

Expression of Micro RNA in Paraffin Embedded Tissue of Multiple Myeloma

Woo Soon Choi¹ and Kye Chul Kwon²

¹Department of Clinical Pathology, The Songho College, Hoengseong 25242, Korea

²Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea

다발성골수종 환자의 파라핀포매조직에서 MicroRNA 발현

최우순¹, 권계철²

¹송호대학교 임상병리과, ²충남대학교병원 진단검사의학과

Research of thyroid cancer, liver cancer, and lung cancer has been reported in Korea. However microRNA research of multiple myeloma has never been reported. Hence we intended to confirm whether microRNA can be utilized as a diagnostic marker to patients of multiple myeloma. We also intended to evaluate whether microRNA can be detected in paraffin-embedded tissue (FFPE). This research was conducted targeting 8 samples from patients of multiple myeloma who do not have any other diseases, and 2 control samples. From January 2010 to July 2012, we selected miR-15a, miR-16, miR-21, miR-181a and miR-221 as microRNA target genes. It was decided that for a sample to be significant, the results should show values more than 1.5 or less than -1.5. Our findings of fold change were highly significant in miR-15a with a value of 37.5% (3/8). From these studies, we learned that miR-15a is useful with westerners. miR-221, on the other hand, shows conflicts with westerners, so more research will be needed in this area. In addition, it was confirmed that microRNA can be detected in paraffin embedded tissue (FFPE).

Keywords: Multiple myeloma, MicroRNA-15a, Paraffin embedded tissue

Corresponding author: Kye Chul Kwon
Department of Laboratory Medicine, College of
Medicine, Chungnam National University,
Daejeon 35015, Korea
Tel: 82-42-280-7799
E-mail: kckwon@cnu.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2015 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: November 1, 2015
Revised 1st: November 16, 2015
Revised 2nd: November 21, 2015
Accepted: November 21, 2015

서 론

다발성 골수종은 주요 혈액질환으로 형질세포가 비정상적인 분화과정과 증식으로 인해 뼈에 축적되어 뼈의 통증, 뼈 부종, 골절, 척추 협착 등이 나타나며 진단 당시 뼈 관련 질환이 환자의 70%에서 동반된다. 이외 신장 손상과 혈소판 감소증, 백혈구 감소증 등의 증상이 있다. 같은 혈액암의 일종인 백혈병은 혈소판이 떨어지는 것으로 쉽게 진단이 되지만 다발성 골수종은 뼈가 손상되는 증상이기 때문에 많이 진단되기까지 오랫동안 병을 모르고 지나는 경우가 많아 위험하며, 혈액종양의 주요 사망 원인 중 하나이다(Bang 등, 2006; Takimoto 등, 2008; Lee 등, 2012).

최근 진단, 예후 예측 및 치료를 목적으로 세포내 유전자 발현과정의 증추적 조절인자로 발달, 세포 분화, apoptosis와 세포 증식과 같은 생리적 프로세스 조절에 중요한 역할을 하는 microRNA (*miR*)에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Vasilatou 등, 2009; Farazi 등, 2013). MicroRNA는 19~24개의 뉴클레오타이드 (nucleotide)로 microRNA와 상보적 결합을 통하여 세포내 유전자 발현과정의 증추적 조절인자로 작용한다(Munker와 Calin, 2011). 사람은 1,600개 정도의 microRNA를 가지고 있다(Iorio 등, 2009; Satoh, 2012).

MicroRNA는 종양고형물과 혈액학적 악성종양 모두의 발병에 중요한 역할을 하고 있다. 암의 생성과정에서 microRNA는 표적유

전자에 따라 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)와 종양유전자(oncogene)로 작용하고 있으며, 발현 양상이 달라 이를 활용한 연구가 이루어지고 있다. 현재 전립선암, 유방암, 자궁암, 대장암, 췌장암과 같은 각종 암 그리고 급성골수성백혈병, 심근경색등에 관한 microRNA 인자에 대한 연구가 광범위하게 보고되고 있으며 표지자를 발굴하고 있다(Mattie 등, 2006; Porkka 등, 2007; Schetter 등, 2008; Kota 등, 2009).

