

2012년 2월
박사학위논문

정상 구강각화세포와 구강암세포
YD-38에서 microRNA 분석

조선대학교 대학원

치의학과

김혜련

정상 구강각화세포와 구강암세포 YD-38에서 microRNA 분석

MicroRNA analysis in normal human oral keratinocytes
and YD-38 human oral cancer cells

2012년 2월 일

조선대학교 대학원

치의학과

김혜련

정상 구강각화세포와 구강암세포 YD-38에서 microRNA 분석

지도교수 김도경

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2011년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 혜 련

김혜련의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 홍 중 인

위 원 조선대학교 교 수 전 제 열 인

위 원 조선대학교 교 수 임 성 훈 인

위 원 조선대학교 교 수 김 춘 성 인

위 원 조선대학교 교 수 김 도 경 인

2011년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차.....	iii
도목차.....	iv
ABSTRACT	v
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	4
1. 실험재료.....	4
2. 세포배양.....	4
3. MicroRNA(miRNA) 추출.....	5
4. miRNA microarray 및 결과분석.....	6
5. 정량 PCR 분석.....	6
6. Vector 제작.....	7
7. MTT 분석.....	10
8. 실험자료의 통계학적 검정.....	10

III. 실험결과.....	11
1. NHOK와 YD-38세포의 miRNA microarray 분석.....	11
2. NHOK와 YD-38세포에서 정량 PCR에 의한 miRNA 발현 분석.....	11
3. YD-38 세포성장에 미치는 miRNA의 효과.....	16
IV. 총괄 및 고안.....	19
V. 결론.....	22
VI. 참고문헌.....	23

표 목 차

Table 1. miRNA primer sequences for quantitative real-time PCR analysis	7
Table 2. The full sequences and primer sequences of miRNAs for vector construction	9
Table 3. miRNAs up-regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK	12
Table 4. miRNAs down-regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK	13

도 목 차

Fig. 1. The map of pSUPER basic vector (Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA).....	8
Fig. 2. miRNAs up- or down- regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK by miRNA assay analysis.....	14
Fig. 3. miRNAs up- or down- regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	15
Fig. 4. The effect of miR-203 on the cell viability in YD-38 cells.....	17
Fig. 5. The effect of miR-125a on the cell viability in YD-38 cells.....	18

ABSTRACT

MicroRNA analysis in normal human oral keratinocytes and YD-38 human oral cancer cells

Kim, Hye Ryun

Advisor: Prof. Kim, Do Kyung, Ph.D.

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

MicroRNAs (miRNA) are small noncoding RNAs that mediate gene expression at the post-transcriptional level by degrading or repressing target messenger RNAs (mRNA). They are about 21-25 nucleotides in length and regulate mRNA translation by base pairing to partially complementary sites, predominantly in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of mRNA. They play important roles in numerous cellular processes, including development, proliferation and apoptosis. Recent evidence demonstrated that miRNAs function as oncogenes or tumor suppressors to modulate multiple oncogenic cellular processes in cancer development, including initiation, cell proliferation, apoptosis, invasion and metastasis of human cancers. In this study, the expression profile of miRNAs was compared and analyzed for establishment of miRNAs related cell growth inhibition in normal human oral keratinocytes (NHOK) and YD-38 human oral cancer cells.

To determine the expression profile of miRNAs in NHOK and YD-38 cells, it was examined by miRNA microarray analysis, quantitative real-time PCR analysis (qRT-PCR) and MTT assay.

In miRNA microarray analysis, 40 miRNAs and 31 miRNAs were found up- and down-regulated in YD-38 cells compared to NHOK among the 1,769 miRNAs examined, respectively. MiR-30a, miR-1246, miR-720 and miR-934 were up-regulated in YD-38 cells compared to NHOK more than 10 times, in contrast miR-203, miR-125a, miR-132, miR-UL70-3p and miR-1228 were down-regulated more than 10 times. In qRT-PCR analysis, the expression levels of miR-30a and miR-1246 were increased in YD-38 cells compared to NHOK more than 50 times, and miR-203 and miR-125a were decreased more than 3 times. Importantly, the overexpression of miR-203 and miR-125a significantly inhibited the growth of YD-38 cells.

