The Relationship between the progression of colorectal cancer and microRNA polymorphisms

대장암의 진행과 microRNA 유전자 다양성과의 관계

Department of Surgery, ¹Institute for Clinical Research,, School of Medicine, CHA University, Seongnam, South Korea
Ho Jin Chang, Nam Keun Kim¹, Young Joo Jeon¹, Jong Woo Kim

차 의과학 대학교, 외과학 교실 장호진, 김종우, 임상연구소 김남근, 전영주

초 록

연구목적 : 최근 miRNA는 기본적인 생물학적 과정 뿐만 아니라 암을 포함한 다양한 질환의 조절기능에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 비록 적은 수의 nucleotides(18~23)로 이루어진 non-coding RNA이지만 miRNA의 유전자 내에서의 nucleotide 변이(variation)은 miRNA의 성숙과정에 영향을 주어 궁극적으로는 miRNA 발현을 변화시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 지금까지 암과 연관이 있는 것으로 알려져 있는 4가지 miRNA의 유전자 다양성을 분석하여 대장암의 진행 정도, 즉 암 병기, 암의 침윤도, 림프절 전이 등의 임상양상과 어느 정도 연관이 있는지를 분석해 보았다.

대상과 방법 : 최근 만 2년 동안 병원에서 수술 받은 대장암 환자 160을 대상으로 혈액채취 후 DNA를 추출하여 miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C와 miR-499A>G의 유전자 다양성 분포를 PCR-RFLP로 분석하였다. 이 결과를 암의 진행 정도와 관련 있는 병기, 조직학적 암의 분화도, 암의 장벽 침윤도, 국소 림프절 전이 등에 따라 비교 분석하였다.

결과 : 먼저 환자들을 남(98예, 61.3%), 여(62예, 38.7%)와 결장(89예, 55.6%), 직장(71예, 44.4%)의 암 위치에 따라 4가지 miRNAs의 유전자 다양성에서 차이가 있는지를 분석해본 결과 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 암의 진행과 연관이 있는 암의 병기(I~IV 기), 장벽 침윤도(T1~T4), 림프절 전이 정도(N0~N2) 각각에 따라 4가지 miRNAs 유전자 다양성의 차이를

보았으나 의미가 없었다. 암의 분화도(well-, moderately-, poorly-differentiated, mucinous)에 따라 분석을 해보았지만 역시 의미는 없었다.

결론 : 본 실험에서 선택한 4가지 miRNA는 의미있는 결과를 보이지 않았지만 앞으로 보다 다양한 miRNA가 많이 연구되어 대장암과의 관계를 밝히도록 해야 할 것이다.

중심단어 : 마이크로 RNA, 유전자 다양성, 대장암

서 론

세포 핵 내에 DNA라는 유전자 물질이 발견되고, 그 구조가 밝혀지고 또 이들 유전자로부터 발현(gene expression)의 일반적인 과정은 이미 밝혀져 있다. 즉, 우리는 유전정보를 함축하고 있는 DNA로부터 mRNA, tRNA를 거쳐 아미노산의 이동에 의한 단백질 합성이라는 고식적 단계만 있고 유전자 발현의 조절도 DNA에만 의존할 것으로 생각해 왔었다. 그러나 분자생물학의 발전에 의해 유전자 발현의 조절은 DNA 염기서열 자체 변화 뿐만 아니라 DNA methylation, histone acetylation 등의 그 주변의 변화 즉 후생학적 변화(epigenetic change)가 관여하여 하는 것이 밝혀졌다. 따라서 유전학적인 현상은 그리 단순하지는 않고 우리의 생각 이상으로 복잡한 과정이라는 것이 기초과학이 발전함에 따라 밝혀지고 있다. 최근에는 항상 DNA에 종속적이라고 생각되었던 RNA들 중에 하찮은 부스러기(fragments)로 여겨졌던 아주 작은 RNA가 유전자 조절 및 역으로 DNA 유전자 발현에도 관여 한다는 것이 밝혀졌고 이들의 일부를 microRNA라고 명명하게 되었다. 이들 microRNA는 세포의 분화, 증식, 세포사멸(apoptosis),

책임저자 : 김종우

463-712, 경기도 성남시 분당구 아람동 351 차의과학 대학교, 외과학 교실, 분당 차병원
Tel: 031-780-5250 Fax: 031-780-5259 E-mail: kjw@cha.ac.kr
접수일 : 2011년 9월 23일 ; 게재승인일 : 2011년 10월 20일