하지만 우리나라의 경우 갑상선암, 간암, 폐암 관련 연구가 보고되었으나(Han과 Kim, 2009; Kim 등, 2009; Son 등, 2009; Chang 등, 2011; Sung 등, 2015) 다발성 골수종환자에 관한 microRNA 연구는 보고된 경우가 없어 알아보하고자 하였다.

다발성 골수종환자에서, Corthals 등(2010)은 miR-15a와 miR-16이 13 deletion과 연관성이 있고 down expression된다고 하였으며, Croce 등(2009)과 Roccaro 등(2009)은 down expression을 보고하였다. Loffler 등(2007)과 Iorio 등(2009)은 miR-21이 over expression 된다고 하였고, Roccaro 등(2009)과 Munker 등(2011)은 miR-181a와 miR-221이 over expression 된다고 보고하였다. 이와 같이 다발성 골수종에서 유의성이 있다고 보고한 miR-15a, miR-16와 miR-21, miR-181, miR-221를 선정하여 서양인과 한국인에서의 발현을 비교하여 확인하고자 하였다.

또한, 다발성 골수종 환자의 골수(bone marrow)에서 aspiration 한 검체를 이용한 연구가 대부분 보고되고 있으며(Pichiorri 등, 2008; Zhouet 등, 2010) 파라핀 포매 조직(formalin fixed paraffin embedded tissue, FFPE)을 이용한 경우는 거의 없어(Yaguang 등, 2007) 파라핀 포매 조직에서도 가능한지 알아보았다.

본 연구의 주요 목적은 한국인의 다발성 골수종 환자에서 서양인과 같은 발현을 보이는지 확인 하고자 하였으며, 특히 다발성 골수종 환자에서 microRNA를 진단에 활용할 수 있는지 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료

연구 대상은 2010년 1월부터 2012년 7월까지 충남대학교병원 진단검사의학과에 다발성 골수종 진단을 위해 골수검사를 의뢰한 환자를 대상으로 하였다. 본 연구는 충남대학교병원 임상시험심사위원회(CNUH IRB 2012-03-014-001) 심사를 거쳐서 시행하였다. 다발성 골수종은 The International Myeloma Working Group (national comprehensive cancer network, NCCN)의 진단기준을 이용하여 진단된 8예로 하였으며, 대조군은 다발성 골수종 질환이 없고 염색체 이상이 없는 2예를 대상으로 하였다. 성별

평균연령은 남자 4명 62세, 여자 4명 64세로 나타났다.

연구 대상의 채택 기준은 다발성 골수종 환자 중 종양 질환이 없고, 염색체 핵형분석을 확인하여 다발성 골수종과 관련이 가장 많은 14q32, 13q, 17p 결손(deletion) 그리고 염색체 1의 이상(1p 소실과 1q 추가), 1q 세염색체(trisomy)의 염색체 이상인 환자를 제외한 8예를 선정하였다.

본 실험 전에 예비실험을 2회 실시하였으며, 첫 번째 실험에서 파라핀 포매 조직에서 microRNA가 추출되는지 4 검체를 시행하였으며, 두 번째 예비실험에서는 다발성 골수종 17예, 대조군 3예로 총 20예를 진행 한 후 본 실험을 진행하였다.

2. 실험 방법

다발성 골수종 환자의 파라핀 포매 조직에서 추출된 RNA 용해 물을 실온에 꺼내놓은 capture probes가 입혀진 microplate에 넣고, capture extender와 target probes를 넣고 hybridization 시켰다. Pre-amplifier를 hybridize하고 bDNA를 hybridize하였다 (Amplifier단계). 화학발광 기질을 넣고 luminometer (Panomics L-100, Affymetrix inc, San Jose, California, United States)로 판독하였다. Normalization은 human SNORD43 (QuantiGene 2.0 miRNA assay, Affymetrix inc, Santa Clara, California, United States)으로 하였다.

