

MicroRNA 155 Expression Pattern and its Clinic-pathologic Implication in Human Lung Cancer

Mi Kyeong Kim^{1,4}, Dong Chul Moon², Hye Jin Hyun¹, Jong-Sik Kim³, Choi Tae Jin⁴ and Sang Bong Jung^{5*}

¹Department of Clinical Laboratory Science, Gimhae College, Gimhae 50811, Korea

²Department of Physical Therapy, Gimhae College, Gimhae 50811, Korea

³Department of Anatomy, Kosin University College of Medicine, Busan 49267, Korea

⁴Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

⁵Department of Clinical Laboratory Science, Dong-Eui Institute of Technology, Busan 47230, Korea

Received March 7, 2016 / Revised August 29, 2016 / Accepted September 22, 2016

Lung cancer is currently the most common malignant disease and the leading cause of mortality in the world and non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for 75-80% of lung cancer cases. miR-155 gene was found to be over expressed in several solid tumors, such as thyroid carcinoma, breast cancer, colon cancer, cervical cancer, pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and lung cancer. The aims of this study were to define the expression of miR-155 in lung cancer and its associated clinic-pathologic characteristics. Total RNA was purified from formalin-fixed, paraffin-embedded NSCLC tissues and benign lung tissues. Expression of miR-155 in human lung cancer tissues were evaluated as mean fold changes of miR-155 in cancer tissues compared to benign lung tissues by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real-time qRT-PCR) and associations of miR-155 expression with clinic-pathologic findings of cancer. Compared with the benign control group, miR-155 expression was significantly overexpressed in NSCLCs ($p < 0.001$). miR-155 was more overexpressed in squamous cell carcinoma than in adenocarcinoma. Poorly differentiated tumors showed significantly overexpression of miR-155 than well-differentiated tumors ($p < 0.001$). Overexpression of miR-155 was significantly associated with lymph node metastasis ($p < 0.05$). In survival analysis for all NSCLC patients, high miR-155 expression was significantly correlated with worse overall survival ($p < 0.05$). These results suggested that miR-155 might play an important role in lung cancer progression and metastasis.

Key words : Lung cancer, metastasis, MicroRNA, miR-155

서 론

폐암은 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 악성 종양 중 가장 높은 암사망율을 보이고 있으며, 여러 연구를 통해 치료 성적을 향상시키려는 노력이 진행되어 왔으나 생존율에 있어서는 유의한 향상을 가져오지는 못했다. 폐암은 병리학적으로 소세포암(small cell carcinoma)과 비소세포암(non-small cell carcinoma)으로 분류되며, 비소세포암은 편평상피암(squamous cell carcinoma), 선암(adenocarcinoma) 등으로 구분된다. 폐암의 발생은 암유전자(oncogene)의 활성화와 암 억제 유전자(tumor suppressor gene)의 불활성화에 따른 유전적 불

안정성의 증가 등이 관련된다고 알려져 있다[35]. 최근 연구에서 암 유전자(oncogene)나 암 억제 유전자(tumor suppressor gene)를 포함하여 많은 단백질을 지정하는 유전자를 조절하는 것으로 알려진 다양한 종류의 microRNA (miRNA)가 발견되어서 암 발생에 관여하는 유전자가 매우 복잡하고 다양한 것으로 밝혀지고 있다[5, 10, 11, 17, 21, 22, 29].

miRNA는 21~25개의 nucleotide로 이루어진 small non-coding, single-stranded RNA로서 각각의 miRNA는 수백 가지의 표적 유전자를 조절할 수 있다고 알려져 있으며, 표적 유전자는 다수의 miRNA에 의해 조절될 수 있다고 알려져 있다[14]. 또한 폐암을 포함한 다양한 암에서 miRNA의 발현 변화가 관찰되며, 일부의 암에서는 miRNA의 발현이 연관 있다고 알려져 있다[1, 3, 8, 16, 24, 25, 32]. miR-155는 림프종(lymphoma), 자궁경부암(cervical cancer), 유방암(breast cancer) 등에서 발현이 증가되고[5, 17, 31], miR-17-92 family는 림프종, 폐암 등에서 발현이 증가된다고 보고되었으며[10, 22], miR-221, miR-222 등은 갑상선 유두암 등에서 발현이 증가된다고 보고되었다[11, 21]. miR-15, miR-16은 만성 림프구성 백

*Corresponding author

Tel : +82-51-860-3520, Fax : +82-51-860-3450

E-mail : bong@dit.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/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

혈병(chronic lymphocytic leukemia) 등에서 발현이 억제되고 [2], let-7 family는 폐암, 난소암(ovarian cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 유방암 등에서 발현이 억제되며[13, 14, 19, 29], miR-143, miR-145는 직장암(rectal cancer), 대장암에서 발현이 억제된다고 알려져 있다[7, 23, 36].

