

## Down-regulation of miR-34a Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia with Human Papillomavirus Infection and Its Relationship with p53 Expression

Kyung Eun Lee<sup>†</sup>

Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan,  
Busan 609-757, Korea

microRNAs (miRNAs) play pivotal roles in controlling cell proliferation and differentiation. miRNA expression in human is becoming recognized as a new molecular mechanism of carcinogenesis. microRNA-34a (miR-34a), a member of the p53 network, was found to be regulated in multiple types of tumor. The purpose of this study was to define roles of miR-34a expression in cervical intraepithelial neoplasia with human papillomavirus infection, and its relationship with p53 protein expression. This study was performed to analyze expression of miR-34a by using qRT-PCR, and to evaluate p53 protein expression by using immunohistochemistry in 40 cases. Down-regulation of miR-34a expression was detected in 27 (67.5%) out of 40 cases and Immunoreactivity for p53 was found in 17 (42.5%) out of 40 cases. Nineteen (82.6%) of the 23 cases with a negative p53 expression showed a down-regulation miR-34a expression, there was a significant associations between miR-34a and p53 protein expression ( $P=0.04$ ). These results suggest that miRNA-34a expression tend to be reduced depending on the advanced histologic grade, and down-regulation of miR-34a expression might be associated with inactivation of p53 protein expression by human papillomavirus infection.

**Key Words:** miR-34a, p53, Cervical intraepithelial neoplasia, Human papillomavirus

자궁경부암의 주요 원인으로 알려진 인유두종 바이러스의 감염은 대부분 일시적이지만 소실되지 않고 지속되면 자궁경부의 세포 변화를 초래하게 되며, 자궁경부상피내 종양이 진행될수록 자연적 소실 가능성은 희박해지고 침윤성 자궁경부암으로 진행된다고 한다 (Myers et al., 2000; Pinto and Crum, 2000). 이러한 자궁경부 종양 발생은 인유두종 바이러스 감염에 의한 p53의 활성화와 연관성이 있다고 알려지면서 p53 단백질 발현에 대한 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 자궁경부 종양에서 인유두종 바이러스가 감염되면 HPV E6 및 HPV E7 단백질 발현이 증가되고 이들 단백질이 종양억제 유전자인 p53 및 pRb

유전자를 억제하여 세포 분열 주기의 조절 기능이 제대로 작동하지 않아서 암이 발생하는 것으로 알려져 있다 (Benchimol et al., 1985; Finlay et al., 1988; Levin et al., 1991).

최근에는 단백질을 coding 하지 않는 유전자도 암 발생에 관여한다고 밝혀지면서, 특히 microRNA (miRNA)에 대한 관심이 높아지고 있다. miRNA는 약 20개 내외의 nucleotide로 이루어진 작은 단일가닥의 non-coding RNA 이다 (Ma and Weinberg, 2007). miRNA는 주로 표적 mRNA의 3' UTR (untranslated region)에 특이적으로 결합하여 해당 RNA의 번역 (translation)을 억제하거나 또는 유전자 발현을 억제하는 등 전사 후 조절에 관여함으로써 세포의 증식, 분화, 사멸 등을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Calin and Croce, 2006). p53의 발현이 종양억제 miRNA의 가공을 촉진시킨다고 하였으며 (Suzuki et al., 2009), 주요 종양억제 miRNA로 알려진 miR-34a가 p53을 조절하는 또 다른 단백질 SIRT1의 발현을 억제함으로써 세포사멸사를 조절한다고도 보고되었다 (Yamakuchi et al., 2008).

\*Received: August 26, 2013 / Revised: December 27, 2013

Accepted: December 27, 2013

<sup>†</sup>Corresponding author: Kyung-Eun Lee. Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea.

