 的产生和分泌的重要细胞之一^[16-17].

目前研究已证实, 由 CD1d 分子提呈的糖脂类抗原 α -Galcer, 通过特异活化体内 V14 NKT 细胞, 显示强大的抗肿瘤转移活性. Nakagawa 等^[18]早在 1998 年就发现小鼠体内注射 α -Galcer 显著抑制结肠癌细胞的肝转移; Matsumoto 等^[19]发现 α -Galcer 对胰腺癌的肝转移显示显著的抑制效果; 采用小

鼠乳腺癌模型, Nishio 等^[20]发现 α -Galcer 能够有效抑制乳腺癌的发展和癌细胞的肺部转移. 尽管 α -Galcer 活化 NKT 细胞能够促进诸如 IL-4、IFN- γ 、IL-2、IL-12、IL-17 等多种细胞因子的产生和分泌, IFN- γ 在活化 NKT 细胞的抗肿瘤活性中发挥关键作用, IFN- γ 敲除小鼠 NKT 细胞的抗肿瘤转移活性显著降低或消失^[21-22]. 本实验中我们观察到, 无论是 WT 小鼠还是 miR-150KO 小鼠, α -Galcer 处理均能抑制小鼠 B16BL6 黑色素瘤细胞的肺转移. 同时 α -Galcer 处理的 miR-150KO 小鼠与相应处理的 WT 小鼠相比, B16BL6 黑色素瘤细胞的肺转移显著降低, 提示活化 miR-150KO NKT 细胞较 WT NKT 细胞对肿瘤的转移具有更强的抑制效果. 这一结果显然与 miR-150 敲除增加活化 NKT 细胞 IFN- γ 的产生密切相关(图 2). 研究表明, IFN- γ 既可直接通过诱导抗血管生成因子 IP-10 和 Mig 的表达, 抑制肿瘤血管的生成^[23], 也可间接通过活化 NK 细胞、传统 CD4⁺和 CD8⁺T 细胞及巨噬细胞、B 细胞等多种免疫细胞发挥抗肿瘤生长和转移的活性^[24]. miR-150KO 小鼠 NK 细胞数量减少^[9], 因此, NK 细胞在此 α -Galcer 处理的黑色素瘤转移小鼠模型中可能不发挥主要作用. 另外, Spitzer 等^[25]也在实验中观察到, 慢性酒精消耗通过增加 IFN- γ 产生 NKT、CD4⁺和 CD8⁺T 细胞抑制小鼠黑色素瘤细胞的肺转移, 而 NK 细胞不发挥关键作用.

总之, 本研究发现 miR-150 负向调控 NKT 细胞 IFN- γ 的表达, miR-150 敲除增加小鼠 NKT 细胞和血清中 IFN- γ 的产生和分泌, 增强 NKT 细胞特异激活剂 α -Galcer 对小鼠黑色素瘤细胞肺转移的抑制效果. 然而, 对于 miR-150 如何调控 NKT 细胞的发育和细胞因子的产生和分泌, 以及活化 NKT 细胞如何通过其产生和分泌的细胞因子如 IFN- γ 发挥抗肿瘤活性, 目前仍不清楚, 需要在后续实验中逐步加以解决.