These results show that the miR-203 and miR-125a decrease in YD-38 cells compared to NHOK, and highly inhibit proliferation of YD-38 human oral cancer cells. Moreover, these *in vitro* results indicate that different miRNAs are deregulated in NHOK and oral cancer cells, suggesting the involvement of these genes in the development and progression of oral cancer, and that they may have potential properties for anti oral cancer drug discovery.

KEY WORDS: MicroRNA(miRNA), NHOK, Oral cancer cells, Cell death,
Anti-cancer therapy

I. 서 론

미국 하버드대 Ambros 연구팀은 꼬마선충의 발생을 조절하는 작은 RNA를 발견하여 이를 ‘small temporal RNA(stRNA)’라 하였다(Lee et al., 1993). 그 후 여러 연구팀들이 꼬마선충, 초파리 및 사람 등에서 150여개에 이르는 작은 RNA를 발견하였으며, stRNA를 포함하여 이 작은 RNA들을 ‘microRNA(miRNA, miR)’라 명명하였다(Ambros, 2001; Hutvagner et al., 2001; Kataoka et al., 2001; Kim et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Dostie and Dreyfuss, 2002; Lagos-Quintana et al., 2002; Mallory et al., 2002; Mourelatos et al., 2002; Sempere et al., 2002).

miRNA는 생체 내 내인성으로 존재하고 종간에 진화적으로 잘 보존되어 있으며, RNA 간섭을 통하여 그 기능을 발휘한다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009). 그리고 miRNA는 그 크기가 21-25개의 염기에 불과한 극히 작은 noncoding RNA 분자이며, 주로 표적 유전자의 3'-UTR 결합부위에 상보적인 염기서열을 가지면서 그 표적유전자의 단백질 합성을 억제하거나 촉진시키는 기능을 보유한 것으로 알려져 있다(Majid et al., 2010; Li et al., 2011; Nishida et al., 2011). 또한 miRNA는 진핵세포 내에서 다양한 유전자를 조절함으로써 세포분화, 성장 및 증식 등 대부분의 생명현상에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 특히 여러 악성종양에서 특이적인 발현양상을 보여 종양유전자 혹은 종양억제자로서 발암과정에 다양하게 관여하는 것으로 보고되고 있다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009; Majid et al., 2010; Li et al., 2011; Nishida et al., 2011).

종양 관련 miRNA를 ‘oncogenic miRNA’라 부르며, 여러 악성종양에서의 oncogenic miRNA 발현 프로파일링(expression profiling) 결과들은 여러 종양의 조기진단과 예후

측정에 있어 임상적 응용 가능성을 보여주었다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009). 종양과 관련된 최초 보고 miRNA는 miR-15/-16이었으며, miR-15/-16은 B-cell chronic lymphocytic leukemia에서 그 발현이 매우 낮았고 이들이 존재하는 염색체 13q14 부위가 결손되어 있었다(Chen and Lodish, 2005; Cimmino et al., 2005; Calin and Croce, 2006). 또한 miR-126은 유방암 증식을 억제하는데 관여한다고 보고되었으며, 폐암세포에 miR-126 발현을 증가 시켰을 때 세포의 증식과 이동에 관여하는 세포 내 신호전달과정을 조절하는 보조 단백질의 일종인 Crk의 발현을 감소시킴으로서 폐암세포의 유착과 이동 및 invasion을 저해한다고 보고되었다(Urbich et al., 2008; Meister and Schmidt, 2010). 이 외 miR-17, miR-21, miR-155, miR-221/-222, miR-34a, miR-223, miR-107 및 Let-7 등의 miRNA들이 암의 발생 및 전이에 매우 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다(Cho, 2007; Nervi et al., 2007; Hermeking, 2009; Tili et al., 2009; Albinsson and Sessa, 2010; Chen et al., 2011; Osada and Takahashi, 2011; Pan et al., 2011)

보건복지가족부의 우리나라 암 등록 조사자료 분석보고서에 의하면, 우리나라에서 1년에 약 1200 -1500명의 구강암 환자가 발생하는 것으로 추정된다. 구강암은 인체에 발생하는 암의 약 4-5%를 차지하고 있으며 95% 이상이 편평세포암종으로, 흡연, 음주, 만성적 자극, HPV 바이러스 감염 등을 원인으로 생각하고 있다(Todd et al., 1997; Notani, 2000). 특히 구강암은 예후가 좋지 않고, 환자의 평균 5년 생존율이 약 40-60%로 알려져 있으며, 이 생존율이 지난 30년 동안 전혀 증가하지 않았다(Todd et al., 1997; Notani, 2000). 구강암은 다른 부위의 암과 비교하여 볼 때, 쉽게 생검할 수 있고 치료효과의 모니터링이 다른 부분의 암과 달리 간편하여 화학방사선요법 혹은 유전자 치료법의 대상으로 훌륭한 모델이 될 수 있음에도 불구하고, 구강암은 다른 암에 비해 그 발생기전 등 분자생물학적 접근이 되어있지 않은 암 중의 하나이다.