따라서 종양에 따라 특이적으로 변화된 miRNA의 발현 양상을 파악하는 것은 암을 조기에 진단하는데 도움이 될 수 있으며, miRNA를 대상으로 한 항암치료는 새로운 표적치료의 가능성을 제시하고 있다. 폐암과 miRNA의 발현 양상에 대한 국내연구는 세포주를 대상으로 한 연구가 대부분이고 조직을 대상으로 한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 한국인 폐암 환자의 조직에서 특이적으로 발현되는 miRNA의 양상을 양성 폐질환자와 비교 분석하고, 폐암환자의 임상병리학적 특성과의 상관성을 분석하여 miRNA가 암 진단의 생물표지자로서의 가능성을 조사하여 향후 암의 조기 진단 및 치료, 예후 연구에 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

연구대상

본 연구는 성균관대학교 창원 삼성병원에 내원하여 생검이나 근치수술을 시행하여 조직병리학적으로 폐암으로 진단을 받은 47명의 환자를 대상으로 하였다. 본 연구는 성균관대학교 창원 삼성병원의 IRB 심의(심의번호 2012-scmc-044-00)를 거쳐 승인을 획득하였다. 그리고 성별, 연령, 종양의 위치와 크기, 전이 유무, 흡연 유무, 병기, 재발 유무 등 각 환자들의 임상병리학적 특성을 조사하였다. 폐암환자군은 편평상피암(squamous cell carcinoma)이 27명, 선암(adenocarcinoma)이 20명이었으며, 분화도에 따라서는 저등도, 중등도, 고등도가 각각 10명, 17명, 20명이었다. 대조군으로는 양성 폐 질환인 탄분섬유증(Anthracofibrosis) 환자 10명의 파라핀 포매 조직을 재료로 사용하였다. 폐암 유형을 확인하기 위하여 hematoxylin and eosin 염색을 한 후 현미경으로 관찰하여 WHO(World Health Organization)분류에 따라 폐암 유형을 결정하였다. 실험에 사용된 폐암환자군과 양성폐질환자군의 임상적 특징은 Table 1, 2에 표시하였다.

Total RNA 분리

파라핀 조직으로부터 total RNA를 분리하기 위하여 RNA paraffin kit (Applied Roche Science, Indianapolis, IN, USA)를 사용하였다. RNA의 추출은 제조사의 매뉴얼에 따라서 다음과 같이 수행하였다. 파라핀 조직을 RNase-free tube에 넣고 melting buffer 300 µl를 tube에 넣은 다음 원심 시켜 72°C 10분간 반응을 시킨 후 Proteinase K를 20 µl첨가하였다. 60°C에서 추출물에 binding buffer 400 µl와 100% ethanol 800 µl를 넣고 mix후 collection tube에 cartridge를 넣고 binding buffer와

Table 1. Clinicopathological characteristics of lung cancer patients

Variables	Case No.
Total cases	47
Gender	
Male	34
Female	13
Age	
<65	25
≥65	22
Histological type	
^a SCC	27
^b AC	20
Tumor size (cm)	
<5	20
≥5	27
^c LN metastasis	
No	26
Yes	21
Differentiation	
Well	20
Moderate	17
Poor	10
Smoking	
No	14
Yes	33
Stage	
I / II	23
III / IV	24
Recurrence	
No	36
Yes	11
Survival status	
Dead	24
Alive	23

^aSCC Squamous cell carcinoma

^bAC Adenocarcinoma

^cLN Lymph node

Table 2. Clinicopathological characteristics of Control group

Total cases	10
Gender (mean age±SD)	
Male	7 (50.90±12.27)
Female	3 (50.42±12.28)
Diagnosis	
Anthracofibrosis	10

ethanol을 첨가된 추출물 700 µl를 옮겨 넣은 후 원심을 2회 반복 실시하였다. 마지막 용액을 버리고 Wash buffer와 100% ethanol 500 µl를 cartridge에 넣고 원심 시킨 후 용액을 제거하는데 과정을 2회 더 반복하고 마지막 용액을 제거 하였다. cartridge에 65°C RNase-free DW 50 µl를 첨가한 후 1분간 반응

후 원심 시키고 cartridge를 제거한 다음 tube에 남아 있는 total RNA를 사용하였다.

