

췌관내 유두상 점액종에서의 마이크로 RNA 발현 양상

박윤경¹, 이광혁^{1,2}, 이종균^{1,2}, 이규택^{1,2}, 최동욱³, 최성호³, 허진석³, 장기택⁴, 이은미⁵, 김정옥¹, 민신영¹, 김은정¹
성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 내과학교실¹, 소화기내과학교실², 외과학교실³, 병리학교실⁴, 삼성생명과학연구소⁵

MicroRNA Expression Pattern in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm

Yun Gyoung Park¹, Kwang Hyuck Lee^{1,2}, Jong Kyun Lee^{1,2}, Kyu Taek Lee^{1,2}, Dong Wook Choi³, Seong Ho Choi³, Jin Seok Heo³, Kee Taek Jang⁴, Eun Mi Lee⁵, Jung Ok Kim¹, Shin Young Min¹ and Eun Jung Kim¹

Department of Internal Medicine¹, Division of Gastroenterology², Department of Surgery³, Department of Pathology⁴, Samsung Biomedical Research Institute⁵, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Background/Aims: Intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) are precursor lesions of fatal pancreatic cancer. Physiological function of microRNA is to regulate the stability and translation of mRNA. The aberrant microRNA expression is commonly observed in many cancers. The aim of this study was to analyze the expression pattern of microRNA in IPMN and evaluate the role of the microRNA.

Methods: Using two paraffin-embedded IPMN tissues, microRNA expression of normal tissue, IPMN adenoma and carcinoma were compared by cDNA-mediated annealing, selection, extension and ligation microarray assay. Using real time PCR, expression levels of aberrantly up-regulated microRNAs were assessed in another 20 IPMNs, four pancreatic cancer cell lines (Panc1, MiaPaCa-2, XPA-3, BxPC-3) and immortalized pancreatic ductal cell line (HPNE). Effect of suppressing highly over-expressed two microRNAs in pancreatic cancer cell lines with anti-microRNA inhibitors were evaluated using CCK-8 assay.

Results: Among aberrantly expressed 122 microRNAs in IPMN, miR-552, miR-25*, miR-183, miR-1300, miR-196a, miR-182*, and miR-30c-1* were consistently increased more than 3-fold. On average, miR-196a and miR-183 increased 10,824 folds and 26,519 folds in four pancreatic cancer cell lines compared with HPNE. These two microRNAs were also over-expressed in 20 IPMNs compared with HPNE. After applying anti-miRNA inhibitors, cell survival of four pancreatic cancer cell lines decreased by 24.5% with anti-miR-196a and by 14.2% with anti-miR-183 on average.

Conclusions: Aberrant expression of 122 microRNAs was observed in IPMN. Two microRNAs, miR-196a and miR-183-increased in IPMN and pancreatic cancer cell lines compared with immortalized pancreatic ductal cell line. The inhibitions of these microRNAs repressed cell proliferation of pancreatic cancer cell lines. (Korean J Gastroenterol 2011;58:190-200)

Key Words: Intraductal papillary mucinous neoplasm; microRNAs; miR-196a; miR-183

서론

췌장암은 진단 후 5년 생존율이 5% 내외인 치명적인 암이다.^{1,2} 이른 병기의 수술이 가능한 췌장암도 5년 생존율이 25-30% 정도 밖에 되지 않는다.^{3,4} 최근에 많은 연구에서 췌장암은 다양한 전암성 병변을 거쳐서 발생하는 것이 밝혀졌다.

이러한 췌장암의 전암성 병변 중 하나가 췌관내 유두상 점액종(intraductal papillary mucinous neoplasm, IPMN)이다.^{5,6} 우리나라에서의 IPMN은 1992년도에 첫 보고되었으며, 이후에 연구 결과 서구보다 우리나라에 더 흔한 질병으로 밝혀졌다.⁷ IPMN은 선종, 상피내암과 침습성암 순으로 진행하며 일부 환자에서는 선종과 침습성 암이 동시에 발견된다.⁸

Received May 18, 2011. Revised July 5, 2011. Accepted July 13, 2011.

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

교신저자: 이광혁, 135-710, 서울시 강남구 일원동 50, 삼성서울병원 소화기내과

Correspondence to: Kwang Hyuck Lee, Department of Gastroenterology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 50, Irwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea. Tel: +82-2-3410-3409, Fax: +82-2-3410-6983, E-mail: lkhuyuck@gmail.com

Financial support: This study was supported by National Research Foundation of Korea, E00104. Conflict of interest: None.

마이크로 RNA (microRNA)는 약 22개 내외의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥의 RNA로 생체 내에서 다양한 mRNA의 번역(translation)을 조절함으로써 생체 내에서 다양한 기능을 하고 있음이 밝혀졌다. 이러한 마이크로 RNA 발현의 비정상적인 증가 및 감소가 다양한 종류의 암과 연관되어 있고 이들 암에서 중요한 발암기전으로 작용함이 밝혀지면서, 마이크로 RNA를 이용한 진단과 치료에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.⁹⁻¹⁴ 하지만, 현재까지 IPMN에서 이러한 마이크로 RNA 발현 양상에 대한 연구는 많지 않다. 본 연구는 IPMN에서 마이크로 RNA 발현 양상을 살피고 마이크로 RNA의 역할을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 환자

IPMN으로 수술한 환자 중 선종과 암이 같이 있는 환자 2명의 파라핀 조직에서 주변 정상 조직, 선종 및 암을 각각 미세절단한 뒤 마이크로 RNA 마이크로어레이(microarray)를 이용하여 분석하기 위하여 RNA를 추출하였다. IPMN으로 수술한 다른 환자 20명의 파라핀 조직으로부터 RNA를 추출한 뒤 실시간중합효소연쇄반응(RT-PCR)로 마이크로 RNA의 발현을 조사하였다. 이들의 마이크로 RNA 발현 정도는 췌장암 세포주와 불멸화 정상 세포주에서의 발현 정도와 비교하였다.

2. 파라핀 조직에서 RNA의 분리

미세절단 후에 RcoverAll™ 총 핵산 분리 키트(Ambion, Austin, TX, USA)를 사용하여 RNA를 추출하였다.^{15,16} 사용한 방법을 간략히 기술하면 우선 파라핀 블록을 20 µm 두께로 얇게 절단하여 100% xylene에 넣은 후 50°C에서 3분간 처리한다. 이 후에 100% 에탄올로 두 번 세척한 후 완전히 말린다. 분리 키트에 단백분해효소(protease)와 완충액을 넣고 50°C에서 30분간 처리한다. 추출액(additive/ethanol mixture)을 넣고 잘 섞은 후 필터 카트리지를(filter cartridge)에 넣는다. 700 µL 분리 키트 세척완충액 1번과 500 µL 세척완충액 2/3번을 이용하여 세척한 후 10,000 rpm에서 30초간 원심 분리하여 세척액을 모두 제거한다. 4 µL DNA분해효소(DNase), 50 µL 핵산분해효소가 없는 물(nuclease-free water)과 6 µL 10X DNA분해효소 완충액을 필터에 넣고 30분간 25°C에 거치시킨 후 전술한 방법으로 다시 세척한다. 최종 RNA는 60 µL의 제공된 추출액(elution solution)을 이용하여 추출한다. 다음 실험을 위하여 추출한 RNA를 80°C에 보관한다.