miRNA는 컴퓨터 데이터베이스 상으로는 다양한 표적유전자가 예측되어 있으나,

실제 그 기능이나 표적유전자에 대한 연구는 거의 되어 있지 않다. 따라서 miRNA가 발현되는 조직이나 세포, 더 나아가 miRNA의 발현을 조절하는 단백질이나 신호전달에 대한 연구가 절실히 필요하며, 특히 구강암에서 miRNA 연구는 그 연구가 매우 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 정상 사람 구강각화세포(normal human oral keratinocytes, NHOK)와 한국인에서 유래한 구강암세포주 YD-38에서 miRNA들의 발현을 비교·분석하여 구강암 특이 miRNA를 확립하고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

N-methylthiotetrazole(MTT)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, ECL detection kit는 Amersham Biosciences Corp.(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다. MiRNeasy mini kit, Mispript reverse transcription kit, Mispript SYBR green PCR kit 및 Attractene transfection reagent는 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서 구입하여 사용하였고, pSUPER basic vector는 Oligoengine Inc.(Seattle, Washington, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 분석시약들은 analytical grade를 구입하여 사용하였다.

사람 구강암세포 YD-38은 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 제공받아 실험에 이용하였다.

2. 세포배양

1) 정상 사람 구강각화세포(Normal human oral keratinocytes, NHOK)

사람의 정상 구강점막(oral mucosa)은 조선대학교 치과병원(광주, 대한민국)에서 치관확장(crown lengthening) 시술을 받은 환자의 동의를 얻어 수집하였으며, 조선대학교 연구윤리위원회의 승인을 받아 실험에 이용하였다. 조직시료를 povidone iodine 용액으로 소독하고 약 5 x 10mm의 크기로 절단한 후, 100U/ml streptomycin과 1% amphotericin B가 함유된 4°C의 0.25% trypsin/Hank's balanced salt solution(HBSS)에 함수하여 결합조직을 제거하였다. 조직시료를 상온에서 30분간 유지시킨 후, 미세한 forcep을 이용하여 상피조직을 분리하였으며, 0.025% trypsin이 함유된 EDTA에서 10

분간 처리하고 400 x g로 원심분리하여 세포를 분리하였다. 세포(NHOK)를 50 μ g/ml gentamycin, 5ng/ml epidermal growth factor(EGF) 및 50 μ g/ml pituitary gland extract가 함유된 keratinocyte growth medium(KGM-SFM)배지에서 0.5 x 10³ cells/cm² 이상의 밀도로 배양하였으며, 본 연구에서는 1-3 세대의 NHOK를 이용하여 실험하였다.

2) YD-38 세포

사람 구강암세포 YD-38은 10% fetal bovine serum(FBS, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 및 항생제(100u/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin)가 함유된 37°C의 RPMI 1640(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 성장배지 하에서 배양하면서 실험에 이용하였다.

3. MicroRNA(miRNA) 추출

NHOK와 YD-38 세포에서 miRNeasy mini kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 miRNA를 분리하고 정제하였다. 각 세포가 들어있는 1.5ml tube에 700 μ l의 lysis reagent를 넣어 충분히 균질화 시키고 상온에서 5분 동안 반응시킨 후, 140 μ l의 chloroform을 첨가하여 15초간 혼합하였다. 상온에서 3분 동안 반응시킨 후, 4°C에서 15분간 12,000 x g로 원심분리 하였다. 상층액을 mini column으로 이동시켜 8,000 x g로 15초간 원심분리한 후, RWT buffer와 RPE buffer를 각각 처리하고 8,000 x g로 원심분리하여 miRNA 시료를 세척하였다. 시료가 들어있는 mini column을 RNA용 수집 tube로 이동시킨 후, 8,000 x g에서 1분간 원심분리하여 miRNA를 추출하였다. 추출한 miRNA를 Biophotometer(Eppendorf, Hamburg, Germany)로 정량한 후 실험에 이용하였다.