Quantitative real time PCR (qPCR)

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 RNA 100 ng에 stem loop RT-primer (5X) 3 μ l와 RT Master mix 7 μ l, RNase inhibitor (20U/ μ l) 0.2 μ l, RNase-free water 2.8 μ l를 혼합한 용액 15 μ l를 Gene Amp PCR system 9600을 사용하여 16°C에서 30분, 42°C에서 30분, 85°C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 5배 희석하여 Quantitative real time PCR에 사용하였다. 합성된 cDNA 2 μ l에 TaqMan 2X universal PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 10 μ l, Primer and Probe mix (20X) 1 μ l, RNase free water 7 μ l를 혼합한 용액 20 μ l를 ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 Quantitative real time PCR을 수행하였고 2중 분석으로 miRNA의 발현 정도를 측정하였다. 표적 miRNA의 표준화 대조군으로 U6 small RNA (RNU6B)를 정량 하였고 동일 시료로 Quantitative real time PCR를 3회 반복 시행하여 평균값을 구하여 발현량을 정량화 하였다. U6B발현을 기준으로 하여 생성된 각각의 역치 주기 값(threshold cycle value, CT value)들을 표준화 하였으며 이후 표준화된 이 값을 상대치로 환산하였다.

Data Normalization

Control에 비해 sample의 유전자 발현량이 얼마나 증가하고 있는지를 분석하기 위해 Δ Ct값을 산출하였다. Δ Ct값은 sample의 Ct값에서 internal control사용된 RNU6B의 Ct값을 빼서 Δ Ct를 측정하여 Normalization하였으며, Δ Ct값이 음의 값이면 증폭되는 cycle수가 빠르기 때문에 유전자 발현량의 증가를 의미하고 Δ Ct값이 양의 값이면 증폭되는 cycle수가 느리기 때문에 유전자 발현량의 감소를 의미한다.

유전자 발현에 대한 상대적인 정량은 폐암 환자의 Δ Ct값에서 양성 폐 질환자의 Δ Ct값을 빼서 구한 $\Delta\Delta$ Ct방법을 이용하여 측정하였고, 양성 폐 질환자의 $\Delta\Delta$ Ct값을 '1'로 기준하여 폐암 환자의 ratio값을 산출하였다(Ratio = $2^{-\Delta\Delta$ Ct}). Ratio값이 '1'보다 낮으면 증폭산물이 일정량으로 증폭되는 cycle수가 느리므로 발현율이 낮은 'down'를 의미하고 '1'보다 높으면 증폭산물이 일정량으로 증폭되는 cycle수가 빠르므로 발현율이 높은 'over'를 의미한다.

통계분석

MicroRNA발현 변화는 평균 \pm 표준편차로 나타내었고 각 임상병리학적 특성에 따른 miRNA의 발현을 보기 위해 두 그룹간의 비교는 independent t-test를 이용하였고 세 그룹간의 비교는 one-way ANOVA를 이용하여 분석하였다. 통계학적 분석은 PASW version 19.0을 이용하였고 유의수준은 $p < 0.05$ 로 하였다.

생존분석

MicoRNA-155의 발현에 따른 생존분석은 사망이 발생한 시점마다 구간생존율을 구하여 이들의 누적으로서 누적생존율을 구하는 Kaplan-Meier모형을 사용하였으며, 기준값은 양성 폐질환자의 평균값으로 하였다. 기준값 보다 낮은 Δ Ct값은 높은 발현으로 분류하였고, 높은 Δ Ct값은 낮은 발현으로 분류하였다.

결 과

Hematoxylin-eosin 염색을 이용한 폐암의 분류

조직학적으로 WHO분류 기준에 따라 각질(keratin)을 형성하고, 중층편평상피와 유사할 경우 편평세포암으로 분류하였으며, 선조직(gland)을 형성하여 섬유기질을 침범하는 특징을 보일 경우 선암종으로 분류하였다(Fig. 1).