면역계, 대사, 발암 등 다양한 생명현상에 직, 간접적으로 관여한다는 것이 알려져 있고 지금도 계속 활발히 연구 중이다.¹⁻⁵⁾

MicroRNAs (miRNAs)는 작은 non-coding RNAs로 적은 수 (18~23)의 nucleotides를 지니고 유전자 발현을 조절하여 진핵 세포 (eukaryotic cell) 내에서의 다양한 생화학 과정에 관여한다. miRNA 형성의 기본 과정은, 세포 핵 내에서 miRNA 유전자는 RNA polymerase II에 의하여 전사되어 primary miRNA (pri-miRNA)로 되고, 이는 또 DGCR8-DROSHA complex에 의해서 premature miRNA (pre-miRNA)가 되며, Exportin-5 단백질에 의해 세포질로 나와서 RNaseIII DICER에 의해 성숙한 miRNA가 된다. 이때 post-transcriptional regulator로서 miRNA는 target mRNA의 complementary sequences에 결합해서 mRNA 소멸(degradation), 번역(translation) 또는 억제(repression)를 일으키게 된다.⁶⁻⁸⁾

대장암은 국내에서 최근 급격히 증가하는 암으로 식생활 습관의 변화로 육류 및 과도한 칼로리의 섭취가 원인으로 생각된다. 활발한 내시경 시술 등에도 불구하고 발병율 자체가 늘고 있어 보다 나은 예방 및 진단과 치료가 요구 된다. 따라서 이를 위해 대장암 발암에 대한 기초적인 연구도 필수적이라고 할 수 있겠다. miRNA의 유전자 변이(mutations)에 따른 발현의 증가 및 감소가 발암과 연관이 있다는 여러 연구들이 보고되고 있는데, Calin 등⁹⁾은 miRNA 결손(deletions)이 만성 림프구성 백혈병과 관련이 있다고 처음 보고한 후, 폐암¹⁰⁾, B-cell 림프종¹¹⁾, 유방암¹²⁾ 등에서도 miRNA와의 관련성들이 보고되었다. 대장암과의 관련성은 Michael 등¹³⁾이 처음 보고한 후 Schimanski 등¹⁴⁾은 miR-196a이 암세포의 진행과 관련이 있음을 보고하였다.

최근에는 microRNA의 DNA 유전자 다양성(polymorphism)에 의해 즉, miRNA의 single nucleotide polymorphisms (SNPs)에 의해서도 최종 miRNA의 성질을 변화시켜 만성 질환이나 암의 발생, 진행 및 예후와도 관련이 있다고 보고되고 있다. 예를 들면 중국인들에서 Hu 등¹⁵⁾은 miR-196a2에서 CC 유전형(genotype)은 폐암에 많고, CT 유전형은 의미 있게 간암¹⁶⁾ 및 위암¹⁷⁾과 관련이 있다고 보고하였다. miR-146aC>G, miR-149C>T와 miR-499A>G의 유전자 다양성은 유방암¹⁸⁾, 및 식도암¹⁹⁾과 관련이 있는 것으로 보고 되고 있다. 그러나 아직 대장암에서의 microRNA 유전자 변이 및 다양성들의 역할은 많이 보고되고 있지 않다. 따라서 본 연구의 목적은 지금까지 암과 연관이 있는 것으로 알려져 있는 4가지 miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C, 및 miR-499A>G의 유전자 다양성을

분석하여, 대장암의 병기, 암의 침윤도, 림프절 전이 등의 대장암 임상적 진행 정도와 연관이 있는지를 분석하였다.

대상 및 방법

최근 만 2년 동안 병원에서 수술 받은 대장암 환자 160을 대상으로 하였다. 이들의 임상적 특징을 성별, 대장암의 위치와 병기(The American Joint Committee on Cancer)에 따라 구분하였고, 조직학적 소견에 따라 분화도, 장벽 침윤도, 국소 림프절 전이 등으로 구분하였다. 환자에서 혈액을 채취하여 DNA를 추출하여 miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C와 miR-499A>G의 유전자 다양성을 PCR-RFLP로 분석하여 상기한 임상적 소견들과 비교 분석하였다. 본 연구는 병원 내의 의료윤리 위원회로부터 연구 승인을 받았다.