3. 마이크로 RNA 마이크로어레이법

기존의 마이크로어레이를 변형하여 개발된 DASL assay (cDNA-mediated annealing, selection, extension and ligation, Illumina, San Diego, CA, USA)¹⁷⁻²⁵를 이용하여 마이크로 RNA 마이크로어레이를 시행하였다.

원리를 간단히 기술하면, 추출한 RNA에 아네닐산 중합반응(polyadenylation)을 시행하고 biotin labeled oligo-dT 시동체를 이용하여 상보성 DNA (complementary DNA)를 만든 후 고체상(solid phase)에 결합시킨다. 이후에 개발된 탐촉자(probe: single miRNA-specific Oligo [MSO])를 이용하여 원하는 마이크로 RNA를 정량적으로 검출한다. 개발된 탐촉자는 5번 말단(5'-end)의 보편적 중합효소연쇄반응 시동체 부위(universal PCR priming site), 중앙에 주소 염기서열(address sequence)과 3번 말단(3'-end)의 마이크로 RNA 특이서열(miRNA-specific sequence)로 구성되어 있다. 이러한 탐촉자를 이용하면 735개의 마이크로 RNA를 찾을 수 있다.

실험 방법을 간략히 기술하면 15 µL biotin labeled 상보성 DNA에 5 µL의 다중 탐촉자군(multiplexed MSO pool MAP, Illumina)과 30 µL Streptavidin 상자성 입자(streptavidin paramagnetic particle, Illumina)를 혼합하고 70°C에서 가열한 뒤 40°C에서 annealing시킨다. 세척 후에 DNA 시동체(primer)를 이용하여 확장시켜서 증폭 가능한 표지된 산물(an amplifiable product)를 만든다. Streptavidin 상자성 입자로부터 증폭 가능한 표지된 산물을 분리 추출하고 biotin과 형광염색제가 결합된 시동체를 이용하여 PCR을 시행한다. Streptavidin 상자성 비드에 결합시킨 뒤 세척하고 변질(denatured)시켜서 단일가닥형광분자(single stranded fluorescent molecules)를 얻는다. 이 생성물을 다시 streptavidin 비드 시스템에 결합시키고 Address sequence technique (GoldenGate Genotyping Assay, DASL Gene Expression Assay, GoldenGate Methylation Assay)을 통하여 원하는 마이크로 RNA를 구별하면서 발현 정도를 측정하게 된다. 이러한 결과는 비드어레이 측정기(BeadArray reader)를 이용하여 검출되며 분석은 제조사에서 개발된 프로그램(BeadStudio v3.1.3, Gene Expression Module v3.3.8, Illumina)을 이용하여 수행하였다.

4. 세포주 배양 및 RNA 추출

American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)으로부터 췌장암 세포주(Panc-1, MiaPaCa-2, XPA-3, BxPC-3)와 불멸화된 정상 췌장조직 세포주(HPNE)를 구입하였다. Panc-1, MiaPaCa-2, XPA-3은 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)과 1%

antibiotic-antimycotic (Gibco-BRL)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco-BRL)에서, BxPC-3은 10% 우태아혈청과 1% Antibiotic-antimycotic (Gibco-BRL)을 포함한 RPMI-1640 (Gibco-BRL)에서 37°C, 5% CO₂조건으로 배양하였다. HPNE은 5% 우태아혈청(Gibco-BRL)과 750 ng/mL puromycin을 포함한 low glucose DMEM (Gibco-BRL)와 medium M3 base (Incell Co., San Antonio, TX, USA)의 3 : 1 혼합액에서 배양하였다. 세포주를 Trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 처리한 뒤 phosphate buffered saline으로 세척 후에 원심 분리하여 얻은 세포를 RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 제조사의 방법대로 RNA를 얻었다. 간략히 기술하면, 배양한 세포주를 Trypsin-EDTA를 이용하여 분리하고 원심분리(300×g, 5 min)하여 모은 후 350 µL LRT 용액을 넣고 1분간 잘 혼합하여 세포를 분해한다. 350 µL 70% 에탄올을 넣고 잘 섞은 후 제공된 RNeasy spin column에 용액을 옮겨 원심분리(10,000 rpm, 15 sec)한다. 700 µL RW1 용액을 넣고 원심 분리한 후 500 µL RPE 용액을 넣고 원심분리 한다. 30 µL RNase-free water로 RNA를 추출한다.

5. 마이크로 RNA를 검출하기 위한 RT-PCR 방법

얻어진 세포주 RNA를 TaqMan[®] MicroRNA 역전사키트 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 상보적 DNA를 얻었다. 방법은 100 mM dNTPs 0.15 µL와 전사 키트에서 제공하는 MultiScribe[™] Reverse Transcription 1 µL, 10X Recers 전사 완충액 1.5 µL, RNase 억제제 0.19 µL을 혼합하고 핵산가수분해효소가 없는 물을 넣어서 총 7 µL가 되게 한 뒤에 RNA 5 µL와 역전사 시동제 3 µL 넣고 혼합하고 16°C 30 min, 42°C 30 min, 85°C 5 min 처리 후 4°C로 냉각시킨다. 이 후에 TaqMan[®] MicroRNA Assays (Applied Biosystems)을 이용하여 RT-PCR 증폭을 하고 SDS2.3, RQ Manager 1.2 (Applied Biosystems)을 이용하여 분석한다. RT-PCR은 TaqMan[®] MicroRNA Assays 0.5 µL, cDNA 0.665 µL와 TaqMan[®] 2X Universal PCR Master Mix 5 µL 혼합 후에 총 10 µL을 만들어서 95°C 10 min, 95°C 15 sec, 60°C 60 sec을 총 40회 반복하면서 마이크로 RNA를 정량적으로 측정한다.

각각의 마이크로 RNA를 찾기 위해서 Applied Biosystems에서 제공하는 miR-196a (Part Number P/N 4427975 Assay ID TM000495, RT000495), miR-183 (Part Number P/N 4427975 Assay ID TM000484, RT000484) 및 RNU6B (Part Number P/N 4427975)에 대한 stem-loop RT primer를 사용하였다.

6. 마이크로 RNA 발현 억제

miR-196a와 miR-183을 억제하기 위하여 Applied Biosystems에서 제공하는 Anti-miR[™] 마이크로 RNA 억제제 (anti-miR 196a: AM10068²⁶, anti-miR 183: AM12830²⁷, Applied Biosystems)와 음성 대조군(Ambion, AM1701)을 사용하였다. Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen) 및 Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium (Gibco-BRL)을 이용하여 일시적으로 발현을 억제하였다. 방법을 간단히 기술하면 60 mm 세포배양접시(cell culture dish)에 Antibiotic-antimycotic이 제외된 배양액에서 배양하여 세포 밀도가 30-50%가 되면 유전자 전달 감염(gene transfection)을 시행한다. 유전자 전달 감염은 10 µL Lipofectamin 2000 reagent, 500 µL Opti-MEM[®], 및 30nM miRNA 196-a 억제제와 500 µL Opti-MEM[®]을 각각 혼합한 뒤에 실온에서 5분간 방치한 뒤 희석된 억제제와 희석된 Lipofectamin 2000을 혼합하여 실온에서 20 min간 거치시킨다. 배양액 5 mL에 위의 최종 혼합물 1 mL를 조심스럽게 넣고 37°C, 5% CO₂에서 4-5시간 거치 후 새로운 배양액으로 바꾼다.