Tel: +82-51-510-0562, Fax: +82-51-510-0568

e-mail: kelee@cup.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

또 다른 연구에서는 췌장암 세포, 대장암, 원발성 신경아세포종에서 miR-34a 발현이 감소되었다고 하였으며 (Lodygin et al., 2008), HPV E6 종양 단백질이 p53 유전자 기능을 억제하게 되면 miR-34a 발현에도 영향을 미칠 수 있다고도 하였다 (Chang et al., 2007). 이와 같이 miRNA는 다양한 발암 관련 유전자의 동시 조절 기전에 관여하는 것으로 알려져 있다.

그러나 종양 발생에 있어서 miR-34a 역할 및 p53 단백질 발현과의 연관성은 명확히 밝혀지지 않은 상태이며, 특히 국내에서는 인유두종 바이러스에 감염된 인체 종양을 대상으로 한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 인유두종 바이러스에 감염된 자궁경부상피내 종양 파라핀 블록을 이용하여 miR-34a 발현 및 p53 단백질 발현과의 연관성 분석을 통해 자궁경부 종양의 새로운 발생 기전을 알아보려고 한다.

본 연구는 2011년 1월부터 2011년 12월까지 부산 모 병원 병리과에서 자궁경부 생검을 통하여 이형성증 및 상피내암으로 진단받은 조직을 대상으로 하였다. 슬라이드 표본을 검사하여 생검 전 약물요법 등의 보조적 치료를 받지 않은 조직 중 비교적 고장이 잘 된 파라핀 블록 40예를 사용하였다. 본 연구의 조직 슬라이드는 병리 의사가 재검토하여 진단 분류의 일치성을 높였다.

파라핀 블록을 10 µm 두께로 박절한 후 자일렌에서 탈파라핀을 실시하였다. RcoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA)를 이용하여 RNA를 추출한 후, TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)로 RT-PCR을 실시하였다. miR-34a 정량을 위해 TaqMan® MicroRNA Assays 1.0 µl, cDNA 1.33 µl와 TaqMan® Universal PCR master Mix 10 µl를 섞은 후에 Real-time PCR (BioRad, USA)에서 95°C 10분, 95°C 15초, 60°C 60초를 총 40회 반복하였다. 대조군인 RNU6B와 miR-34a의 Ct값을 표준화 (normalization) 한 후 상대 정량법으로 분석하였다.

Applied Biosystems에서 제공하는 miR-34a (Part Number P/N 4427975 Assay ID TM00042, RT000426) 및 RNU6B (Part Number P/N 4427975)에 대한 RT primer를 사용하였다.

4 µm 두께로 절편된 조직을 자일렌에서 탈파라핀하고 함수 과정을 거친 후 흐르는 물에서 10분간 씻어냈다. 항원성 회복을 위하여 pH 9.0 Tris-EDTA 용액으로 전자 레인지에서 10분간 끓이는 전처리를 하였다. 조직 내의 내인성 과산화 효소를 비활성화 시키기 위하여 실온에서 Hydrogen peroxide block (Lab vision, Lab Vision, Fremont,

**Table 1.** Expression of miR-34a in cervical intraepithelial neoplasia with human papillomavirus infection

Histology	miR-34a expression		P
	Up-regulation n (%)	Down-regulation n (%)	
CIN I	6 (60)	4 (40)	0.121
CIN II	3 (30)	7 (70)	
CIN III	3 (30)	7 (70)	
CIS	1 (10)	9 (90)	