4. miRNA microarray 및 결과분석

NHOK와 YD-38 세포에서 miRNA 발현양상을 microarray 분석으로 확인하였다. NHOK와 YD-38 세포에서 miRNA를 추출하여 Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 각 세포별 miRNA microarray 영상을 스캔하였으며, 신호강도는 20-100 사이, 노이즈 강도는 5 이하인 조건을 만족하는 범위에서 실험을 진행하였다. Affymetrix GCOS software(Affymetrix, Fremont, CA, USA)를 이용하여 microarray 결과를 분석하였으며, 각 세포별 microarray 결과를 plot 으로 나타내어 전체 데이터의 신호강도 분포를 확인하였다.

5. 정량 PCR 분석

miRNA microarray 결과 중, NHOK와 YD-38 세포와 비교하였을 때 그 발현의 차가 큰 miRNA들(miR-30a, miR-1246, miR-203, miR-125a)을 정량 PCR 분석으로 재 확인하였다. miScript Reverse Transcription kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 miRNA 1 μ g, RTase mix 0.5 μ l 및 RT buffer 2 μ l를 혼합한 후, 전체 부피가 10 μ l가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였으며, 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시키고 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 miScript SYBR Green PCR kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 cDNA 3ng, SYBR Green master mix 10 μ l, universal primer 1 μ l 및 각 miRNA primer 1 μ l를 혼합한 후, 전체 부피가 20 μ l가 되도록 DEPC를 처리한 물로 적정하였다. ExicyclerTM 96(Bioneer co., Daejeon, Korea)을 이용하여 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 55 $^{\circ}$ C에서 30초, 70 $^{\circ}$ C에서 30초를 45회 반복하여 반응시켰다. 정량 PCR 결과를 qcalculator 1.0 program(Institut of Pharmacology & Toxicology, University of Bonn, Bonn,

Germany)을 이용하여 Ct 값에 따른 miRNA양을 정량적으로 계산하여 분석하였다. 정량을 위한 내부 대조군(internal control)으로는 u6를 이용하였으며, PCR 분석에 사용된 각 miRNA primer는 Table 1에 나타내었다.

Table 1. miRNA primer sequences for quantitative real-time PCR analysis

miRNAs	Primer sequences
miR-30a	TGTAAACATCCTCGACTGGAA
miR-1246	AATGGATTTTTGGAGCAGG
miR-203	GTGAAATGTTTAGGACCACTA
miRr-125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTG
u6	CGCAAGGATGACACGCAAATT

6. Vector 제작

각 miRNA가 삽입된 클론을 위해, pSUPER basic vector(Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA)(Fig. 1)를 이용하여 miRNA 염기서열을 포함하는 vector를 제작하였다. 선

별된 miRNA를 클로닝하기 위해, 각 miRNA를 제조할 수 있는 primer(Table 2)를 제작하여 non-template PCR을 수행하였다. PCR 생산물(insert oligo)과 pSUPER basic vector를 제한효소 *Bgl II*(AGATCT)와 *Xho I*(GAGCTC)으로 각각 절단한 후, T4 DNA ligase를 이용하여 miRNA 염기서열을 vector에 접합시켰다. 재조합 된 vector를 competent cell(*DH-5a*)에 transformation 시킨 후, 항생제 ampicillin이 포함된 LB agar plate에 콜로니를 배양하여 플라스미드(vector)를 분리하고 그 염기서열을 확인하였으며, 정확한 miRNA 염기서열을 보유한 재조합 vector를 선별하여 실험에 이용하였다.