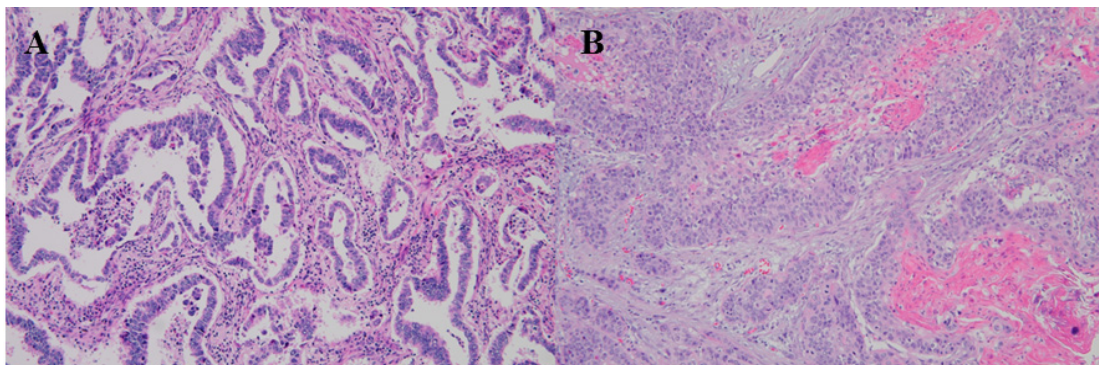


Fig. 1. Comparison of Adenocarcinoma (A) and squamous cell carcinoma (B) by H&E staining. Adenocarcinoma consists of malignant glands invading a fibrous stroma. Squamous cell carcinoma resembles stratified squamous epithelium of the upper airway and shows obvious keratinization.

Table 3. Relationship between the expression of miR-155 in lung cancer and benign lung disease

Sample	miR-155		^a ΔCt	^b ΔΔCt	^c Ratio
	RNU6B	miR-155 Ct			
Benign	27.34	29.05	1.71	0.00	1.00
Lung cancer	30.47	30.51	0.04	-1.67	3.18
<i>p</i> value			<0.001		

^aΔCt = MicroRNA Ct - RNU6B Ct

^bΔΔCt = lung cancer ΔCt - benign ΔCt

^cRatio = 2^{-ΔΔCt}

Quantitative real-time PCR을 이용한 miR-155의 발현 양상

양성 폐 질환자와 폐암 환자군에서 miR-155의 발현양상을 비교하기 위하여 RNU6B, miR-155의 probe를 이용하여 정량 실시간증폭반응을 수행한 결과 양성 폐질환자에 비해 비소세포폐암환자에서 miR-155발현율이 높음을 확인하였다. Table 3에서 보듯이 폐암 환자군과 양성 폐질환자의 miR-155의 ΔCt값을 분석한 결과 양성폐질환자의 miR-155의 값은 1.71, 폐암환자의 miR-155의 값은 0.04로 유의성 있는 결과가 나왔다(*p*<0.001).

폐암 환자의 임상병리학적 특성과 miRNA와의 연관성

폐암 환자군의 임상병리학적 특성과 miRNA의 발현율과의 상관관계를 분석한 결과 성별에 따라서 miR-155는 여성에서 남성에 비해 유의하게 높게 발현되었다(*p*=0.024). 병리조직학적 분류에 따라서는 편평상피세포암종에서 선암종에 비해 높게 발현되어 종양의 병리조직학적 유형에 따른 차이를 나타내었으나 통계적 유의성은 없었다. 종양 크기에 따른 발현은 ≥5에서 <5에 비해 높게 발현되었지만 통계적 유의성은 없었다. 림프절 전이에 따른 발현은 전이된 조직이 전이되지 않은 조직이 보다 발현이 높은 경향을 보였고 통계적 유의성이 있었다(*p*=0.014). 분화도에 따라서는 분화도가 좋을수록 낮게 발현되었고 분화도가 나쁠수록 높게 발현되었으나 통계적 유의성이 있었다(*p*<0.001).