1) mRNA Purification in FFPE

골수 천자한 파라핀 포매 조직을 5 μ m 두께로 15 장씩을 잘라 1.5 mL microtube에 넣었다. 각 검체에 homogenization solution 600 μ L와 proteinase K 6 μ L (QuantiGene sample processing Kit, Affymetrix) 비율로 검체 수 만큼 준비하여 혼합한 후 606 μ L 씩 검체가 들어있는 microtube에 분주 하였다. 미리 온도를 맞추어 확인 된 65°C heating block에 넣고 6시간 동안 incubate 시행 하며, 1시간마다 꺼내어 maximum speed로 1분간 vortex mix를 반복하였다. Incubate 끝난 후 5분간 maximum speed 13,000 rpm으로 5분간 원침하여 상층액을 다른 microtube로 옮기면서 파라핀과 침사물이 없고 맑은 상층액이 될 때까지 반복하였다. 추출된 상층액을 다음 단계에 이용하였다.

2) Target hybridization

미리 만들어 놓은 working solution (1 well 당 nuclease-free water 25.1 μ L, lysis mixture 33.3 μ L, blocking reagent 1.0 μ L, CE 0.3 μ L, LE 0.3 μ L 비율로 혼합) 60 μ L를 거품이 나지 않도록 30 분전 실온에 꺼내 둔 capture plate에 분주하고, 추출해 놓은 상층액을 target gene probe 1 개당 40 μ L씩 capture plate 2 개 well에

옮겼다(1 검체별 2 회 반복 검사 위해 2 개 well 분주). 그리고 blank 는 working solution 40 μ L, human SNORD43 40 μ L를 별도 well에 넣었다(검체와 같은 방법으로 2 개 well 분주). 전부 sealing film으로 덮은 후 롤러로 밀착 시켰다. 교반기에 넣고 240 rpm에서 20 초간 혼합 한 후 46°C \pm 1°C heating block 에 넣고, 16시간 동안 반응을 시켰다. 반응 후 다음 단계를 진행하였다.

3) Amplification

인큐베이터에서 반응 한 capture plate를 가져와 sealing film 을 제거 후 미리 만들어 놓은 washing buffer (1 plate 기준으로 washing buffer는 증류수 400 mL, wash buffer component 1.5 mL, component 2.5 mL를 혼합한다)를 well당 200 μ L씩 분주한 후 buffer가 완전히 나오도록 버린 후 깨끗한 헨드타올 위에 뒤집어 강하게 털어내 제거하였다. 다시 washing buffer 300 μ L씩 넣은 후 강하게 털어내 제거한 다음 마지막으로 washing buffer 300 μ L씩 넣은 후 강하게 털어내 제거하였다. 그 다음 240 rpm 교반기 위에 헨드타올 놓고 뒤집어 1분간 용액 완전히 말렸다. 만들어 놓은 2.0 pre-amplifier solution (1 plate 기준으로 pre-Amplifier 시약을 spin down 시킨 후 11 μ L를 정확히 취한 다음 amplfier/label probe diluent 11 mL를 혼합하여 실온에 놓았다.) 100 μ L씩 각 well에 분주하고, sealing film 밀착 후 46°C에서 1시간 반응시켰다. 꺼내서 washing을 전 단계와 같은 형태로 3회 시행한 후 준비된 2.0 amplifier solution을 100 μ L씩 각 well에 분주하고, sealing film 밀착 후 46°C에서 1시간 반응시켰다. Washing 3 단계를 전과 동일하게 시행 후 만들어 놓은 Label Probe (1 plate 기준으로 label probe 시약을 spindown 후 각 label probe 11 μ L에 amplfier/label probe diluent 11 mL 비율로 혼합) 100 μ L씩 각 well에 분주하고 46°C heating block에서 sealing film 밀착 후 1 시간 반응시켰다.

4) Detection

반응이 끝난 capture plate를 꺼내 washing 3 단계를 거친 후 2.0 기질 용액 100 μ L를 넣고, sealing film으로 덮은 후 실온에서 5분 동안 방치 후 luminometer에서 15분 이내 판독하여 relative light unit (RLU)를 측정하였다.

3. 통계 분석

통계분석은 상관성결과는 pearson correlation으로 하였으며, 유의성검정은 비모수검정을 이용하였다(SPSS PASW Statistics 18.0, SPSS inc, Chicago, Illinois, United States). Fold change값 결과는 human SNORD43을 이용하여 normalization 한 결과 값

을 대조군 대비 환자 결과 값으로 하였다(환자 결과 값/control 값). Fold change 값은 1.5 이상을 over expression, -1.5 이하를 down expression으로 판정하였다(McCarthy 등, 2009; Tan 등, 2009).