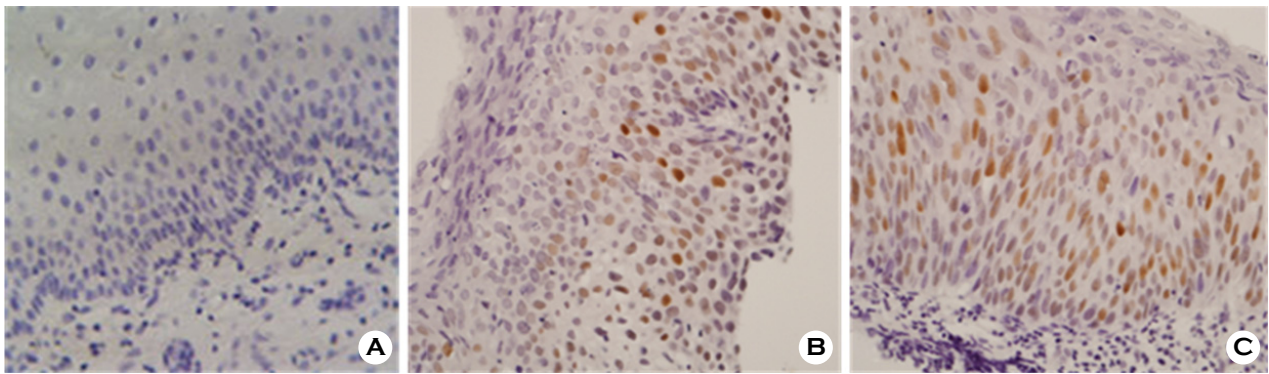
CIN; Cervical Intraepithelial Neoplasia  
CIS; Carcinoma in Situ

USA)에서 10분간 반응시킨 후 Tris buffered saline (pH 7.4)로 세척하였다. 비특이적인 반응을 줄이기 위하여 Blocking solution (Life Science, Mukilteo, USA)에서 10분간 더 반응시켰다. 수세 과정 없이 토기 단클론성 일차항체 p53 (Lab Vision, Fremont, USA)을 1:100으로 희석하여 실온에서 한 시간 동안 반응시킨 후, Broad antibody enhancer (Life Science, Mukilteo, USA)에서 10분간, Polymer-HRP (Life Science, Mukilteo, USA)에서 30분간 반응시켰다. 면역염색 후 DAB (3,3'-Diaminobenzidine)로 발색시킨 후 Gill's hematoxylin으로 대조염색 하였다.

면역조직화학 염색 결과 p53 단백질은 종양 세포의 핵에 갈색으로 염색될 때를 양성으로 판정하였다. 100배 시야에서 염색되지 되지 않은 경우 즉, 0%를 0점, 25% 미만의 종양 세포가 염색되는 경우 1점, 26~50% 2점, 50% 이상을 3점으로 하였다. 그리고 염색 강도에 따라 음성은 0점, 약 양성인 경우를 1점, 중등도 양성인 경우를 2점, 강 양성을 3점으로 분류하였다. 염색 강도에 따른 점수와 분포 점수를 더한 값이 0~2점이면 음성, 3점 이상이면 면역염색 양성으로 판정하였다.

통계 처리는 SPSS (Version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. miR-34a 발현과 p53 단백질 발현과의 연관성을 평가하기 위해서는  $\chi^2$  검정방법을 사용하여 분석하였고, 통계학적으로  $P \leq 0.05$ 일 때 유의한 것으로 간주하였다.

인유두종 바이러스에 감염된 자궁경부상피내 종양으로 진단된 파라핀 블록 총 40예는 각각 Cervical intraepithelial neoplasia I (CIN I) 10예 (25%), CIN II 10예 (25%), CIN III 10예 (25%), Carcinoma in situ (CIS) 10예 (25%)로 분류되었다. miR-34a 발현은 총 40예 중 27예 (67.5%)에서 감소되었고, 13예 (32.5%)에서 증가하였다 (Table 1). 자궁경부상피내 종양의 등급에 따른 miR-34a



**Fig. 1.** Immunohistochemical studies for p53 in cervical intraepithelial neoplasia with human papillomavirus infection; negative nuclear reaction (A; CIN II, ×400), but a positive reaction (B; CIN I, C; CIN II, ×400) identified by brown staining.