1. 유전자 분석

DNA는 혈액내의 백혈구로부터 G-dexTM II Genomic DNA Extraction Kit (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Seongnam, South Korea)를 이용하여 추출하였다. miR-146aC>G, miR-149C>T, miR-196a2C>T와 miR-499A>G의 유전자 다양성(polymorphisms)은 polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assays 방법에 의해 분석하였다. 증폭을 위한 Primer의 유전자 서열은 다음과 같다 : miR-146aC>G : forward 5'-CAT GGG TTG TGT CAG TGT CAG AGC T-3', backwards 5'-TGC CTT CTG TCT CCA GTC TTC CAA-3', miR-149C>T : forward 5'-TGT CTT CAC TCC CGT GCT TGT CC-3', backwards 5'-TGA GGC CCG AAA CAC CCG TA-3', miR-196a2C>T : forward 5'-CCC CTT CCC TTC TCC TCC AGA TA-3', backwards 5'-CGA AAA CCG ACT GAT GTA ACT CCG-3'; miR-499A>G : forward 5'-CAA AGT CTT CAC TTC CCT GCC A-3', backwards 5'-GAT GTT TAA CTC CTC TCC ACG TGA TC-3'. 냉각 온도는 58°C로 하였고, miR-146a C>G, miR-149 T>C와 miR-196a2 T>C polymorphisms은 37°C에서 16시간 동안 각각 Sac I, Alu I와 Msp I에 의해 추출하였고, 499A>G polymorphism은 50°C에서 16시간 동안 Bcl I (New England BioLabs, Beverly, MA, USA)에 의해서 추출하였다. 반응 물질(12 µl)은 ethidium bromide로 염색된 3.0% agarose ge를 따라 이동하게 하여 자외선 조사에 의해 직접적으로 나타나게 하였다. 임의로 4가지 miRNA 유전자 다양성 PCR

assays의 약 10% 정도는 반복실험을 하였으며 결과들은 automatic sequencer (ABI3730xl DNA Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 DNA 염기서열에 의해 일치 여부를 검사하였다.

2. 통계분석

임상 요소들의 분석에는 Chi-square test와 Fisher's exact test를 이용하였고, miRNA polymorphisms과의 연관성을 보기 위해서 multivariate logistic regression에 의한 95% confidence intervals (95% CIs)의 adjusted odds ratios (AORs)를 이용하였다. 통계학적 의의는 $P < 0.05$ 로 설정하였다.

결 과

1. 대상환자들의 임상 및 조직학적 특성

대상환자 160예의 평균 연령은 63.18 ± 11.76 세였으며, 남자 98예 (61.3%), 여자 62예(38.7%)였다. 대장암 중 결장암은 89예 (55.6%), 직장암 71예(44.4%)였다. 암의 병기는 I기 25예 (15.6%), II기 63예 (39.4%), III기 53예 (33.1%), IV기 19예 (11.9%)의 분포였다. 암의 조직학적 분화도에 따라 고분화암 14예(8.8%), 중등도 분화암 128예 (80.0%), 저분화암 6예 (3.8%), 점액성암 12예(7.5%)였다. 조직학적 침윤도에 따라 T1: 11예 (6.9%), T2: 19예(11.9%), T3: 93예(58.1%), T4: 37예(23.1%)의 분포를 보였고, 국소 림프절 전이 정도에 따라 N0: 91예(56.9%), N1: 37예(23.1%), N2: 32예(20.0%)였다 (Table 1).

2. 환자들의 성별 및 암 위치에 따른 miRNA 유전자 다양성

먼저 성별과 암의 위치에 따라 4가지 miRNA의 유전자 다양성에 차이가 있는지 보았으나 거의 차이가 없이 유사한 분포를 보였다. 특히 할 점은 3가지 mRNA의 유전자 다양성은 열성동형 (recessive homozygous phenotype)이 모두 10% 미만의 일반적인 빈도를 보인데 반해 miR-196a2 T>C의 변이형(CC) 만은 20% 내외의 높은 빈도를 보였다 (Table 2).

3. 암의 병기에 따른 miRNA 유전자 다양성

대장암의 병기 I기 25예, II기 63예, III기 53예, IV기 19예의 진행에 따른 4 가지 miRNA의 유전자 다양성의 분포를 분석하였다. 결과는 병기에 차이 없이 모두 고른 유사한 분포를 보였다. 혹시 우성 유전자나 열성 유전자들의 조합에 따라 차이 있는지를 살펴보았으나 의미가 없었다 (Table 3).