参 考 文 献

- [1] Bendelac A, Savage P B, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*, 2007, **25**: 297-336
- [2] Egawa T G, Eberl I, Taniuchi K, *et al.* Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity*, 2005, **22**(6): 705-716
- [3] Tahir S M, Cheng O, Shaulov A, *et al.* Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol*, 2001, **167**(7): 4046-4050
- [4] Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2007, **5**(6): 405-417
- [5] Lehuen A, Diana J, Zaccane P, *et al.* Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol*, 2010, **10**(7): 501-513
- [6] Winter J, Jung S, Keller S, *et al.* Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 2009, **11**(3): 228-234
- [7] Zhou L, Seo K H, He H Z, *et al.* Tie2cre-induced inactivation of the miRNA-processing enzyme Dicer disrupts invariant NKT cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(25): 10266-10271
- [8] Zhou B, Wang S, Mayr C, *et al.* miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, **104**(17): 7080-7085
- [9] Bezman N A, Chakraborty T, Bender T, *et al.* miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J Exp Med*, 2011, **208**(13): 2717-2731
- [10] Matsuda J L, Mallevaey T, Scott-Browne J, *et al.* CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol*, 2008, **20**(3): 358-368
- [11] Motohashi S, Nakayama T. Clinical applications of natural killer T cell-based immunotherapy for cancer. *Cancer Sci*, 2008, **99**(4): 638-645
- [12] Matsuda J L, Zhang Q, Ndonye R, *et al.* T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of Valpha14i NKT cells. *Blood*, 2006, **107**(7): 2797-2805
- [13] Zheng Q, Zhou L, Mi Q S. MicroRNA miR-150 is involved in V α 14 invariant NKT cell development and function. *J Immunol*, 2012, **188**(5): 2118-2126
- [14] Savage A K, Constantinides M G, Han J, *et al.* The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity*, 2008, **29**(3): 391-403
- [15] Kim P J, Pai S Y, Brigl M, *et al.* GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol*, 2006, **177**(10): 6650-6659
- [16] Burman A C, Banovic T, Kuns R D, *et al.* IFN-gamma differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood*, 2007, **110**(3): 1064-1072
- [17] Frasca D, Adorini L, Landolfo S, *et al.* Enhancing effect of IFN-gamma on helper T cell activity and IL 2 production. *J Immunol*, 1985, **134**(6): 3907-3911
- [18] Nakagawa R, Motoki K, Ueno H, *et al.* Treatment of hepatic metastasis of the colon26 adenocarcinoma with an alpha-galactosylceramide, KRN7000. *Cancer Res*, 1998, **58**(6): 1202-1207
- [19] Matsumoto G, Nagai S, Muta M, *et al.* Survival benefit of KRN7000 immune therapy in combination with TNP470 in hamster liver metastasis model of pancreatic cancer. *Oncol Rep*, 2003, **10**(5): 1201-1206

- [20] Nishio S, Yamada N, Ohyama H, *et al.* Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of alpha-galactosylceramide and interleukin-18. *Cancer Sci*, 2008, **99**(1): 113–120
- [21] Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, *et al.* Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol*, 2001, **31**(6): 1720–1727
- [22] Zhang H, Zhu Z, McKinley J M, *et al.* IFN- γ is essential for the inhibition of B16BL6 melanoma lung metastasis in chronic alcohol drinking mice. *Clin Exp Metastasis*, 2011, **28**(3): 301–307
- [23] Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, *et al.* IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood*, 2002, **100**(5): 1728–1733
- [24] Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol*, 2002, **2**(8): 557–568
- [25] Spitzer J H, Núñez N P, Meadows S A, *et al.* The modulation of B16BL6 melanoma metastasis is not directly mediated by cytolytic activity of natural killer cells in alcohol-consuming mice. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000, **24**(6): 837–844

MiR-150 Deletion Increases IFN- γ Production of NKT Cell and Inhibits Lung Metastasis of Mice Melanoma Cells*

ZHENG Quan-Hui^{1)**}, ZHANG Ai-Hong²⁾, ZHENG Ai-Hua²⁾, YAO Wen-Bo³⁾,
GAO Jin-Ming⁴⁾, ZHANG Qing-Bo¹⁾, Li Juan¹⁾

⁽¹⁾ College of Elementary Medicine, Hebei United University, Tangshan 063000, China; ⁽²⁾ Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China;

⁽³⁾ Tangshan Renmin Hospital, Tangshan 063000, China; ⁽⁴⁾ Tangshan Qianxi Traditional Medicine Hospital, Tangshan 063000, China)

Abstract CD1d-restricted natural killer T cell (NKT) is a subset of T cells and plays an important role in the regulation of diverse immune responses. MicroRNA-mediated RNA interference is emerging as a crucial regulatory mechanism in the control of NKT cell development and function. Yet, roles of specific microRNA in the development and function of NKT cells is not completely understood. In this study, miR-150 knockout (miR-150KO) mice were adopted and the quantities of thymic and peripheral NKT cells were detected by flow cytometry. Cytokine production was detected by intracellular staining and ELISA. We found that miR-150 deletion resulted in the decreased number of thymic NKT cells, while peripheral NKT cells did not change in mice. However, activated NKT cells in miR-150KO mice produced more IFN- γ than that of wild type control (WT) mice. In addition, using B16BL6 melanoma mouse model, we found that miR-150 deletion enhanced the inhibitory effect of α -Galcer on the lung metastasis of melanoma cells. Our data provide new clues for the specific role of miR-150 in the development and function of NKT cells.

Key words miR-150, NKT cell, IFN- γ , melanoma

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00493

*This work was supported by a grant from Tangshan Science and Technology Bureau for Basic Medical Research (12140209A-44).

**Corresponding author.

Tel: 86-315-3725918, E-mail: zquanhui@yahoo.com

Received: October 10, 2012 Accepted: November 13, 2012