**Table 2.** Relationship between miR-34a and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia with human papillomavirus infection

Expression	p53 protein expression		P
	Negative n (%)	Positive n (%)	
miR-34a			
Down-regulation	19 (82.6)	8 (47.1)	0.04
Up-regulation	4 (17.4)	9 (52.9)	

발현을 살펴보면 CIN I에서는 10예 중 4예 (40%)에서 감소되었고, CIN II와 CIN III에서는 10예 중 7예 (70%)에서 감소되었고, CIS에서는 10예 중 9예 (90%)에서 발현이 감소되었다 (Table 1). 따라서 자궁경부상피내 종양이 진행될수록 miR-34a 발현량이 감소하는 경향을 보였으나, 통계적으로는 유의하지 않았다 ( $P=0.12$ ).

p53 단백질은 40예 중 17예 (42.5%)에서 양성 발현을 나타냈고, 23예 (57.5%)에서 음성 발현이 나타났다 (Table 2, Fig. 1). p53 단백질 발현과 miR-34a 발현의 상관성을 분석한 결과, p53 단백질 발현이 음성일 때 miR-34a 발현이 감소되는 경우가 총 23예 중 19예 (82.6%)로 가장 높게 나타났다며, 통계적으로 유의한 차이가 관찰되었다 ( $P=0.04$ , Table 2).

p53 단백질의 불활성화는 다양한 인체 암종의 발암 기전에 관련이 있는 것으로 알려져 있다. p53 유전자의 돌연변이에 의해서 p53 단백질의 기능이 상실되기도 하고, HPV의 E6 단백질에 의해 p53 단백질이 분해되어 불활성화가 일어나기도 한다 (Scheffner et al., 1993; Herrington, 1995). 자궁경부 종양에서는 인유두종 바이러스 감염에 의한 p53

단백의 불활성화가 대부분을 차지하고 있으며 p53 유전자의 돌연변이에 의한 단백질 기능 상실은 인유두종 바이러스 감염이 없는 자궁경부 종양에서 발생한다고 보고되었다 (Scheffner et al., 1993; Herrington, 1995). 많은 연구에서 자궁경부 종양에서의 p53 단백질 발현은 통계적으로 차이가 없다는 보고도 있고 (Kim et al., 2003), 자궁경부 종양의 80% 이상에서 단백질 발현이 관찰된다는 결과 등 다양하게 보고되고 있다 (Park et al., 2001). 본 연구에서 p53 단백질 발현은 자궁경부 종양 40예 중 17예 (42.5%)에서 양성으로 관찰되었으며, 23예 (57.5%)에서 음성으로 관찰되었다. 이는 인유두종 바이러스 감염에 의한 종양억제유전자의 기능 억제로 추측할 수 있으나, 발암 관련 p53 단백질 발현에 관한 기전을 설명하기 위해서는 좀 더 많은 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Lu 등 (2005)의 연구에서는 miRNA는 정상 조직에 비해 암 조직에서 발현량이 낮게 나타나므로 종양억제유전자로서의 가능성을 보고하였다. 따라서 miRNA 생성에 직접적으로 관련된 유전자를 knock-down 시켜 전반적인 miRNA를 감소시켰을 때 종양 형성이 촉진된다고 하였다 (Lu et al., 2005; Kumar et al., 2007). 그러나 현재까지 200여 개의 miRNA가 보고되고 있으나, 대부분의 기능이 밝혀지지 않고 있다. 그 중에서 miR-34a는 췌장암 및 대장암의 발생에 관여하는 종양억제 miRNA라고 알려져 있으며 (Lodygin et al., 2008), 췌장암 세포에서 miR-34a 발현을 증가시키면 암세포 침윤이 억제된다고 보고되었다 (Ji et al., 2009). 본 연구에서도 자궁경부 종양 40예 중 27예 (67.5%)에서 miR-34a 발현이 감소되는 것을 관찰하였으며, 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나 자궁경부상피내 종양이 진행될수록 miR-34a의 발현량이 감소되는 경

향을 나타내었다. 이는 인유두종 바이러스에 감염되면 HPV E6 단백질이 miR-34a 발현을 억제시킨다는 다른 연구 결과 (Zheng and Wang, 2011)와 일치하였다.