7. 세포 생존율 확인을 위한 CCK8 assay

96 well plate에 세포수가 각 well 당 5,000개가 되도록 분주한다. 24시간 후에 배양액을 걷어내고 원하는 처치를 한 뒤 100 µL 되게 배양액을 넣는다. 37°C, 5% CO₂에서 일정 시간 배양시킨 후 10 µL의 CCK-8을 첨가하고 37°C, 5% CO₂에서 2시간 배양하고 분광광도계 마이크로플레이트 측정기(spectrophotometer microplate reader)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정한다. miR-196a와 miR-183을 일시적으로 억제하고 우태아혈청 알부민을 제거한 용액 100 µL에 원하는 농도의 gemcitabine을 만든 뒤에 혼합하여 72시간 뒤에 CCK8 assay를 통해서 Panc-1, XPA-3, MiaPaCa-2, BxPC-3의 생존율 측정하였다.

결 과

1. IPMN에서의 마이크로 RNA 발현

2명의 IPMN 환자로부터 얻은 수술 조직을 미세 절단하여 분리한 정상 조직, 선종 조직, 침습성 암 조직에서 각각 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 DASL assay 방법으로 735개 마이크로 RNA의 발현 양상을 분석하였다. 한 환자에서 얻은 정상과 선종 및 정상과 침습성 암을 각각 비교하였다. 4쌍 중 어느 한 쌍에서라도 정상조직과 비교해서 최소한 5배 이상 증가하거나 감소한 마이크로 RNA를 찾았다. 총 40 종류의 마이크로 RNA가 증가하였고 82종류의 마이크로 RNA가 감

Table 1. Up and Down Regulated MicroRNA in IPMN Detected by DASL assay

microRNA	Patient 1		Patient 2	
Up regulated	Adenoma	Carcinoma	Adenoma	Carcinoma
hsa-miR-552	17.36	3.91	51.52	65.06
hsa-miR-183	14.87	10.16	3.72	3.63
hsa-miR-1300	13.63	4.30	24.37	15.65
hsa-miR-196a	13.21	12.03	9.94	10.54
hsa-miR-182*	9.22	4.22	4.24	3.42
hsa-miR-30c-1*	4.23	7.44	7.72	5.18
hsa-miR-25*	3.84	3.69	8.20	5.13
hsa-miR-183*	8.45	2.20	5.32	2.14
hsa-miR-93*	6.15	2.63	4.70	5.97
hsa-miR-182	5.62	3.48	2.21	2.15
hsa-miR-1268	5.16	2.23	2.92	2.96
hsa-miR-885-3p	3.26	2.52	5.61	4.47
Down regulated	Adenoma	Carcinoma	Adenoma	Carcinoma
hsa-miR-125b-2*	-28.90	-2.65	-15.54	-47.93
hsa-miR-133a	-21.29	-7.51	-3.41	-5.04
hsa-miR-885-5p	-16.55	-3.50	-13.03	-14.75
hsa-miR-30a*	-11.99	-4.20	-9.18	-20.33
hsa-miR-1271	-10.07	-2.45	-4.04	-4.06
hsa-miR-1273	-8.26	-5.24	-4.98	-2.36
HS_182.1	-8.07	-2.02	-9.22	-3.79
hsa-miR-30c-2*	-7.99	-4.24	-4.93	-5.36
hsa-miR-1272	-7.75	-5.29	-4.61	-6.09
hsa-miR-378*	-6.63	-4.13	-2.87	1.39
hsa-miR-483-3p	-6.40	-2.31	-16.25	-4.19
hsa-miR-34c-5p	-6.10	-3.28	-3.60	-3.11
hsa-miR-143*	-5.80	-4.08	-2.21	-2.16
hsa-miR-34b*	-5.53	-3.21	-5.06	-3.41

IPMN, intraductal papillary mucinous neoplasm; DASL assay, cDNA-mediated annealing, selection, extension and ligation assay (Illumina, San Diego, CA, USA).

소하였다. 이 중 정상에 비해서 4쌍 모두에서 2배 이상의 변화를 보인 마이크로 RNA를 Table 1에 정리하였다. 이 중에서 정상과 비교하여 선종 혹은 침습성 암에서 모두 3배 이상으로 증가한 마이크로 RNA는 hsa-miR-552, hsa-miR-25*, hsa-miR-183, hsa-miR-1300, hsa-miR-196a, hsa-miR-182*, hsa-miR-30c-1*이었다.

2. 췌장암 세포주에서의 target microRNA 발현 양상

IPMN에서 3배 이상 증가한 hsa-miR-552, hsa-miR-25*, hsa-miR-183, hsa-miR-1300, hsa-miR-196a, hsa-miR-182*, hsa-miR-30c-1*에 대해서 HPNE와 4개의 췌장암 세포주 Panc-1, MiaPaCa-2, XPA-3, BxPC-3에서의 발현을 조사하였다(Fig. 1, Table 2). 그 결과 miR-196a은 정상 췌장 세포주에 비해서 췌장암 세포주에서 약 1,700-22,500배의 발현이 증가되어 있었으며 miR-183은 췌장암 세포주에서 2,000-73,400배의 발현 증가가 관찰되었다.

3. 수술한 IPMN 환자에서 miR-196a와 miR-183의 발현

20명의 수술한 환자(Table 3)를 대상으로 miR-196a와 miR-183의 발현을 조사하였다. 병변 부위를 미세절단한 뒤에 RT-PCR을 통하여 각각의 RNU6의 발현이 적절하게 나오는 검체를 대상으로 조사하였다. IPMN 침습성 암이 17예(85%)였으며, 9예(45%)에서 평균 3.4년 동안 경과 관찰 중에 재발하였다. 두 마이크로 RNA의 발현 정도를 HPNE와 Panc1에서의 발현과 비교한 결과 모든 환자에서 발현은 HPNE보다 높지만 Panc1보다 낮은 정도로 발현되었다. 그 정도는 Panc-1에 비해서 miR-196a의 경우 $34.2 \pm 8.7\%$ 이고 miR-183의 경우 $65.2 \pm 9.4\%$ 정도였다. 재발한 환자와 재발하지 않은 환자의 비율은 miR-196a (36.5% : 32.3%, $p=0.32$, Fisher's exact test)와 miR-183 (66.5% : 64.2%, $p=0.59$, Fisher's exact test)로 발현 차이는 없었다.