Table 1. Clinical characteristics of cases (n=160).

Characteristics	n (%)
Age, mean $\pm$ SD in years	63.18 $\pm$ 11.76
Gender	
Male	98 (61.3)
Female	62 (38.7)
Primary cancer location	
Colon	89 (55.6)
Rectum	71 (44.4)
Stage	
0/I	25 (15.6)
II	63 (39.4)
III	53 (33.1)
IV	19 (11.9)
Histological differentiation	
Well	14 (8.8)
Moderately	128 (80.0)
Poorly	6 (3.8)
Mucinous	12 (7.5)
Denth of Invasion	
T1	11 (6.9)
T2	19 (11.9)
T3	93 (58.1)
T4	37 (23.1)
Regional LN Metastasis	
N0	91 (56.9)
N1	37 (23.1)
N2	32 (20.0)

Table 2. Genotype frequencies of miRNA polymorphisms according to gender and tumor sites.

Characteristics	Male (n=98)	Female (n=62)	P^*	Colon (n=89)	Rectum (n=71)	P^*
<i>miR-146aC>G</i>						
CC	34 (34.7)	22 (35.5)	1.000	28 (31.5)	28 (39.4)	0.406
CG	55 (56.1)	32 (51.6)	0.627	50 (56.2)	37 (52.1)	0.635
GG	9 (9.2)	8 (12.9)	0.599	11 (12.4)	6 (8.5)	0.454
<i>miR-149T>C</i>						
TT	49 (50.0)	24 (38.7)	0.193	38 (42.7)	35 (49.3)	0.428
TC	44 (44.9)	32 (51.6)	0.422	44 (49.4)	32 (45.1)	0.634
CC	5 (5.1)	6 (9.7)	0.340	7 (7.9)	4 (5.6)	0.756
<i>miR-196a2T>C</i>						
TT	25 (25.5)	20 (32.3)	0.372	28 (31.5)	17 (23.9)	0.377
TC	46 (46.9)	27 (43.5)	0.745	40 (44.9)	33 (46.5)	0.874
CC	27 (27.6)	15 (24.2)	0.714	21 (23.6)	21 (29.6)	0.470
<i>miR-499A>G</i>						
AA	63 (64.3)	37 (59.7)	0.616	60 (67.4)	40 (56.3)	0.189
AG	33 (33.7)	25 (40.3)	0.404	27 (30.3)	31 (43.7)	0.099
GG	2 (2.0)	0 (0.0)	0.522	2 (2.2)	0 (0.0)	0.503

* Fisher's exact test.

Table 3. Genotype frequencies of miRNA polymorphisms according to tumor stages.

Characteristics	Stage I (n=25)	Stage II (n=63)	Stage III (n=53)	Stage IV (n=19)	P*
<i>miR-146aC>G</i>					
CC	6 (24.0)	26 (41.3)	16 (30.2)	8 (42.1)	0.337
CG	16 (64.0)	28 (44.4)	33 (62.3)	10 (52.6)	0.188
GG	3 (12.0)	9 (14.3)	4 (7.5)	1 (5.3)	0.564
Dominant (CC vs. CG+GG)					0.337
Recessive (CC+CG vs. GG)					0.564
<i>miR-149T>C</i>					
TT	16 (64.0)	24 (38.1)	23 (43.4)	10 (52.6)	0.150
TC	8 (32.0)	32 (50.8)	28 (52.8)	8 (42.1)	0.320
CC	1 (4.0)	7 (11.1)	2 (3.8)	1 (5.3)	0.398
Dominant (TT vs. TC+CC)					0.150
Recessive (TT+TC vs. CC)					0.398
<i>miR-196a2T>C</i>					
TT	4 (16.0)	21 (33.3)	14 (26.4)	6 (31.6)	0.415
TC	17 (68.0)	25 (39.7)	22 (41.5)	9 (47.4)	0.097
CC	4 (16.0)	17 (27.0)	17 (32.1)	4 (21.1)	0.463
Dominant (TT vs. TC+CC)					0.415
Recessive (TT+TC vs. CC)					0.463
<i>miR-499A>G</i>					
AA	16 (64.0)	41 (65.1)	32 (60.4)	11 (57.9)	0.924
AG	9 (36.0)	21 (33.3)	20 (37.7)	8 (42.1)	0.904
GG	0 (0.0)	1 (1.6)	1 (1.9)	0 (0.0)	0.852
Dominant (AA vs. AG+GG)					0.924
Recessive (AA+AG vs. GG)					0.852

* Chi-square test.