인유두종 바이러스가 HPV E6 종양 단백질에 의해 활성화되면 종양억제유전자인 p53 유전자의 기능이 억제되고, p53 유전자를 특이적으로 인지하는 부위가 있는 miR-34a의 발현에 영향을 미친다고 알려져 있다 (Zheng and Wang, 2011). Wang 등 (2009)은 고위험군 인유두종 바이러스의 E6 단백질은 miR-34a 발현을 감소시킨다고 하였으며, 다른 연구에서는 인유두종 바이러스에 감염된 자궁경부암 세포 내 E6 단백질 발현을 억제시켰더니 p53 유전자와 miR-34a 발현량이 증가되었다고 하였다 (Kivi et al., 2008; Zheng and Wang, 2011). 본 연구에서도 p53 단백질 발현이 음성으로 관찰될 때 miR-34a 발현이 감소되는 경우가 23예 중 19예 (82.6%)로 높게 관찰되었으며 통계적으로 유의한 차이가 나타났다 ( $P=0.04$ ). 이는 인유두종 바이러스 감염에 의한 HPV E6-p53 복합체와 miR-34a의 상호 작용에 의한 발암 기전을 설명해주는 결과라고 생각된다. 하지만 다른 연구에서는 p53 유전자와 별개로 miR-34a의 프로모터 부위의 CpG island에서 발생하는 메틸화가 miR-34a 발현을 불활성화시킬 수 있다고 보고 (Lodygin et al., 2008)되기도 하였으므로 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 인유두종 바이러스에 감염된 자궁경부상피내 종양이 진행될수록 miR-34a의 발현이 감소되는 경향을 확인할 수 있었으며, miR-34a 발현이 감소될 때 p53 단백질 발현이 억제되는 경향도 확인할 수 있었다. 그러나 연구 재료의 수가 적어서 상호간의 연관성을 단정하기는 어려우므로 향후 더 많은 인체 암종을 대상으로 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 메틸화 실험을 추가적으로 실시함으로써 miR-34a의 불활성화에 대한 정확한 원인 규명이 이루어져야 할 것이다.

## REFERENCES

- Benchimol S, Lamb P, Crawford LV, Shows TB, Bruns GA. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somatic Cell Mol Genet.* 1985. 11: 505-509.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2006. 6: 857-866.
- Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell.* 2007. 26: 745-752.
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell.* 1988. 57: 1083-1086.
- Herrington CS. Human papillomaviruses and cervical neoplasia. II. Interaction of HPV with other factors. *J Clin Pathol.* 1995. 48: 1-6.
- Ji Q, Hao X, Zhang M, Tang W, Yang M, Li L, Xiang D, Desano JT, Bommer GT, Fan D, Fearon ER, Lawrence TS, Xu L. MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PLoS One.* 2009. 4: e6816.
- Kim MY, Cho SH, Park MH. Analysis of expression of p63 in cervical neoplasia comparing with other immunohistochemical markers. *Korean J Pathol.* 2003. 37: 333-341.
- Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene.* 2008. 27: 2532-2541.
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet.* 2007. 39: 673-677.
- Levin AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature.* 1991. 351: 453-456.
- Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle.* 2008. 7: 2591-2600.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005. 435: 834-838.
- Ma L, Weinberg RA. MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle.* 2007. 7: 570-572.
- Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol.* 2000. 151: 1158-1171.
- Park IS, Han HS, Kim TS. Immunohistochemical expression of p53, p21, and mdm2 proteins in human papillomavirus positive and negative invasive uterine cervical carcinomas.

- Korean J Pathol. 2001. 35: 212-219.
- Pinto AP, Crum CP. Natural history of cervical neoplasia: defining progression and its consequence. Clin Obstet Gynecol. 2000. 43: 352-362.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell. 1993. 75: 495-505.
- Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S, Miyazono K. Modulation of microRNA processing by p53. Nature. 2009. 460: 529-533.
- Wang X, Wang HK, McCoy JP, Banerjee NS, Rader JS, Broker TR, Meyers C, Chow LT, Zheng ZM. Oncogenic HPV infection interrupts the expression of tumor-suppressive miR-34a through viral oncoprotein E6. RNA. 2009. 15: 637-647.
- Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 2008. 105: 13421-13426.
- Zheng ZM, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. Biochim Biophys Acta. 2011. 1809: 668-677.
-