흡연 유무에 따라서는 흡연한 환자에서 높은 발현을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 병기가 진행됨에 따라 높은 발현을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 재발 유무에 따라서 miR-155는 재발한 환자에서 높은 발현을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Table 4).

miR-155 발현에 따른 생존률

생존률 분석에서 종양값 보다 낮은 ΔCt값은 높은 발현으로 분류하였고 높은 ΔCt값은 낮은 발현으로 분류하였다. Fig. 2에서 보듯이 Kaplan-Meier모형의 생존분석결과 폐암환자의 5년 생존률은 miR-155의 과 발현이 관찰된 환자에서는 15.8%였으며, 과 발현이 관찰되지 않은 환자에서는 77.8%로 miR-155의 과 발현이 관찰된 환자와 비교하여 유의하게 낮은 생존

Table 4. Relationship between the expression of microRNA and clinic-pathologic characteristics in lung cancer

Clinic-pathologic characteristics	No. of patients (n = 47)	^a Normalized Ct value of miRNA (mean ± standard deviation)
		miR-155
Gender		
Male	34	-0.162±1.36
Female	13	0.563±0.73
<i>p</i> value		0.024
Age(y)		
< 65	25	0.002±1.41
≥ 65	22	0.079±1.07
<i>p</i> value		0.837
Histological type		
SCC	27	-0.079±1.21
AC	20	0.196±1.32
<i>p</i> value		0.464
Tumor size (cm)		
< 5	20	0.012±1.41
≥ 5	27	0.058±1.15
<i>p</i> value		0.903
Lymph node metastasis		
No	26	0.434±1.02
Yes	21	-0.452±1.36
<i>p</i> value		0.014
Grade		
Well differentiated	20	0.507±0.99
Moderate differentiated	17	0.309±0.79
Poorly differentiated	10	-1.360±1.43
<i>p</i> value		< 0.001
Smoking		
No	14	0.127±1.16
Yes	33	0.001±1.31
<i>p</i> value		0.755
Stage		
I/II	23	0.308±1.00
III/IV	24	-0.220±1.43
<i>p</i> value		0.150
Recurrence		
No	36	0.157±1.24
Yes	11	-0.351±1.29
<i>p</i> value		0.243
Survival status		
Dead	24	-0.474±1.24
Alive	23	0.573±1.04
<i>p</i> value		0.003

^aNormalized Ct = ΔCt

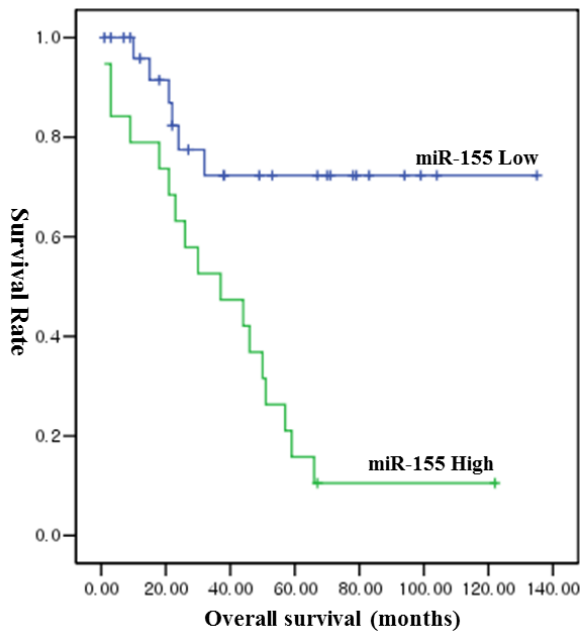


Fig. 2. Survival analysis using the Kaplan-Meier method: overall survival (OS) according to the expression levels of miR-155 in patients with lung cancer. high miR-155 expression was significantly correlated with worse OS ($p < 0.05$).

를 보였다($p < 0.001$).

고 찰

폐암은 매년 사망률이 증가하고 있으나 조기 진단이 어렵고 림프절이나 혈액을 통해 전신으로 전이할 수 있으며, 5년 생존율을 또한 낮다[26, 28]. 최근 연구에서는 암 발생에 있어 miRNA의 발현 변화가 관찰되며, miRNA의 발현이 암과 연관이 있다고 알려져 있다[6, 9, 20, 29]. 폐암의 생성과정에서도 miRNA는 표적으로 하는 mRNA 유전자에 따라 종양유전자 또는 종양억제유전자로 작용할 수 있으므로 종양에 따라 특이적으로 변화된 miRNA의 발현 양상을 파악하는 것은 암을 조기에 진단하는데 도움이 될 수 있다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 폐암 환자 조직 47예와 양성 폐질환자 조직 10예를 대상으로 특징적으로 발현하는 miR-155를 선정하여 폐암 환자와 양성 폐질환자에서의 miRNA 발현을 비교 분석하였으며, 폐암 환자의 임상병리학적 특성에 따른 miRNA 발현의 상관성을 비교 분석하였다.