결 과

1. 대상환자의 임상적 특징

다발성 골수종 대상자는 임상검사항목인 혈색소 수치, 혈소판 수, 혈청 칼슘 농도, 혈청 알부민 농도, 혈청 크레아티닌, C-반응단백(C-reactive protein, CRP), 젖산탈수소효소(lactic dehydrogenase, LDH), β 2-microglobulin, 면역글로블린정량, 골수흡인과 생검, 혈청단백 전기영동과 면역고정전기영동, 뼈용해 병변 관찰을 시행하였고, 염색체 분석은 고식적 행형분석(conventional karyotyping)과 형광제자리부합법(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)을 실시하여 다발성 골수종 환자로 진단 받고, 다른 종양 질환이 없는 8예와 종양 질환이 없는 대조군 2 예를 선정하여 총 10예를 실시하였다. 다발성 골수종 진단을 받은 환자 중 골수 검사 상 형질세포가 30% 이상을 차지하는 경우는 4예, 이하인 경우 4예였다(Table 1).

MicroRNA의 probe는 QuantiGene miRNA Probe Sets-50rxn (<43 bp)(Affymetrix inc, Santa Clara, California, United States)를 이용하였으며, 염기서열은 *miR*-15a는 UAGCAGCACAAUAAU-GGUUUGUG, *miR*-16은 UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG, *miR*-181a는 AACAUUCAACGUCGUCGGUGAGU, *miR*-21은 UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA 그리고 *miR*-221은 AGCUA-CAUUGUCUGCUGGGUUUC이었다(Table 2).

2. MicroRNA 분석 결과

대조군을 기준으로 평균 fold change 값은 *miR*-15a가 -0.8로

Table 1. Chromosomal karyotype and plasma cell of 8 patients with multiple myeloma

Specimen	Chromosome karyotype	Disorder	Plasma cell (%)
1	46,XX[20]	Multiple myeloma	26
2	46,XX[20]	Multiple myeloma	36
3	46,XY[20]	Multiple myeloma	49
4	46,XX[20]	Multiple myeloma	23
5	45,X,-Y[3]	Multiple myeloma	33
6	46,XY[11]	Multiple myeloma	30
7	46,XY[20]	Multiple myeloma	12
8	46,XX[20]	Multiple myeloma	11

나타났으며, *miR-16*는 -0.7, *miR-21*은 0.2 그리고 *miR-221*은 -0.4로 나타났다. 유의하지는 않지만 *miR-15a*와 *miR-16*는 비교적 높은 down expression 나타났다(Table 3, 4).

각 검체별 fold change 값이 1.5 이상 또는 -1.5 이하로 유의성을 보인 경우 *miR-15a*는 3예(37.5%)로 모두 down expression 이었으며, 전체 *miR-15a* 중 decrease를 보인 경우가 8예(100%)로 나타났다. *miR-16*은 유의성을 보인 경우 3예(37.5%)였으며, 그 중 2예가 down expression을 보였고, 전체 *miR-16* 중에서 decrease를 보인 경우가 5예(62.5%)였다. 그리고 *miR-221*은 유의성을 보인 경우가 4예(50.0%)이며, 이 중에서 3예(75.0%)가 down expression으로 나타났으며, 전체적으로 decrease는 6예(75.0%)로 나타났다. 결과적으로 *miR-15a*와 *miR-221*은 유의성 있는 경우가 3예(37.5%), 전체적으로 유의성은 없었지만 100%와 75.0%가 decrease를 보였다. *miR-16*과 *miR-21*은 유의성을 보이지 않았다(Table 4, 5).

각 검체별 2 회 반복검사를 실시한 상관관계는 *miR-15a* 0.917, *miR-16*은 0.826, *miR-21*은 0.959, *miR-181a*는 0.486으로 나타났으며, *miR-221*은 0.707로 *miR-181a*를 제외하고 높은 일치를

보였다. 하지만 *miR-181a*는 상관계수가 낮게 나와 결과에서 제외하였다(Table 3). 통계학적 유의성검정(*p*-value)에서 *miR-15a*는 0.257, *miR-16*은 0.480, *miR-21*은 0.988 그리고 *miR-181a*는 0.705로 모두 유의성을 보이지 않았지만 *miR-15a*가 microRNA 중에서는 유의한 값에 가까운 결과를 보였다(Table 5).