4. 췌장암 세포주에서 마이크로 RNA 억제제의 효과

췌장암 세포주에서 발현이 증가된 miR-196a와 miR-183의 발현을 억제하였을 때 세포에 미치는 영향을 분석하기 위하여

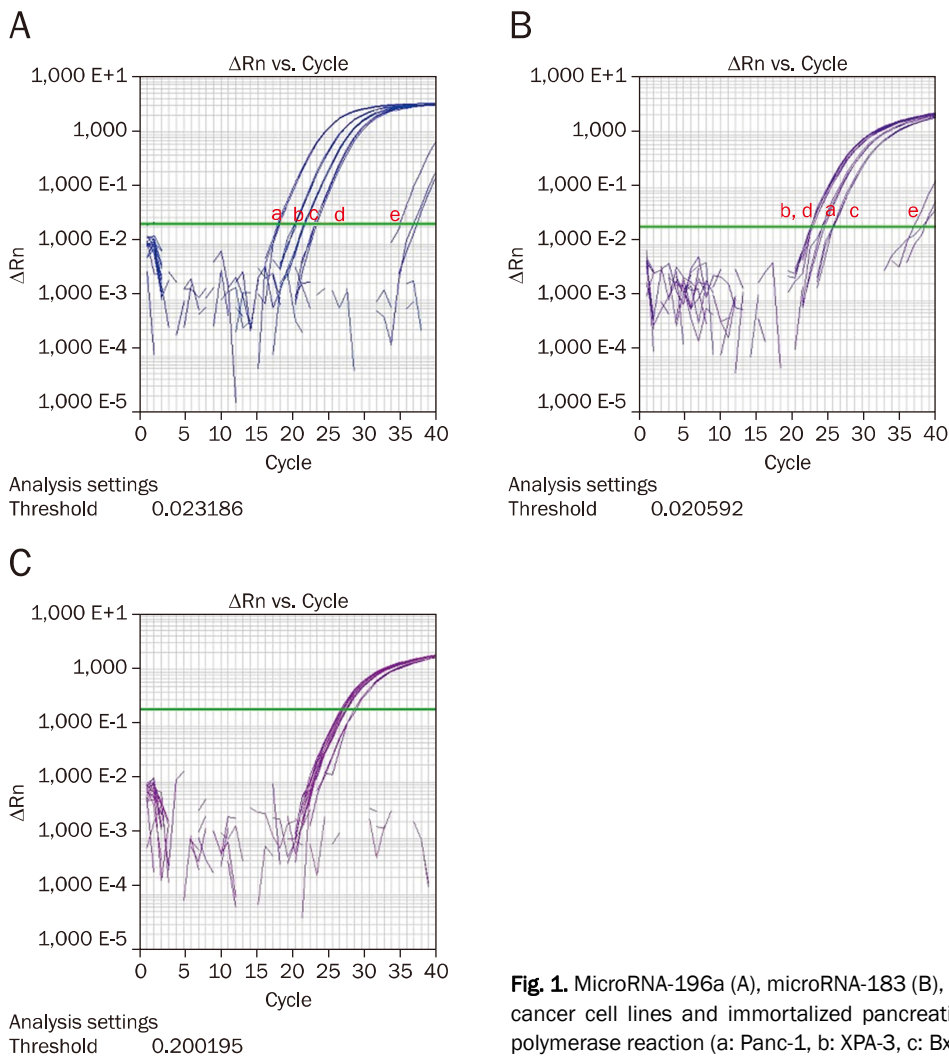


Fig. 1. MicroRNA-196a (A), microRNA-183 (B), and RNU6 (C) expression in pancreatic cancer cell lines and immortalized pancreatic ductal cells measured by real-time polymerase reaction (a: Panc-1, b: XPA-3, c: BxPC-3, d: MiaPaca-2, e: HPNE).

Table 2. MicroRNA Expression Patterns in Pancreatic Cancer Cell Lines (Panc-1, MiaPaCa-2, XPA-3, BxPC-3) Comparing with Immortalized Pancreatic Ductal Cell Line (HPNE) by Real-time Polymerase Chain Reaction

Over-expressed microRNA In IPMN	HPNE	Panc-1	MiaPaCa-2	XPA-3	BxPC-3	Mean
hsa-miR-552	1	0	0	0	6.29	1.57
hsa-miR-183	1	5216	13913	22471	1698	10825
hsa-miR-1300	1	0.74	1.51	1.38	0.89	1.13
hsa-miR-196a	1	73385	1966	22397	8327	26519
hsa-miR-182*	1	8.38	31.31	42.24	8.38	22.58
hsa-miR-30c-1*	1	13.33	8.39	6.49	1.54	7.44
hsa-miR-25*	1	9.66	40.62	34.00	6.18	22.61

Anti-miR™ 마이크로 억제제(Ambion)를 사용한 결과 miR-196a와 miR-183의 발현이 효과적으로 억제됨이 관찰되었다(Figs. 2, 3, Table 4).

miR-196a의 발현 억제에 의해서 췌장암 세포주 생존이 24.5% 감소하였으며 miR-183의 경우에는 약 14.2% 정도 감소되었다. 각각의 세포주의 마이크로 RNA 발현을 억제시킨

뒤 췌장암에서 가장 효과적인 항암제인 gemcitabine의 농도를 변화시키면서 세포의 생존 여부를 측정하였다. 초기에는 마이크로 RNA를 억제시킨 경우의 세포의 생존이 억제시키지 않은 경우보다 감소하였지만 비생리적 농도까지 농도를 증가시키면 이러한 효과가 사라졌다(Fig. 4, Table 5).

Table 3. MicroRNA 196a and MicroRNA-183 Expressions in 20 IPMN Patients

(A) Patient's Characteristics

(B) MicroRNA-196a and MicroRNA-183 Expressions

Mean±SD			miR-196a				miR-183		
Tumor size (cm)				Ave Ct	RQ	log%	Avg Ct	RQ	log%
Gender	M	13	HPNE	40	1	0%	37.951	1	0%
	F	7	PANC-1	4.886	51281272832	100%	26.268	4535.444	100%
Age		57.23±11.31	1	25.046	131735.453	48%	30.383	787.587	79%
F/U duration(days)		1256.8±1255.05	2	26.097	18106.959	40%	30.705	179.483	62%
miR 196a log% ^a		34±9	3	27.787	5571.388	35%	30.62	189.077	62%
miR 183 log%		65±9	4	29.798	1615.32	30%	30.656	215.435	64%
Recurrence	No	11	5	33.576	249.537	22%	31.414	269.853	66%
	Yes	9	6	25.335	194702.688	49%	32.572	311.919	68%
Pathology	Ademoma	3	7	31.493	1239.479	29%	33.178	93.156	54%
	Carcinoma	17	8	35.629	89.131	18%	33.212	115.095	56%
T stage	T1	3	9	28.565	6199.231	35%	30.845	308.555	68%
	T2	5	10	33.58	306.843	23%	34.143	50.197	47%
	T3	9	11	27.557	5661.799	35%	30.624	163.325	61%
N stage	N0	16	12	31.936	674.705	26%	32.893	83.973	53%
	N1	2	13	26.885	11132.865	38%	28.826	700.699	78%
			14	32.869	267.052	23%	30.669	296.621	68%
^a log%= $\frac{\log (\text{patient's RQ})}{\log (\text{Panc 1 RQ})} \times 100$			15	23.968	66096.539	45%	29.229	416.583	72%
			16	25.072	20980.867	40%	28.021	656.754	77%
			17	27.565	4241.441	34%	30.486	135.417	58%
			18	26.137	3791.512	33%	28.368	195.317	63%
			19	25.834	26166.584	41%	28.448	1033.314	82%
			20	25.993	12252.492	38%	29.286	302.196	68%

$$^a \log\% = \frac{\log(\text{patient's RQ})}{\log(\text{Panc 1 RQ})} \times 100$$