Quantitative real-time PCR을 통해 정량 분석한 결과 miR-155가 양성 폐 질환자에 비해 발현율이 증가한 것을 확인하였다. miR-155는 염색체 21q21.3에 위치하고 갑상선암, 대장암, 췌장암등에서 발현이 증가된다고 보고되었다[6, 9, 20, 29, 30]. 본 연구에서도 miR-155는 폐암에서 양성 폐질환자에 비해 발현이 증가되어 이전 연구와 동일한 결과를 나타내었다.

폐암 환자군의 임상병리학적 특성과 miRNA의 발현율과의 상관관계를 분석한 결과 성별에서 miR-155는 남성에서 여성에 비해 높게 발현되어 miRNA의 발현은 성별에 따라 차이가 있을 것으로 사료된다. 연령에서는 <65에서 ≥ 65 에 비해 높게 발현이 되었는데 연령에 대한 miRNA에 대한 연구는 미흡하지만 본 연구에서는 연령층이 낮을수록 높게 발현되는 경향을 보였다. 병리조직학적 분류에 따라서 miR-155는 편평상피세포암종에서 높게 발현되어 종양간의 발현차이를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 암종의 병리조직학적 유형에 따라 miRNA의 작용기전이 다를 것으로 생각되어지며 이와 관련된 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 림프절 전이에 따른 발현은 Kono, Zhang 등의 연구에 따르면 miR-155의 과 발현이 다양한 암에서 전이를 촉진시킨다고 보고하였다[4, 18, 35]. 본 연구에서 miR-155는 전이된 조직이 전이되지 않은 조직보다 높게 발현되어 이전 연구와 비슷한 결과를 나타내었다. 종양의 분화도에 따라서는 분화도가 낮을수록 높은 발현을 보였고 이에 대한 연구는 아직 미흡하기 때문에 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 될 것이다.

miR-155는 종양에 따라 침투와 증식을 촉진시킨다고 보고되었다[31, 33]. 종양의 증식과 관련된 miRNA들의 목표 유전자와 그 작용기전에 대한 연구가 이루어진다면 종양의 치료에 도움이 될 것으로 사료되며 앞으로 여기에 대한 연구가 더 이루어져 될 것이다.

담배 흡연은 체내에 benzo[a]pyrene이나 nicotine-derived nitroso-amineketon 등의 발암물질을 생성하여 폐암을 일으킨다고 보고되었다[12]. 본 연구에서도 폐암환자와 miR-155의 발현빈도에 대한 통계적 유의성은 없었으나 발현 정도는 높게 나타나 흡연이 miR-155의 발현과도 관련이 있을 것으로 사료된다.

폐암의 발생병기에 따라서는 병기가 진행됨에 따라 miR-155의 발현이 증가되어 miR-155는 폐암의 진행과 관련이 있을 것으로 사료되며, 그 작용기전에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다. 생존 상태에 따라서는 사망한 환자에서 생존중인 환자에 비해 과 발현 양상을 보였다. 이러한 결과는 miR-155가 과 발현이 환자의 병기 및 분화도와 상관성을 가지기 때문으로 사료된다.

현재까지 우리나라에서 폐암 환자의 임상병리학적 특성과 miRNA와의 연관성에 대한 분석한 연구는 미비한 실정이다. 우리나라에서 폐암과 양성 폐질환자의 miRNA에 대한 연구는 2009년 Son 등의 연구 이후 처음이라 할 수 있다[27]. 하지만 Son 등의 연구에서는 폐암환자의 임상병리학적 특성과 miRNA에 대한 연구는 없었고 본 연구에서는 이러한 폐암 조직에서 특이적으로 발현되는 miRNA를 조사하고 그 중 폐암 진단에 가능성을 줄 수 있는 표적 miRNA를 선별하였다.