Table 4. Genotype frequencies of miRNA polymorphisms according to differentiation.

Characteristics	Well (n=14)	Moderately (n=128)	Poorly (n=6)	Mucinous (n=12)	P*
<i>miR-146aC>G</i>					
CC	6 (42.9)	44 (34.4)	1 (16.7)	5 (41.7)	0.677
CG	7 (50.0)	71 (55.5)	5 (83.3)	4 (33.3)	0.227
GG	1 (7.1)	13 (10.2)	0 (0.0)	3 (25.0)	0.317
Dominant (CC vs. CG+GG)					0.677
Recessive (CC+CG vs. GG)					0.317
<i>miR-149T>C</i>					
TT	9 (64.3)	57 (44.5)	3 (50.0)	4 (33.3)	0.423
TC	5 (35.7)	62 (48.4)	3 (50.0)	6 (50.0)	0.833
CC	0 (0.0)	9 (7.0)	0 (0.0)	2 (16.7)	0.351
Dominant (TT vs. TC+CC)					0.423
Recessive (TT+TC vs. CC)					0.351
<i>miR-196a2T>C</i>					
TT	1 (7.1)	41 (32.0)	1 (16.7)	2 (16.7)	0.159
TC	8 (57.1)	53 (41.4)	5 (83.3)	7 (58.3)	0.117
CC	5 (35.7)	34 (26.6)	0 (0.0)	3 (25.0)	0.424
Dominant (TT vs. TC+CC)					0.159
Recessive (TT+TC vs. CC)					0.424
<i>miR-499A>G</i>					
AA	10 (71.4)	79 (61.7)	6 (100.0)	5 (41.7)	0.097
AG	4 (28.6)	7 (36.7)	0 (0.0)	7 (58.3)	0.097
GG	0 (0.0)	2 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.918
Dominant (AA vs. AG+GG)					0.097
Recessive (AA+AG vs. GG)					0.918

* Chi-square test.

Table 5. Genotype frequencies of miRNA polymorphisms according to infiltration.

Characteristics	T1 (n=11)	T2 (n=19)	T3 (n=93)	T4 (n=37)	P*	Characteristics	T1 (n=11)	T2 (n=19)	T3 (n=93)	T4 (n=37)	P*
<i>miR-146aC>G</i>						<i>miR-196a2T>C</i>					
CC	3 (27.3)	6 (31.6)	31 (33.3)	16 (43.2)	0.658	TT	0 (0.0)	5 (26.3)	25 (26.9)	15 (40.5)	0.065
CG	6 (54.5)	12 (63.2)	49 (52.7)	20 (54.1)	0.873	TC	7 (63.6)	12 (63.2)	38 (40.9)	16 (43.2)	0.193
GG	2 (18.2)	1 (5.3)	13 (14.0)	1 (27.0)	0.188	CC	4 (36.4)	2 (10.5)	30 (32.3)	6 (16.2)	0.083
Dominant (CC vs. CG+GG)					0.658	Dominant (TT vs. TC+CC)					0.065
Recessive (CC+CG vs. GG)					0.188	Recessive (TT+TC vs. CC)					0.083
<i>miR-149T>C</i>						<i>miR-499A>G</i>					
TT	7 (63.6)	11 (57.9)	39 (41.9)	16 (43.2)	0.364	AA	6 (54.5)	11 (57.9)	56 (60.2)	27 (73.0)	0.492
TC	3 (27.3)	8 (42.1)	46 (49.5)	19 (51.4)	0.496	AG	5 (45.5)	8 (42.1)	36 (38.7)	9 (24.3)	0.361
CC	1 (9.1)	0 (0.0)	8 (8.6)	2 (5.4)	0.563	GG	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.1)	1 (2.7)	0.797
Dominant (TT vs. TC+CC)					0.364	Dominant (AA vs. AG+GG)					0.492
Recessive (TT+TC vs. CC)					0.563	Recessive (AA+AG vs. GG)					0.797

* Chi-square test.

4. 암의 분화도에 따른 miRNA 유전자 다양성

고분화암 14예, 중등도 분화암 128예, 저분화암 6예, 점액성 암

12예에 따라 4가지 miRNA 유전자 다양성의 분포를 보았다.

miR-196a2 T>C에서 상대적으로 우성 동형 유전자 TT의 분포

Table 6. Genotype frequencies of miRNA polymorphisms according to the number of lymph node metastasis.