Bold, recurrent cases; Avg Ct, average; RQ, Relative quantitation.

$$\log\% = \frac{\log(\text{patient's RQ})}{\log(\text{Panc 1 RQ})} \times 100$$

고 찰

IPMN에서 마이크로 RNA의 발현의 연구는 많지 않다. 수술 후 냉동 보관된 비침습성 IPMN을 대상으로 miR-155의 발현과 IPMN과의 관계를 RT-PCR과 locked nucleic acid IHC staining 방법으로 밝힌 보고가 있었다.²⁸ 본 연구는 IPMN으로 수술 후 보관된 파라핀 조직으로부터 RNA를 추출하여 DASL assay 방법으로 마이크로 RNA의 발현 양상을 분석하여 총 122개의 마이크로 RNA 발현이 이상이 있음을 선별하였다. 주변 정상 조직에 비해서 증가 폭이 3배 이상인 마이크로 RNA를 대상으로 췌장암 세포주에서의 변화를 RT-PCR로 검사하여 miR-196a와 miR-183이 췌장암 세포주에서도 상승되어 있음을 확인했다. 이 두 종류의 마이크로 RNA가 수술한 20명의 다른 IPMN 환자에서도 상승되어 있다는 것을 RT-PCR로 증명하였다. 이들의 발현을 췌장암 세포주에서 억제한 결과 세포의 증식이 20% 정도 감소함을 관찰하였다.

수술 후 보관되어 있는 대부분의 검체는 파라핀 보관되어 있는데 이러한 파라핀 보관 검체에서 RNA를 추출하면 RNA 자체의 변형 및 분해로 인하여 정상적인 RNA의 양이 극소량

추출되어서 적절한 RNA 마이크로어레이 연구를 수행하기 어려웠다. 수술 후 보관된 췌장 조직의 경우에는 췌장세포에서 분비되는 췌장효소에 의한 RNA의 변질이 발생하여 RNA 분석이 다른 조직보다 더 어려울 것으로 추측되었다. 본 연구에서는 IPMN 환자의 파라핀 조직에서 RNA를 추출하고 이를 DASL assay 방법을 이용하여 마이크로 RNA 마이크로어레이를 수행하였다. DASL assay의 장점과 마이크로 RNA의 특징으로 인해, 상기 기술한 문제점에도 불구하고 마이크로 RNA에 대한 검사가 가능했던 것으로 여겨진다. 파라핀을 처리하는 과정에서의 변형은 주로 RNA의 크기와 관련이 있다. RNA의 크기가 큰 경우에 변형이 많이 오기 때문에 mRNA를 분석하는 경우에는 파라핀 조직에서 추출한 RNA로 분석하기 어렵지만, 마이크로 RNA는 뉴클레오타이드 20개 내외로 이루어져서 있어서 mRNA 분석 시에 일어날 수 있는 이러한 변형이 적을 것으로 생각된다. 기존의 마이크로어레이 방법이 최소한 100-200 ng의 RNA가 필요했던 것에 비하면 DASL assay는 2 ng의 소량으로도 비슷한 정도의 재현성을 보여준다. 이 방법을 이용하여 파라핀으로 처리된 다른 조직의 검체에서 RNA 분석이 시행되었다.^{17-25,29-31} 본 연구에서는 이러한

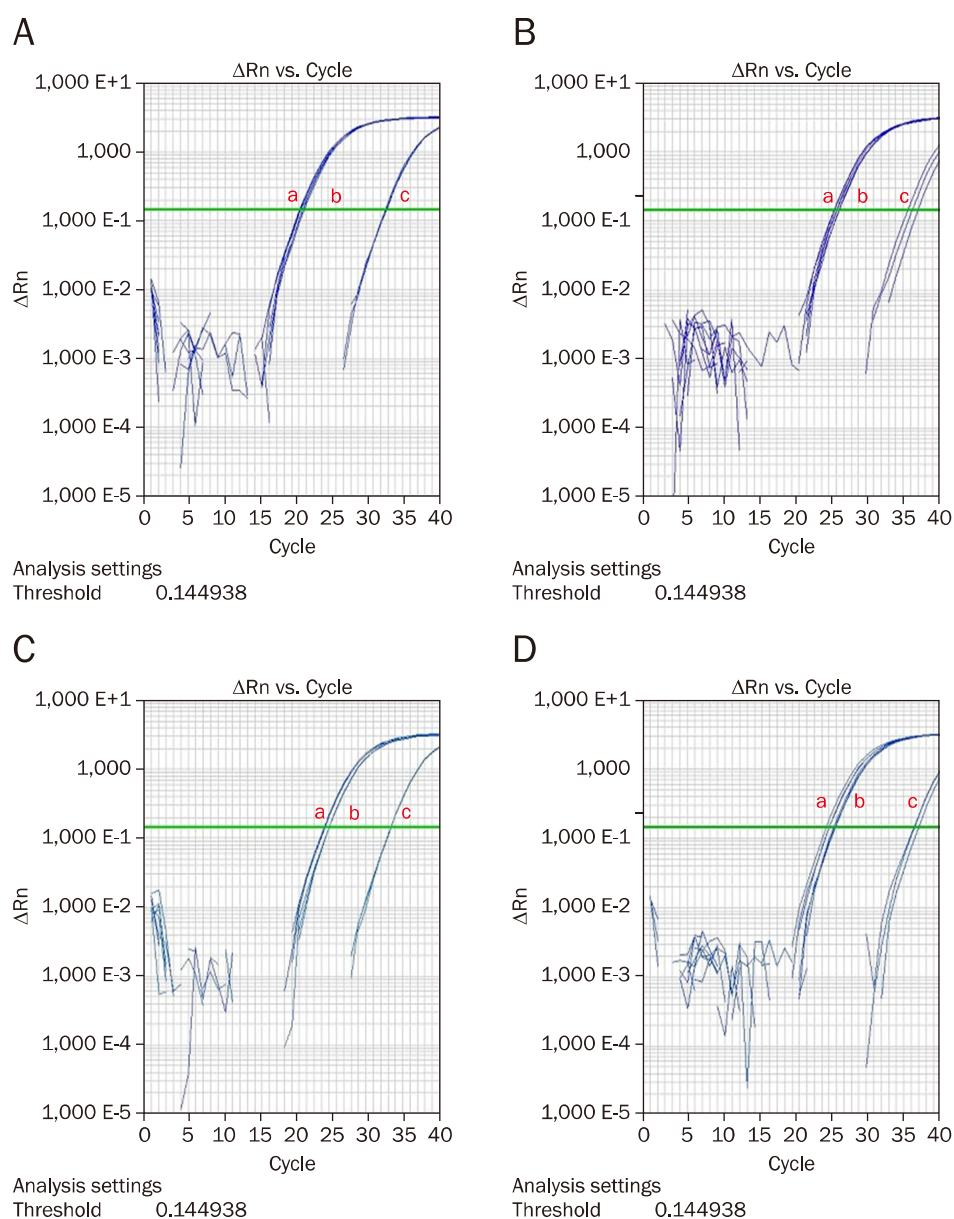


Fig. 2. MicroRNA-196a suppression in pancreatic cancer cell lines with RNU6B (a: Control, b: With mock, c: With anti-miR-196). (A) Panc-1, (B) MiaPaCa-2, (C) XPA-3, (D) BxPC-3.