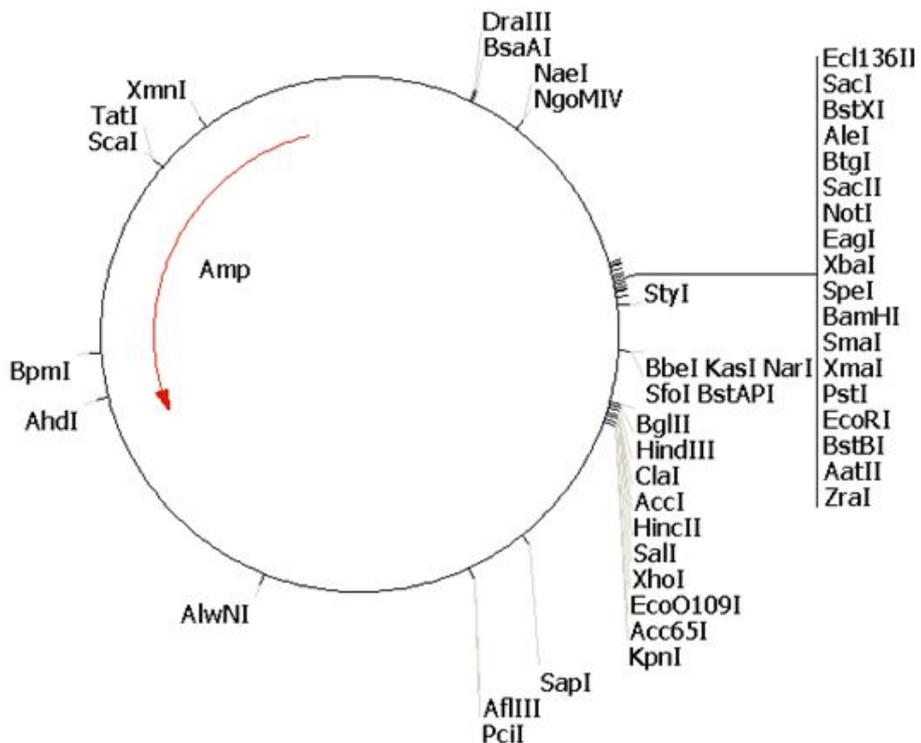


Fig. 1. The map of pSUPER basic vector (Oligoengine Inc., Seattle, WA, USA)

Table 2. The full sequences and primer sequences of miRNAs for vector construction

miRNAs	Full sequence of miRNAs	Primer sequences of miRNAs
miR-203	GTGTTGGGGACTCGCGCG CTGGGTCCAGTGGTTCTT AACAGTTCAACAGTTCT GTAGCGCAATTGTGAAA TGTTTAGGACCACTAGAC CCGGCGGGCGCGGCGACA GCGA	Forward :
		AGCAGATCTGTGTTGGGG
		ACTCGCGCGCTGGGTCCAG
		TGGTTCTTAACAGTTCAA
		CAGTTCTGTAGCGCAA

Reverse :		
GACCTCGAGTCGCTGTTCGC		
CGCGCCCGCCGGGTCTAGT		
GGTCCTAAACATTTTACA		
ATTGCGCTACAGAACTG		
miR-125a	TGCCAGTCTCTAGGTCCC TGAGACCCTTTAACCTGT GAGGACATCCAGGGTCAC AGGTGAGGTTCTTGGGA GCCTGGCGTCTGGCC	Forward :
		AGCAGATCTTGCCAGTCTC
		TAGGTCCCTGAGACCCTTT
		AACCTGTGAGGACATCCA

		Reverse :
GACCTCGAGGGCCAGACGC		
CAGGCTCCCAAGAACCTCA		
CCTGTGACCCGTGGATGTC		

7. MTT 분석

miRNA에 의한 암세포 성장 억제효과를 관찰하기 위해, 24well plate에 4×10^4 cells/well의 YD-38 세포를 접종하였으며, 24시간 배양한 후 새로운 배양배지로 교체하였다. Attractene Transfection reagent(Qiagen, Valencia, CA, USA) $1.5\mu\text{l}$ 와 miRNA 염기서열이 삽입된 재조합 vector(0.2ng/ml , 0.6ng/ml , 2ng/ml , 6ng/ml , 20ng/ml , 60ng/ml , 200ng/ml)를 혼합하여 상온에서 15분간 반응 시킨 후 YD-38 세포에 처리하여 48시간 동안 배양하였으며, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다. MTT 분석은 YD-38 세포에 MTT 용액(MTT 최종농도 $0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 37°C 에서 4시간 처리한 후, MTT 용액을 제거하고 0.04N HCl이 함유된 isopropanol로 녹여내어 570nm 에서 흡광도를 측정하여 시행하였다.