Characteristics	None (n=91)	1≤N<4 (n=37)	N≥4 (n=32)	P*
<i>miR-146aC>G</i>				
CC	32 (35.2)	11 (29.7)	13 (40.6)	0.638
CG	46 (50.5)	23 (62.2)	18 (56.3)	0.476
GG	13 (14.3)	3 (8.1)	1 (3.1)	0.180
Dominant (CC vs. CG+GG)				0.638
Recessive (CC+CG vs. GG)				0.180
<i>miR-149T>C</i>				
TT	41 (45.1)	20 (54.1)	12 (37.5)	0.382
TC	42 (46.2)	16 (43.2)	18 (56.3)	0.518
CC	8 (8.8)	1 (2.7)	2 (6.3)	0.461
Dominant (TT vs. TC+CC)				0.382
Recessive (TT+TC vs. CC)				0.461
<i>miR-196a2T>C</i>				
TT	25 (27.5)	8 (21.6)	12 (37.5)	0.335
TC	44 (48.4)	17 (45.9)	12 (37.5)	0.570
CC	22 (24.2)	12 (32.4)	8 (25.0)	0.619
Dominant (TT vs. TC+CC)				0.335
Recessive (TT+TC vs. CC)				0.619
<i>miR-499A>G</i>				
AA	60 (65.9)	24 (64.9)	16 (50.0)	0.262
AG	30 (33.0)	13 (35.1)	15 (46.9)	0.367
GG	1 (1.1)	0 (0.0)	1 (3.1)	0.512
Dominant (AA vs. AG+GG)				0.262
Recessive (AA+AG vs. GG)				0.512

* Chi-square test.

도가 낮은 점이 특이했으나 전반적으로 암의 분화도에 따른 차이는 없었다 (Table 4).

5. 암의 장벽 침윤도에 따른 miRNA 유전자 다양성

조직학적 장벽 침윤도 T1: 11예, T2: 19예, T3: 93예, T4: 37예에 따른 4가지 miRNA 유전자 다양성의 분포를 보았다. 여기서도 비슷하게 miR-196a2 T>C에서 4 단계 침윤도 모두에서 우성 동형 유전자 TT의 낮은 분포도를 보였으나, 전반적인 침윤도에 따른 4가지 miRNA 유전자 다양성의 분포 차이는 없었다 (Table 5).

6. 국소 림프절 전이에 따른 miRNA 유전자 다양성

국소 림프절 전이 정도 N0: 91예, N1: 37예, N2: 32예에 따른 4가지 miRNA 유전자 다양성의 분포를 살펴 보았으나 지극히 고른 분포로 역시 의미있는 차이를 발견할 수 없었다 (Table 6).

고 찰

MicroRNA 종류와 여러 암과의 관계는 서론에서 기술한 바와 같으나 암의 진행 정도와 miRNA 사이의 연구보고는 아직 많지 않은데 Arndt 등²⁰⁾은 대장암 세포주 실험에서 여러 miRNAs 중에서 특히 miR-145의 발현이 전이성 대장암 세포주에서 뚜렷이 감소됨을 발견하여 대장암의 전이와 연관성에 대해 언급하였고, Scepeler 등²¹⁾은 miR-145의 감소가 대장암의 공격성 (aggressiveness)과 관련 있다고 보고하였다. Slaby 등²²⁾은 몇가지 miRNAs의 실험에서 miR-21의 발현 증가가 국소 림프절 및 원격전이와 관련이 있음을 보고하였고, Bandres 등²³⁾도 miR-31의 증가가 대장암의 병기와 연관이 있다고 보고하였다. MicroRNAs 발현의 증가 혹은 감소 뿐만 아니라 유전자 다양성 (polymorphism)에 따른 각종 암과의 관계를 연구한 논문들이 발표되고 있다. 예를 들어 Hoffman 등²⁴⁾은 miR-196a2의 C 대립 유전자 (allele)가 의미있게 유방암과의 관련성이 있다고 보고하였고, Tian 등²⁵⁾은 miR-196a2의 CC 유전자 형이 중국인들에서 뚜렷하게 폐암과의 위험성을 증가시킨다고 보고하였다. miR-146a의 경우 Guo 등²⁶⁾은 GG 변이 유전자형 (genotype)이 의미있게 중국인들에서 식도암의 위험도를 증가시킨다고 보고하였고 Jazdzewski 등²⁷⁾은 miR-146a의 CG형이 갑상선 암의 위험도와 관련 있다고 보고하였다.