Table 4. MicroRNA-196a and MicroRNA-183 Suppression in Pancreatic Cancer Cell Lines

	miR-196a		miR-183	
	Reference	With suppression	Reference	With suppression
Panc-1	100	<0.001	100	0.0001
MiaPaca-2	100	0.1	100	0.0001
XPA3	100	0.4	100	0.0001
BxPC3	100	<0.001	100	0.0001

DASL assay를 사용하여 췌장 수술 후 보관된 IPMN 파라핀 검체로부터 이상 발현을 보이는 마이크로 RNA를 찾아내었다.

본 연구는 이러한 방법을 선종과 암이 같이 발견된 환자에서 적용하였다. 선종, 암 및 주변 정상조직을 동일 환자에서

비교함으로써 개인차에 의하여 발생하는 마이크로 RNA 발현 양상 차이를 배제하였다. 하지만, IPMN으로 이러한 조건에 적합한 환자로 실험에 적절한 RNA를 추출할 수 있는 환자는 2명이었다. 좀 더 많은 환자에서 마이크로 RNA를 분석하면 의미있는 다른 마이크로 RNA를 선별할 수 있을 것으로 기대

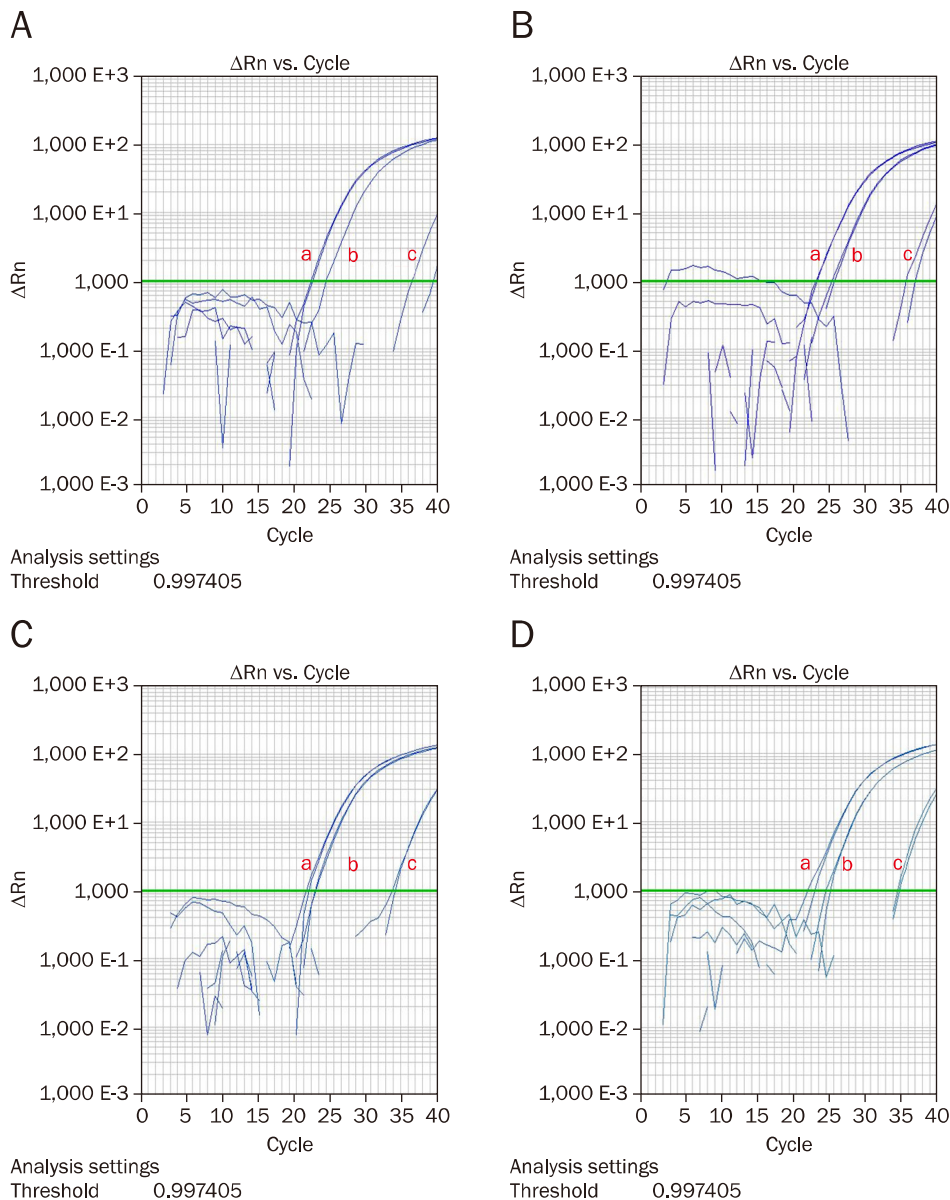


Fig. 3. MicroRNA-183 suppression in pancreatic cancer cell lines with RNU6B (a: Control, b: With mock, c: With anti-miR-183). (A) Panc-1, (B) MiaPaCa-2, (C) XPA-3, (D) BxPC-3.

Table 5. Decrease of Cell Survival by MicroRNA Suppression

	No gemcitabine (%)		Low concentration of gemcitabine (%)	
	miR-196a	miR-183	miR-196a	miR-183
XPA-3	25.6	6.6	18.7	4.8
MiaPaCa-2	13.5	-8.2	7.8	-2.7
BxPC-3	38.6	45.4	38.6	45.0
Panc-1	20.3	12.8	12.7	15.1
All	24.5	14.2	19.4	15.5

된다. 발현의 증가가 확인된 miR-196a와 miR-183의 발현이 다른 IPMN에서도 증가하였는지 여부를 알기 위해서 RT-PCR로 췌장암 세포주와 불멸화 정상 세포주를 대조군으로

삼아서 20명의 환자를 대상으로 분석한 결과, 이들 환자에서도 두 종류의 마이크로 RNA가 상승되어 있음을 관찰하였다.