고 찰

다발성 골수종은 혈액 암으로서 최근 발생률과 사망률이 급격하게 증가하고 있다. 20년 전과 비교하여 우리나라의 암으로 인한 전체 사망이 2.5배 정도가 증가하고, 백혈병의 경우 2배, 악성림프종이 5배 증가한 것에 비할 때 다발성 골수종은 무려 최소 30배 이상 증가하여 주목 할 만한 증가율을 보이고 있다(Lee 등, 2012).

이와 같은 급속한 증가는 의료보험이 확대되면서 특히 고령층에 대한 의료혜택의 기회가 많아짐으로 인해 발견 증례가 증가하였고, 급속한 산업화와 서구식 식생활 등으로 인한 환경적 영향이 크고 연령대별 발생율이 60대 이후를 보이고 있어 고령화와 함께 최근 발생률과 사망률이 급격히 증가하고 있다. 우리와 인종이 비슷하면서 먼저 고령사회로 진입한 일본의 예를 고려하면 앞으로 지금의 2배 가량 환자가 늘어날 것으로 추정된다.

본 연구에서 대조군을 기준으로 fold change 1.5 이상 또는 -1.5 이하로 유의성을 확인한 결과에서 *miR-15a*는 3예(37.5%)로 모두 down expression 되었으며, 전체 *miR-15a* 중 decrease

Table 2. Discriminate between closely related family members

MicroRNA	Sequence
<i>miR-15a</i>	UAGCAGCACAUAAUGGUUUUGUG
<i>miR-16</i>	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
<i>miR-181a</i>	AACAUUCAACGCUGUCGUGAGU
<i>miR-21</i>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUUGA
<i>miR-221</i>	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUUC

Table 3. MicroRNAs differentially expressed between MM (n=8) and controls (n=2)

MicroRNA	Average Fold change	Pearson correlation	Chromosomal location
<i>miR-15a</i>	-0.8	0.917	13q14.2
<i>miR-16</i>	-0.7	0.826	13q14.2
<i>miR-21</i>	0.2	0.959	17q23.1
<i>miR-181a</i>	0.3	0.486	1q32.1
<i>miR-221</i>	-0.4	0.707	xp11.3

Table 4. Fold change of individual microRNAs in multiple myeloma patients

Cases	<i>miR-15a</i>	<i>miR-16</i>	<i>miR-21</i>	<i>miR-221</i>
1	-3.1	1.2	0.2	3.9*
2	0.5	1.6*	0.1	0.9
3	0.5	0.6	0.0	0.5
4	-0.4	-0.8	0.3	0.7
5	-0.1	1.3	1.2	1.0
6	-1.6	-6.5*	-0.1	-5.8*
7	-1.6	-1.7*	-0.1	-2.1*
8	-0.4	-1.0	-0.1	-1.9*

*Significance of Fold change: 1.5 < Patient result, Patient result < -1.5.

Table 5. Results of expressed as fold change of the microRNA in multiple myeloma

MicroRNA	1.5 < Patients	Patients < -1.5	Expression	Reseach	<i>p</i> -value
<i>miR-15a</i>	0	3 (37.5)	Down	Down	0.257
<i>miR-16</i>	1 (12.5)	2 (25.0)	-	Down	0.480
<i>miR-21</i>	0	0	-	Over	0.988
<i>miR-221</i>	1 (12.5)	3 (37.5)	Down	Over	0.705