그런데 microRNAs의 유전자 다양성 (polymorphism)에 따른 대장암 진행 정도와의 관계를 연구한 논문은 매우 드물다. 따라서 miRNA 유전자 다양성과 대장암에 대한, 특히 대장암의 진행 정도와의 연관성 연구로는 본 논문이 국내 보고로는 선행적 의의를 지닌다고 생각된다. 본 연구에서는 위에서 언급한 타 암에서의 연관성이 보고되고, 또 본 연구자들이 선택 가능했던 4가지 이들 miRNA : miR-146a C>G, miR-149 C>T, miR-196a2 C>T와 miR-499 A>G의 유전자 다양성이 암 병기, 장벽 침윤도, 국소 림프절 전이 등의 대장암의 진행 정도를 나타내는 임상요소들에 따라 어떻게 변화 있게 나타나는지를 본 것이다. 아울러 이들 중 일부는 아직 대장암과의 연관성이 보고되어 있지 않은데, 현재 세계 각처에서 다양한 mRNA를 이용하여 각종 암과의 관계를 밝히려 시도를 하고 있어 본 연구도 그 일환으로서의 의미가 있다고 하겠다. 또한 본 연구자들은 대조군 건강집단에서의 이들 miRNA의 유전자 다양성과 대장암 환자들에서의 다양성 차이에 따른 발병, 예후 및 생존율 등을 비교 분석할 장기적인 실험을 현재 진행하고 있어, 본 논문은 mRNA에 대한 소개와 암의 임상적 진행양상과의 일면적인 관계를 보는 선별적인 논문으로

서 성격을 지닌다고 할 수 있다. 따라서 대조군 건강집단에서의 이들 miRNA의 유전자 다양성의 분포는 본 논문 목적에 직접적인 관련이 없어 언급하지 않았다. 실험결과로, 먼저 이들 miRNA의 유전자형의 분포가 성별과 결장, 직장의 암의 위치 등 기본적인 임상 요소에 따라 어떻게 나타나는지를 보기 위해 그 분포를 보았으나 각 두 그룹간의 차이가 없었다. 다만 대부분 miRNA의 이형접합성(heterozygous) 유전자 조합이 다수의 빈도를 차지하였으나 miR-499 A>G에서만 이 우성 동형 AA 유전자가 다수의 빈도를 보였다. 암의 임상적 진행 요소들과의 4가지 miRNA 유전자 다양성의 의미 있는 분포의 변화를 예견하였으나 기대에 못 미치게 병기, 장벽 침윤도, 국소 림프절 전이 및 암의 분화도의 어느 요소에서도 의미 있는 변화를 발견할 수 없었다. 이러한 결과는 Chen 등²⁸⁾이 보고한 중국인 대장암 환자에서의 miR-196a2의 CC 변이형이 대장암에로의 위험도나 대장암의 진행과 무관하다는 것과 유사하다. 다만 miR-196a2 C>T가 여러 요소들에서도 우성 동형 유전자 TT의 낮은 분포도를 보이는 것이 눈에 띄는 정도였다. 그러나 괄목할만한 의미는 없어도 이러한 점들을 깊이 연구하다 보면 micro RNA 및 그 유전자 다양성이 각종 암의 발암 및 진행에 관여하는 역할을 밝히는데 도움이 될 것이다.

결 론

본 실험에서 선택한 4가지 miRNA의 유전자 다양성이 대장암의 임상적 진행 정도에 따라 의미 있는 결과를 보이지만 않으므로 대장암을 비롯한 각종 암에서 miRNA와의 관계 및 역할을 밝히도록 보다 다양한 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