References

1. Bloomston, M., Frankel, W. L., Petrocca, F., Volinia, S.,

- Alder, H., Hagen, J. P., Liu, C. G., Bhatt, D., Taccioli, C. and Croce, C. M. 2007. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. **297**, 1901-1908.
2. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C. M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 15524-15529.
 3. Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C. M. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2999-3004.
 4. Donnem, T., Lonvik, K., Eklo, K., Berg, T., Sorbye, S. W., Al-Shibli, K., Al-Saad, S., Andersen, S., Stenvold, H., Bremnes, R. M. and Busund, L. T. 2011. Independent and tissue-specific prognostic impact of miR-126 in nonsmall cell lung cancer: coexpression with vascular endothelial growth factor-A predicts poor survival. *Cancer* **117**, 3193-3200.
 5. Eis, P. S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M. F., Lund, E. and Dahlberg, J. E. 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 3627-3632.
 6. Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J. and Bonmassar, E. 2009. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim. Biophys. Acta*. **1792**, 497-505.
 7. Fuse, M., Nohata, N., Kojima, S., Sakamoto, S., Chiyomaru, T., Kawakami, K., Enokida, H., Nakagawa, M., Naya, Y., Ichikawa, T. and Seki, M. 2011. Restoration of miR-145 expression suppresses cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer by targeting FSCN1. *Int. J. Oncol.* **38**, 1093-1101.
 8. Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G. A. and Croce, C. M. 2006. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends. Mol. Med.* **12**, 580-587.
 9. Gironella, M., Seux, M., Xie, M. J., Cano, C., Tomasini, R., Gommeaux, I., Garcia, S., Nowak, J., Yeung, M. L., Jeang, K. T., Chaix, A., Fazli, L., Motoo, Y., Wang, Q., Rocchi, P., Russo, A., Gleave, M., Dagorn, J. C., Iovanna, J. L., Carrier, A., Pebuseque, M. J. and Dusetti, N. J. 2007. Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 16170-16175.
 10. Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y. and Takahashi, T. 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* **65**, 9628-9632.
 11. He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R. T., Croce, C. M. and Chapelle, P. 2005. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 19075-19080.
 12. Hecht, S. S. 2002. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* **8**, 461-469.
 13. Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. and Slack, F. J. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**, 635-647.
 14. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. 2004. Reduced expression of the let-7 microRNA in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* **64**, 3753-3756.
 15. Kim, Y. K., Yu, J. and Han, T. S. 2009. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids. Res.* **37**, 1672-1681.
 16. Markou, A., Tsaroucha, E. G., Kaklamanis, L., Fotinou, M., Georgoulas, V. and Lianidou, E. S. 2008. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin. Chem.* **54**, 1696-1704.
 17. Metzler, M., Wilda, M., Busch, K., Viehmann, S. and Borkhardt, A. 2004. High expression of precursor microRNA-155/BIN RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes. Chromosome. Cancer* **39**, 167-169.
 18. Kono, H., Nakamura, M., Ohtsuka, T., Nagayishi, Y., Mori, Y., Takahata, S., Aishima, S. and Tanaka, M. 2013. High expression of microRNA-155 is associated with the aggressive malignant behavior of gallbladder carcinoma. *Oncol. Rep.* **30**, 17-24.
 19. Nam, E. J., Yoon, H., Kim, S. W., Kim, H., Kim, Y. T., Kim, J. H., Kim, J. W. and Kim, S. 2008. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **14**, 2690-2695.
 20. Nikiforova, M. N., Tseng, G. C., Steward, D., Diorio, D. and Nikiforov, Y. E. 2008. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 1600-1608.
 21. Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M. T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C. G., Santoro, M., Negrini, M., Croce, C. M. and Fusco, A. 2006. MicroRNA deregulation in human papillary thyroid carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 497-508.
 22. Rinaldi, A., Poretti, G., Kwee, I., Zucca, E., Catapano, C. V., Tibiletti, M. G. and Bertoni, F. 2007. Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **48**, 410-412.
 23. Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M., Nenutil, R. and Vyzula, R. 2007. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* **72**, 397-402.
 24. Schetter, A. J., Leung, S. Y., Sohn, J. J., Zanetti, K. A.,