**p*<0.05: significance.

를 보인 경우가 8예(100%)로 나타났다. *miR-16*은 3예(37.5%)였으며, 그 중 2예(66.7%)가 down expression을 보였고, 전체 *miR-16* 중 5예(62.5%)에서 decrease를 보였다. *miR-15a*와 *miR-16*은(Croce 등, 2009; Roccaro 등, 2009)에서 다발성 골수종은 down expression 한다고 하였다. 관련이 있다고(Farazi 등, 2011; Munker 등, 2011)도 보고를 하였으며, 이러한 보고와 *miR-15a*는 일치하는 결과를 보였고, *miR-16*은 일치하지 않았다. *miR-15a*, *miR-16*은 염색체 13q14.3에 위치하며, 이들이 결실되면 세포사 억제(anti-apoptotic) 단백질인 세포성 암유전자 BCL2를 조절하는데 BCL2의 발현이 억제되어 여러 암의 원인이 되고 있으며, 특히 B세포성 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukaemia) 발생에 영향을 주는 것으로 보고 되고 있다(Munker 등, 2011). 다발성 골수종 환자에서도 *miR-15a*의 감소와 밀접한 관계가 있으리라 생각된다. *miR-221*은(Roccaro 등, 2009; Munker 등, 2011)에서 다발성 골수종은 over expression 된다고 하였는데, 유의성을 보인 경우가 4예(50.0%)로 나타났고, 3예(75.0%)가 down expression, 1예(12.5%)에서 over expression을 보였으며, 전체 중 6예(75.0%)가 decrease를 보여 상반된 결과를 얻었다. *miR-21*은 Loffler 등(2007)과 Iorio 등(2009)은 다발성 골수종에서 *miR-21*이 over expression 된다고 하였으며, 임파종, 대장암, 유방암, 간암, 췌장암, 폐암, 위암 등 각종 암과 관련성이 있다고 보고하고 있다. 하지만 본 결과에서는 유의성을 나타내지 않았다. 결과적으로 *miR-15a*와 *miR-221*은 유의성 있는 결과를 보였으며, down expression을 나타냈다. 특히 *miR-15a*는 서양인에 대한 기존의 연구와 높은 일치율을 보였으며, *miR-221*은 상반된 결과를 얻었다. *miR-16*, *miR-21*은 유의성을 보이지 않았다(Table 3-5). 통계학적 유의성검정(*p*-value)에서 *miR-15a*가 0.257, *miR-16*은 0.480, *miR-21*은 0.988 그리고 *miR-181a*는 0.705로 모두 유의성을 보이지 않았는데, 이는 빈도수가 적어 유의성을 확인하기에 어려움이 있었다(Table 5).

결과적으로, 다발성 골수종에서 fold change값을 기준으로 *miR-15a*는 일치된 결과를 보였지만, *miR-221*은 상반된 결과를 보였으며, *miR-16*, *miR-21*은 유의성을 보이지 않았다. 그 중에서 *miR-15a*의 경우 다발성 골수종 환자 진단에 유용한 결과를 얻었다.

요 약

우리나라의 경우 갑상선암, 간암, 폐암 관련 연구가 보고되었으나 다발성 골수종환자에 관한 microRNA 연구는 보고된 경우가 없어 알아보려고 하였다. 또한, 다발성 골수종 환자의 골수(bone marrow)에서 채취한 검체를 이용한 연구가 대부분 보고되고 있으

며, 파라핀 포매 조직을 이용한 경우는 거의 없어 파라핀 포매 조직에서도 가능한지 알아보았다. 연구 대상은 2010년 1월부터 2012년 7월까지 충남대학교병원 진단검사의학과에 다발성 골수종 진단을 위해 골수검사를 의뢰한 8 검체를 대상으로 하였다. microRNA는 보고된 내용 중 관련성이 높다고 한 *miR-15a*와 *miR-16*, *miR-21*, *miR-181a*, *miR-221*를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

각 검체별 fold change 값이 1.5 이상 또는 -1.5 이하로 유의성을 보인 경우는 *miR-15a*에서 3예(37.5%)로 나타났다. Microarray 검사법으로 보고한 기존 연구와 비교한 결과, *miR-15a*의 경우 일치하는 결과로 한국인의 다발성 골수종 환자에서 진단에 활용할 수 있음을 확인하였다. *miR-221*은 상반된 결과를 얻었다. 이와 같이 *miR-15a*의 경우, 서양인과 일치하는 결과를 얻었으며, *miR-221*은 서양인과 상반된 결과로 좀 더 연구가 필요하리라 생각된다. 파라핀 포매 조직에서도 microRNA를 검출 할 수 있음을 확인하였다. 하지만 검체수가 적어 좀 더 정확한 확인 검사와 많은 검체를 이용한 연구가 더욱 필요하다.