REFERENCES

1. Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in Molecular Medicine* 2006;12:580-587.
2. Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA-implications for cancer. *Virchows Arch* 2008;452:1-10.
3. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-233.
4. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005;433:769-773.
5. Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol Genet Metab* 2007;91:209-217.
6. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004;14:1902-1910.
7. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051-4060.
8. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol* 2006;342:33-47.
9. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation microRNA genes miR 15 and miR 16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:15524-15529.
10. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNA in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2005;64:3753-3756.
11. Eis PS, Tam W, Sun L, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci* 2005;103:3627-3632.
12. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. microRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:7065-7070.
13. Michael MZ, O' Connor SM, Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 2003;1:882-891.
14. Schimanski CC, Frerichs K, Rahman F, Berger M, Lang H, Galle PR, et al. High pre-miR-196a levels promote the oncogenic phenotype of colorectal cancer cells. *World J Gastroenterol* 2009;15:2089-2096.
15. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Zeng Y, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 2008;118:2600-2608.
16. Qi P, Dou TH, Geng L, Zhou FG, Gu X, Wang H, et al. Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol* 2010;71:621-626.
17. Peng S, Kung Z, Sheng C, Zhang Y, Zum H, Cheng Q. Association of microRNA-196a2 gene polymorphism with gastric cancer risk in a Chinese population. *Dig Dis Sci* 2009;55:2288-2293.
18. Hu Z, Liang J, Wang Z, Tian T, Zhou X, Chen J, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs were associated with increased risk of breast cancer in Chinese women. *Hum Mutat* 2009;30: 79-84.
19. Guo H, Wang K, Xiong G, Hu H, Wang D, Xu X, et al. A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Familial Cancer* 2010;9:599-603.

- 20.** Arndt GM, Dossey L, Cullen LM, Lai A, Drunker R, Eisbacher M, et al. Characteristics of global microRNA expression reveals oncogenic potential of miR-145 in metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009;9:374-390.
- 21.** Scepeler T, Reinert JT, Ostenfeld MS, Christensen LL, Silahdaroglu AN, Dyrskot L, et al. Diagnostic and prognostic MicroRNAs in Stage II Colon Cancer. *Cancer Res* 2008;68:6416-6424.
- 22.** Slaby O, Svoboda M, Fabian P, Smerdova T, Knoflickova D, Bednarikova M, et al. Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer. *Oncology* 2007;72:397-402.
- 23.** Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, et al. Identification by real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular Cancer* 2006;5:29-38.
- 24.** Hoffman AE, Zheng T, Yi C, Leaderer D, Weidhaas J, Slack F, et al. microRNA miR-196a-2 and breast cancer: a genetic and epigenetic association study and functional analysis. *Cancer Res* 2009;69:5970-5977.
- 25.** Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, Jin G, et al. A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biostatistics Prev* 2009;18:1183-1187.
- 26.** Guo H, Wang K, Xiong G, Hu H, Wang D, Xu X, et al. A functional variant in microRNA-146a is associated with risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese Han. *Familial Cancer* 2010;9:599-603.
- 27.** Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, Chapelle ADL. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 2008;105:7269-7274.
- 28.** Chen H, Sun LY, Chen LL, Zheng HQ, Zhang QF. A variant in microRNA-196a2 is not associated with susceptibility to and progression of colorectal cancer in Chinese. *Intern Med J* 2011;17. DOI: 10.1111/j.1445-5994.2011.02434.x.
-

The Relationship between the progression of colorectal cancer and microRNA polymorphisms

Department of Surgery, ¹Institute for Clinical Research,, School of Medicine, CHA University, Seongnam, South Korea
Ho Jin Chang, Nam Keun Kim¹, Young Joo Jeon¹, Jong Woo Kim

Abstract

Purpose : MicroRNA(miRNA) is related not only with basic biologic process but with regulatory functions of diverse diseases including cancer. Although it is non-coding RNA of small nucleotides(18~23), nucleotide variation within primary(pri)- or precursor(pre)-miRNA might affect the mature process of miRNA and can change it. And then we aim to elucidate the relationship between 4 kinds of pre-miRNA and clinical progress of colorectal cancer such as tumor stage, depth of invasion and regional lymph nodes metastasis.

Methods : DNA was extracted from blood samples of 160 patients who underwent operation on colorectal cancers during recent 2 years and has-mir-146aC>G, has-mir-149T>C, has-mir-196a2T>C and has-mir-499A>G polymorphisms were genotyped by PCR-RFLP.

Results : There was no relationship between the polymorphism distributions of 4 kinds of pre-miRNA and any clinical progresses of colorectal cancer.

Conclusion : Although we were unable to find out significant relation between two categories, further active studies with miRNAs and cancers should be carried on.

Key Words : MicroRNA, polymorphism, Colorectal cancer

Correspondence : Jong Woo Kim

Department of Surgery, School of Medicine, CHA University, 351, Yatap-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, 463-712, South Korea
Tel: 82-31-780-5250 Fax: 82-31-780-5259 E-mail: kjw@cha.ac.kr

Received : September 23, 2011 ; **Accepted :** October 20, 2011