8. 실험자료의 통계학적 검정

모든 실험성적은 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 나타내었고, 각 실험군 간의 유의성 검정은 ANOVA 후에 Student's t-test를 하였으며, p value가 0.05 미만($p < 0.05$)의 경우에서 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. NHOK와 YD-38세포의 miRNA microarray 분석

NHOK와 YD-38 세포에서 miRNA 발현양상을 microarray 분석으로 확인하였다. NHOK와 YD-38 세포에서 총 1,769개의 miRNA를 비교·분석한 결과, 정상 구강각화 세포인 NHOK와 비교하여 구강암세포주인 YD-38에서 40개의 miRNA가 그 발현이 증가하였으며 31개의 miRNA가 발현이 감소하였다. YD-38에서 발현이 5배 이상 증가된 miRNA는 24개였으며, 5배 이상 감소된 miRNA는 16개였다(Table 3과 4). 그 중 특이적으로 10배 이상 증가한 miRNA는 miR-30a, miR-1246, miR-720 및 miR-934이었으며, 10배 이상 감소한 miRNA는 miR-203, miR-125a, miR-132, miR-UL70-3p 및 miR-1228이었다(Fig. 2).

2. NHOK와 YD-38세포에서 정량 PCR에 의한 miRNA 발현 분석

miRNA microarray 결과 중, NHOK와 YD-38 세포를 비교하였을 때 그 발현의 차이가 큰 miRNA(miR-30a, miR-1246, miR-203, miR-125a)를 miScript Reverse Transcription kit를 이용하여 정량 PCR 분석으로 재확인하였다. 정량 PCR 결과, miR-30a는 정상 구강각화세포인 NHOK에 비해 구강암세포주인 YD-38에서 그 발현이 약 74배 증가하였으며 miR-1246은 약 53배 증가하였다(Fig. 3). miR-203은 NHOK에 비해 YD-38에서 그 발현이 약 8배 감소하였고 miR-125a는 약 3배 감소하였으며(Fig. 3), 정량 PCR에 의한 miRNA 발현분석 결과는 miRNA microarray 분석결과와 일치함을 확인할 수 있었다.

Table 3. miRNAs up-regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK

miRNAs	NHOK (signal)	YD-38 cells (signal)	Absolute fold change
miR-30a	72.17	992.47	13.752
miR-1246	207.86	2700.80	12.994
miR-720	24.93	289.63	11.618
miR-934	16.24	177.12	10.907
HBII-135	292.15	2894.70	9.908
U82	58.76	545.02	9.274
U51	92.72	737.24	7.950
U38B	173.20	1369.80	7.908
HBI-6	25.16	196.30	7.800
U36B	26.70	203.17	7.609
U65	35.58	263.25	7.399
miR-24-2	16.21	119.23	7.353
HBII-296B	17.40	121.00	6.953
miR-324-5p	31.92	218.22	6.836
HBII-180C	73.12	492.00	6.728
miR-429	18.46	122.62	6.642
ACA33	32.85	214.36	6.525
U79	53.61	345.97	6.453
miR-21	18.23	117.50	6.446
ACA41	33.19	213.17	6.422
miR-625	17.47	106.50	6.097
miR-200a	147.04	894.06	6.080
U56	508.13	3089.40	6.080
miR-301a	26.51	160.73	6.061

Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than $\pm 11\%$.

Table 4. miRNAs down-regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK

miRNAs	NHOK (signal)	YD-38 cells (signal)	Absolute fold change
miR-203	3767.70	73.28	- 31.414
miR-125a	1178.40	90.22	- 13.061
miR-132	215.56	17.40	- 12.383
miR-UL70-3p	724.86	63.02	- 11.502
miR-1228	1530.70	133.87	- 11.434
miR-34a	251.86	26.12	- 9.641
miR-193b	869.73	110.26	- 7.888
HBII-85-6	877.90	112.46	- 7.806
miR-92b	320.55	42.91	- 7.469
miR-638	3307.70	473.51	- 6.985
HBII-85-2	173.23	24.81	- 6.979
HBII-85-26	1066.00	161.19	- 6.613
miR-663	1447.70	219.75	- 6.587
miR-149	2055.80	320.03	- 6.423
HBII-85-8	236.78	39.19	- 6.041
14qII-14	65.46	12.83	- 5.099

Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than $\pm 11\%$.