- Bowman, E. D., Yanaihara, N., Yuen, S. T., Chan, T. L., Kwong, D. L., Au, G. K., Liu, C. G., Calin, G. A. Croce, C. M. and Harris, C. C. 2008. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. **299**, 425-436.
25. Sevignani, C., Calin, G. A., Siracusa, L. D. and Croce, C. M. 2006. Mammalian microRNA: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm. Genome*. **17**, 189-202.
26. Shayan, R. Achen, M. G. and Stacker, S. A. 2006. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis* **9**, 1729-1738.
27. Son, J. W., Kim, Y. J., Cho, H. M., Lee, S. Y., Jang, J. S., Choi, J. E., Lee, J. U., Kang, M. G., Lee, Y. M., Kwon, S. J., Choi, E., Na, M. J. and Park, J. Y. 2009. MicroRNA expression profiles in Korean non-small cell lung cancer. *Tuberc. Respir. Dis.* **67**, 413-421
28. Stinchcombe, T. E., Lee, C. B. and Socinski, M. A. 2006. Current approaches to advanced-stage non-small-cell lung cancer: first-line therapy in patients with a good functional status. *Clin. Lung Cancer* **4**, 111-117.
29. Torrisani, J., Bournet, B., Rieu, M. C., Bouisson, M., Souque, A., Escourrou, I., Buscail, L. and Cordelier, P. 2009. Let-7 microRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits *in vitro* cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum. Gene Ther.* **20**, 831-844.
30. Tam, W. 2001. Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene* **274**, 157-167.
31. Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C. and Croce, C. M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 2257-2261.
32. Yan, L. X., Huang, X. F., Shao, Q., Huang, M. Y., Deng, L., Wu, Q. L., Zeng, Y. X. and Shao, J. Y. 2008. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA*. **14**, 2348-2360
33. Yu, J., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Sato, N., Kayashima, T., Fujita, H., Nakata, K. and Tanaka, M. 2010. MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation. *Mol. Cancer* **9**, 169.
34. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P. and Anderson, T. A. 2007. MicroRNA as oncogenes and tumor suppressor. *Dev. Biol.* **302**, 1-12.
35. Zhang, G. J., Xiao, H. X., Tian, H. P., Liu, Z. L., Xia, S. S. and Zhou, T. 2013. Upregulation of microRNA-155 promotes the migration and invasion of colorectal cancer cells through the regulation of claudin-1 expression. *Int. J. Mol. Med.* **31**, 1375-1380.
36. Zhu, H., Dougherty, U., Robinson, V., Mustafi, R., Pekow, J., Kupfer, S., Li, Y. C., Hart, J., Goss, K., Fichera, A., Joseph, L. and Bissonnette, M. 2011. EGFR signals downregulate tumor suppressors miR-143 and miR-145 in Western diet-promoted murine colon cancer: role of G1 regulators. *Mol. Cancer Res.* **9**, 960-975.

초록 : 폐암에서 microRNA 155의 발현 양상과 임상병리학적 의의

김미경^{1,4} · 문동철² · 현혜진¹ · 김종식³ · 최태진⁴ · 정상봉^{5*}

(¹김해대학교 임상병리학과, ²김해대학교 물리치료과, ³고신대학교 의과대학 해부학교실, ⁴부경대학교 미생물학과, ⁵동의과학대학교 임상병리과)

폐암은 전세계적으로 높은 발병율과 사망률을 보이는 암종으로 소세포암종과 비소세포암종으로 구분되어지며, 비소세포암이 75-80%를 차지하고 있다. miR-155의 유전자의 과 발현은 갑상선암, 유방암, 대장암, 자궁 경부암, 췌장선암(PDAC), 폐암 등의 고형암에서 관찰된다. 본 연구에서는 한국인 폐암 환자의 조직에서 특이적으로 발현 되는 miRNA의 양상을 양성 폐질환자 와 비교 분석하고, 폐암환자의 임상병리학적 특성과의 상관성을 분석하여 miRNA가 암 진단의 생물표지자로서의 가능성을 조사하여 향후 암의 조기 진단 및 치료, 예후 연구에 기초 자료를 제공하고자 하였다. 과라핀 포매 된 비소세포폐암환자 및 양성 폐 질환자의 블록에서 total RN들의 분리하여, 정량 실시간연쇄증합반응을 통해 miR-155의 발현량을 정량 분석을 실시하였으며, miR-155의 발현과 폐암환자의 임상적 특징과의 상관관계를 분석하였다. 폐암 환자군과 양성 폐질환자의 miR-155의 Δ Ct 값을 분석한 결과 폐암 환자군에서 유의하게 높게 발현되었다($p < 0.001$). 병리조직학적 분류에 따라서는 편평상피세포암종에서 선암종에 비해 높게 발현되었다. 분화도에 따라서는 저분화 암에서 고분화암에 비해 유의하게 높게 발현되었다($p < 0.001$). 또한 miR-155의 과발현은 림프절 전이와도 통계적으로 유의성 나타내었다($p < 0.05$). 생존분석결과 miR-155의 과발현은 폐암환자의 생존률과 유의한 상관관계를 나타내었다($p < 0.05$). 본 연구의 결과로 miR-155의 발현은 폐암의 진행 및 전이에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 폐암의 조기진단과 예후의 예측을 위하여 보다 다양한 종류의 miRNAs에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.