Acknowledgements: None

Funding: None

Conflict of interest: None

References

1. Bang SM, Kim YR, Cho HI, Chi HS, Seo EJ, Park CJ, et al. Identification of 13q deletion, trisomy 1q and IgH rearrangement as the most frequent chromosomal changes found in Korean patients with multiple myeloma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2006;168:124-132.
2. Chang HJ, Kim JW, Kim NK, Jeon YJ. The relationship between the progression of colorectal cancer and microRNA polymorphism. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;7:50-57.
3. Corthals SL, Jongen-Lavrencic M, Knecht Y, Peeters JK, Beverloo HB, Lokhorst HM, et al. Micro-RNA-15a and micro-RNA-16 expression and chromosome 13 deletions in multiple myeloma. *Leukemia Research*. 2010;34:677-681.
4. Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10:704-714.
5. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschli T. MicroRNAs in human cancer. *Journal of Pathology*. 2011;223:102-115.
6. Han KH and Kim TJ. Effects of promoter methylation on the expression levels of plakoglobin Gene in both the ARO thyroid cancer cell line and cancer tissues. *Korean J Clin Lab Sci*. 2009;41:180-188.
7. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *American Society of Clinical Oncology*. 2009;27:5848-5856.

8. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, *et al.* Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res.* 2009,37:1672-1681.
9. Kota J, Chivukula R, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, *et al.* Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell.* 2009,137(6):1005-1017.
10. Lee HJ, Park CS, Deftereos G, Morihara J, Stern JE, Hawes SE, *et al.* MicroRNA expression in ovarian carcinoma and its correlation with clinicopathological features. *World Journal of Surgical Oncology.* 2012,10:174-184.
11. Loffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermuller J, Kretzschmar AK, *et al.* Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *blood.* 2007,110:1330-1333.
12. Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, *et al.* Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Molecular Cancer.* 2006,5:24.
13. McCarthy DJ, Smyth GK. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. *Bioinformatics.* 2009,25(6):765-771.
14. Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer. *Clinical Science.* 2011,121:141-158.
15. Pichiorri FI, Suh SS, Ladetto M, Kuehl M, Palumbo T, Drandi D, *et al.* MicroRNAs regulate critical genes associated with multiple myeloma pathogenesis. *PNAS.* 2008,105(35):12885-12890.
16. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TLJ, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2007,67(13):6130-6135.
17. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab Feda, *et al.* MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood.* 2009,26(113):6669-6680.
18. Satoh JI. Molecular network analysis of human microRNA targetome: from cancers to Alzheimer's disease. *Satoh BioData Mining.* 2012,5(1):17. doi: 10.1186/1756-0381-5-17.
19. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman, Yanaihara N, *et al.* MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA.* 2008,299(4):425-436.
20. Son JW, Kim YJ, Cho HM, Lee YM, Kwon SJ, Choi E, *et al.* MicroRNA expression Korean non-small cell lung cancer. *The Korean Academy of Tuberculosis and Respiratory Diseases.* 2009,67:413-421.
21. Sung MH, Lee HT, Shin MS, Oh SY, Kim WY. Evaluation of p16INK4a/Ki-67 dual immunostaining in liquid-based cytology for diagnosis of uterine cervical dysplasia and cancer. *Korean J Clin Lab Sci.* 2015,47:132-139.
22. Takimoto M, Ogawa K, Kato Y, Saito T, Suzuki T, Irei M, *et al.* Close relation between 14q32/IGH translocations and chromosome 13 in abnormalities multiple myeloma: a high incidence of 11q13/CCND1 and 16q23/MAF. *International Journal of Hematology.* 2008,87(3):260-265.
23. Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, Lim KY, Setyowati KD, Wang CW, *et al.* Expression profile of microRNAs in young stroke patients. *PLoS One.* 2009,4(11):e7689.
24. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *European Journal of Haematology.* 2009,84:1-16.
25. Yaguang X, Go N, Elaine G, Chris GM, Kenji K, Kazuhiko H, *et al.* Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA.* 2007,13:1668-1674.