증가된 miR-196a 및 miR-183의 췌장 종양 형성에서의 역할은 알려지지 않았다. 본 연구에서는 miR-196a 및 miR-183을 억제함으로써 췌장암 세포주의 증식이 일부 억제됨을 밝혔지만, 그 작용기전에 대해서는 명확하게 밝히지 못했다. Targetscan (<http://www.targetscan.org>)을 통해서 마이크로 RNA의 대상 mRNA를 조사해 보았을 때 miR-196a의 표적 RNA (conserved targets)로 약 211개가 있으며 miR-183의 표적 RNA (conserved targets)로는 약 309개가 있었다. 췌장암 이외의 암에서는 miR-196a 및 miR-183에 대한 몇 가지 연구가 있었다. Luthra 등은 한 연구에서 식도암에서 miR-196a가 세포자멸사와 세포성장을 억제하는 매개체로 작

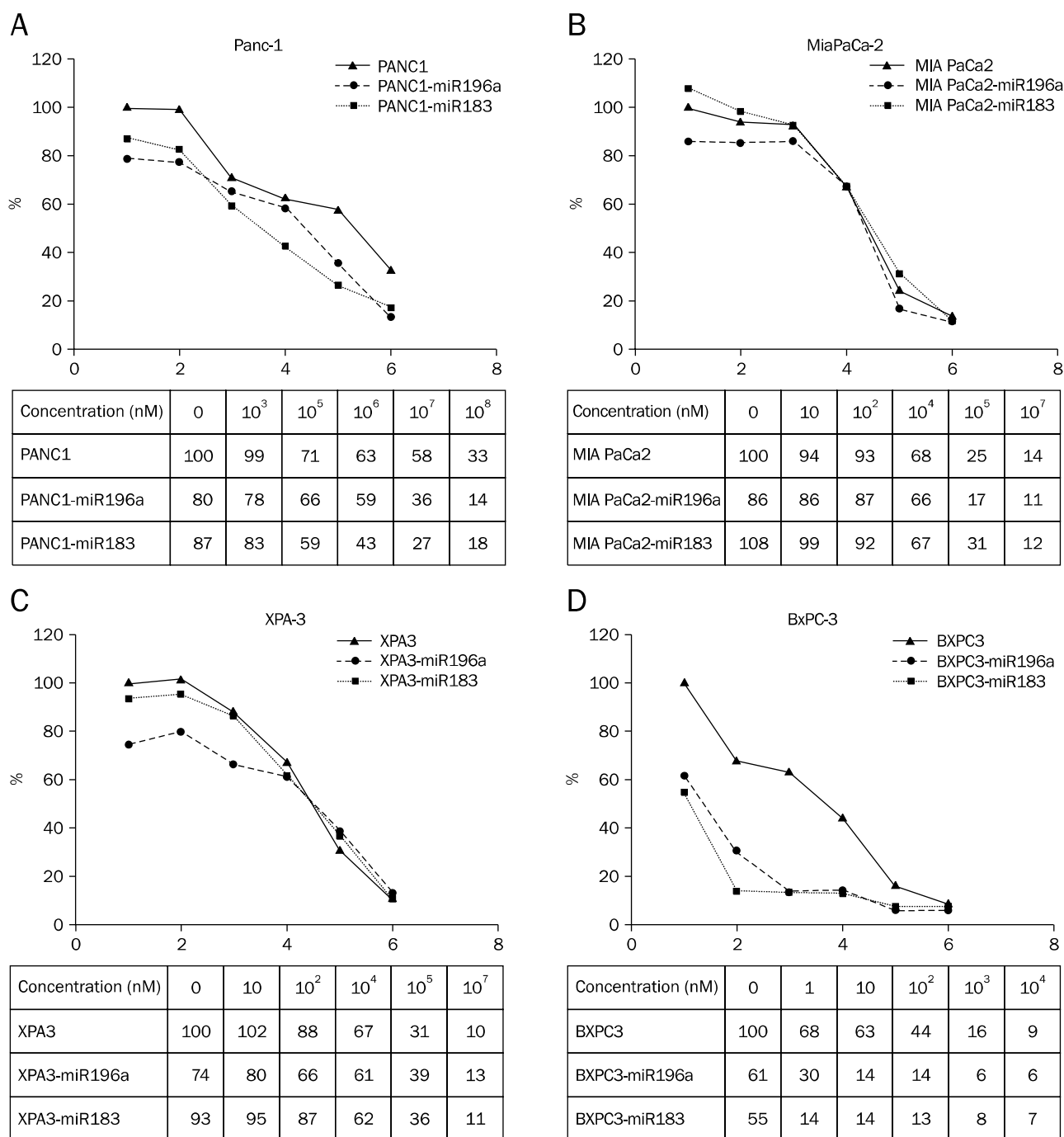


Fig. 4. Effect of anti-microRNA-196a and anti-microRNA-183 transfection into Gemcitabine treated pancreatic cancer cell lines. (A) Panc-1, (B) MiaPaCa-2, (C) XPA-3, (D) BxPC-3.

용하는 Annexin A1 mRNA와 단백질의 발현을 억제함으로써 세포성장과 비부착증식(anchorage independent growth)을 증진시키고 세포자멸사를 억제하는 종양 유발성(oncogenic potential)을 갖고 있다고 보고하였다.³² Maru 등이 바렛 식도를 대상으로 한 다른 연구에서는 miR-196a가 KRT5, SPRR2C, S100A9 단백질의 발현을 억제하여 바렛 식도의 이행

성 진행에 작용한다는 것으로 밝힌 바 있다.³³ miR-183은 간암에서는 세포자멸사 촉진을 시키는 PDCD4를 억제함으로써 종양 유발인자의 역할을 하지만,³⁴ 유방암과 폐암에서는 Ezrin 발현을 억제하여 종양 전이를 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다.^{27,35} 이러한 점은 각각의 마이크로 RNA는 발현되는 환경에 따라서 역할을 달리할 수 있다는 점을 시사한다.

본 연구는 췌장에서 발생한 IPMN에서 miR-196a와 miR-183이 증가되어 있으며 이들의 억제로 췌장암 세포주의 증식이 그 정도가 크지 않지만 억제됨을 밝혔다. 이러한 억제의 효과는 BxPc-3에서 비교적 큰 효과를 보였다. 현재 임상에 적용되는 표적 치료제의 특징은 대부분의 종양에서는 효과가 적지만 효과가 있는 특정군에서는 특별한 효과를 보인다. 이러한 점에서 마이크로 RNA를 이용한 치료도 효과가 있는 특정군이 있을 것으로 기대된다. 특히 뚜렷한 치료제가 없는 췌장 종양에서 마이크로 RNA의 연구는 향후 치료에 도움을 줄 것으로 기대된다.

요 약

목적: IPMN은 5년 생존율 5% 미만의 치명적인 암인 췌장암의 전암성 병변 중 하나이다. 마이크로 RNA의 생리적 기능은 mRNA의 안정성과 전사를 조절하는 것이다. 많은 종류의 암에서 비정상적인 마이크로 RNA 발현이 흔히 관찰되고 있으나 이제까지 IPMN에서의 연구는 거의 없다. 본 연구의 목적은 마이크로 RNA 발현 양상을 분석하고 그 역할을 알아보는 데 있다.

대상 및 방법: 환자 2명의 파라핀 조직을 이용하여 각각 주변 정상 조직, IPMN 내 선암 조직, 침습성 암 조직에서 DASL 마이크로어레이 방법을 통해 마이크로 RNA 발현 양상을 비교했다. 이들 중 비정상적으로 증가된 마이크로 RNA에 대해 20명의 또 다른 IPMN 환자 및 4개의 췌장암 세포주(Panc-1, MiaPaCa-2, XPA-3, BxPC-3), 불멸화된 정상 췌장조직 세포주에서 RT-PCR을 이용하여 검증하였다. 이 중 매우 증가된 2개의 마이크로 RNA 발현을 억제했을 때 효과를 알아보기 위해 췌장암 세포주에서 항마이크로 RNA 억제제를 사용하여 억제 후 CCK-8 방식을 이용해 생존을 분석하였다.

결과: IPMN에서 비정상적으로 증가된 122개의 마이크로 RNA 중 miR-552, miR-25*, miR-183, miR-1300, -miR-196a, miR-182*, and miR-30c-1*는 3배 이상 증가되어 있었다. 평균적으로 췌장암 세포주에서의 miR-196a와 miR-183은 정상 췌장세포주와 비교하여 각각 10,824배, 26,519배 증가되어 있었다. 또한 이들 두 마이크로 RNA는 20명의 IPMN 환자에서도 증가되어 있었다. 항마이크로 RNA 억제제를 이용하여 췌장암 세포주의 세포 생존을 측정한 결과 항 miR-196a에는 24.5%, 항 miR-183에는 14.2%의 감소를 보였다.

결론: IPMN에서 122개의 마이크로 RNA의 비정상적인 발현이 관찰되었다. 2개의 마이크로 RNA-miR-196a와 miR-183가 불멸화된 췌장 정상세포주보다 IPMN과 췌장암 세포주에서 증가되어 있었다. 두 마이크로 RNA의 억제로 췌장암 세포주의 세포 성장이 억제되었다.

색인단어: 췌장내 유두상 점액종; 마이크로 RNA; miR-196a, miR-183

REFERENCES

- Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004;363:1049-1057.
- Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, et al. Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* 2002;26:176-275.
- Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006;20:211-226.
- Rosty C, Goggins M. Early detection of pancreatic carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;16:37-52.
- Hruban RH, Wilentz RE, Maitra A. Identification and analysis of precursors to invasive pancreatic cancer. *Methods Mol Med* 2005;103:1-13.
- Maitra A, Fukushima N, Takaori K, Hruban RH. Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv Anat Pathol* 2005;12:81-91.
- Kim MH, Lee SK, Chung YH, et al. A case of mucinous ductal ectasia of the pancreas. *Korean J Gastroenterol* 1992;24:160-164.
- Nagai E, Ueki T, Chijiwa K, Tanaka M, Tsuneyoshi M. Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas associated with so-called "mucinous ductal ectasia". *Histochemical and immunohistochemical analysis of 29 cases. Am J Surg Pathol* 1995;19:576-589.
- Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005;438:685-689.
- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-838.
- Scherr M, Venturini L, Battner K, et al. Lentivirus-mediated antagomir expression for specific inhibition of miRNA function. *Nucleic Acids Res* 2007;35:e149.
- He L, He X, Lowe SW, Hannon GJ. MicroRNAs join the p53 network-another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer* 2007;7:819-822.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857-866.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:259-269.
- Dolieshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2008;10:203-211.
- Zhang X, Chen J, Radcliffe T, Lebrun DP, Tron VA, Feilott H. An array-based analysis of microRNA expression comparing matched frozen and formalin-fixed paraffin-embedded human tissue samples. *J Mol Diagn* 2008;10:513-519.
- Mittempergher L, de Ronde JJ, Nieuwland M, et al. Gene expression profiles from formalin fixed paraffin embedded breast cancer tissue are largely comparable to fresh frozen matched tissue. *PLoS One* 2011;6:e17163.

18. Reinholz MM, Eckel-Passow JE, Anderson SK, et al. Expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded primary breast tumors using cancer-specific and whole genome gene panels on the DASL[®] platform. *BMC Med Genomics* 2010;3:60.
19. Kibriya MG, Jasmine F, Roy S, Paul-Brutus RM, Argos M, Ahsan H. Analyses and interpretation of whole-genome gene expression from formalin-fixed paraffin-embedded tissue: an illustration with breast cancer tissues. *BMC Genomics* 2010; 11:622.
20. Waddell N, Cocciardi S, Johnson J, et al. Gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded familial breast tumours using the whole genome-DASL assay. *J Pathol* 2010; 221:452-461.
21. Bibikova M, Yeakley JM, Wang-Rodriguez J, Fan JB. Quantitative expression profiling of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using randomly assembled bead arrays. *Methods Mol Biol* 2008;439:159-177.
22. Abramovitz M, Ordanic-Kodani M, Wang Y, et al. Optimization of RNA extraction from FFPE tissues for expression profiling in the DASL assay. *Biotechniques* 2008;44:417-423.
23. Ravo M, Mutarelli M, Ferraro L, et al. Quantitative expression profiling of highly degraded RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumor biopsies by oligonucleotide microarrays. *Lab Invest* 2008;88:430-440.
24. Bibikova M, Talantov D, Chudin E, et al. Quantitative gene expression profiling in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using universal bead arrays. *Am J Pathol* 2004;165: 1799-1807.
25. Fan JB, Yeakley JM, Bibikova M, et al. A versatile assay for high-throughput gene expression profiling on universal array matrices. *Genome Res* 2004;14:878-885.
26. Qiu R, Liu Y, Wu JY, Liu K, Mo W, He R. Misexpression of miR-196a induces eye anomaly in *Xenopus laevis*. *Brain Res Bull* 2009;79:26-31.
27. Lowery AJ, Miller N, Dwyer RM, Kerin MJ. Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells. *BMC Cancer* 2010;10:502.
28. Habbe N, Koorstra JB, Mendell JT, et al. MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia. *Cancer Biol Ther* 2009;8:340-346.
29. Chien J, Fan JB, Bell DA, et al. Analysis of gene expression in stage I serous tumors identifies critical pathways altered in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2009;114:3-11.
30. Hammoud ZT, Badve S, Zhao Q, et al. Differential gene expression profiling of esophageal adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:829-834.
31. Haller AC, Kanakapalli D, Walter R, Alhasan S, Eliason JF, Everson RB. Transcriptional profiling of degraded RNA in cryopreserved and fixed tissue samples obtained at autopsy. *BMC Clin Pathol* 2006;6:9.
32. Luthra R, Singh RR, Luthra MG, et al. MicroRNA-196a targets annexin A1: a microRNA-mediated mechanism of annexin A1 downregulation in cancers. *Oncogene* 2008;27:6667-6678.
33. Maru DM, Singh RR, Hannah C, et al. MicroRNA-196a is a potential marker of progression during Barrett's metaplasia-dysplasia-invasive adenocarcinoma sequence in esophagus. *Am J Pathol* 2009;174:1940-1948.
34. Li J, Fu H, Xu C, et al. miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer* 2010;10:354.
35. Wang G, Mao W, Zheng S. MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Lett* 2008;582:3663-3668.