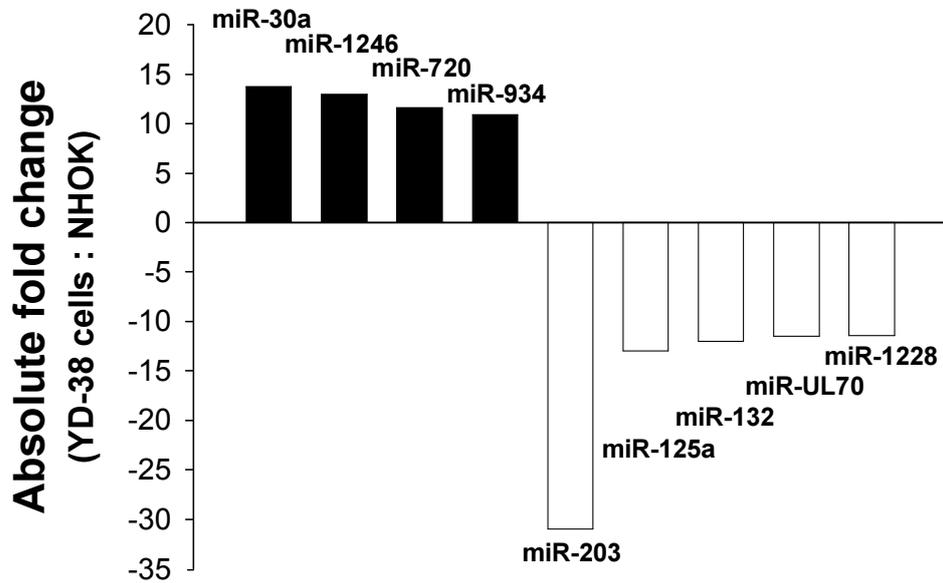


Fig. 2. miRNAs up- or down-regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK by miRNA microarray analysis. Each absolute fold change value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than $\pm 11\%$.

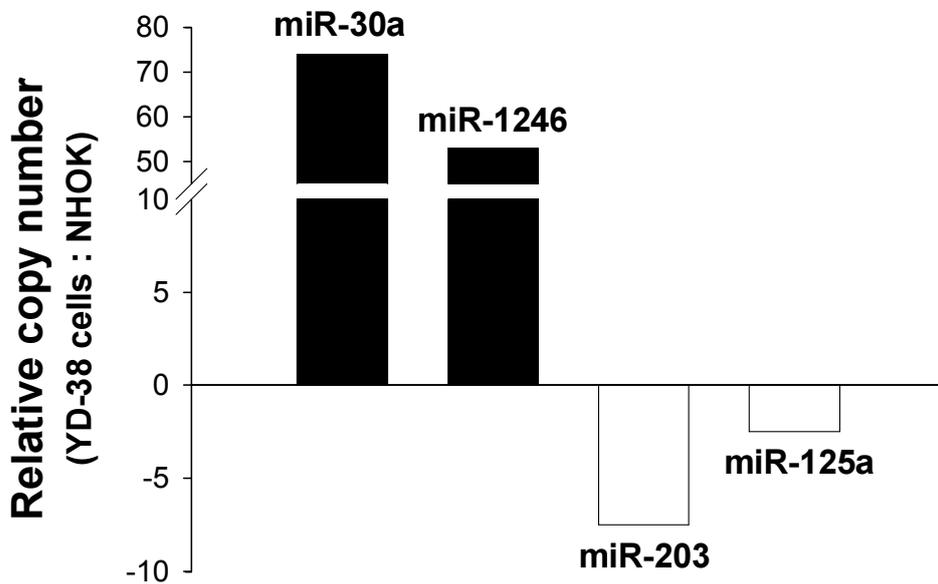


Fig. 3. miRNAs up- or down-regulated in YD-38 cells in comparison to NHOK by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). The qRT-PCR was performed as described in "MATERIALS AND METHODS". The expression level of miRNA was calculated by using qcalculator 1.0 program after internal control u6 normalization. Each relative copy number value represents the mean of three independent experiments with varying SEM less than $\pm 14\%$.

3. YD-38 세포 성장에 미치는 miRNA의 효과

miRNA에 의한 암세포 성장 억제효과를 조사하기 위해, miRNA 염기서열이 삽입된 재조합 vector(0.2ng/ml, 0.6ng/ml, 2ng/ml, 6ng/ml, 20ng/ml, 60ng/ml, 200ng/ml)를 YD-38 세포에 48시간 동안 처리한 후, 세포성장 억제효과를 MTT 분석으로 측정하였다.

YD-38 세포에 miR-203을 0에서 200ng/ml까지의 다양한 농도로 48시간 동안 투여한 후 MTT 검사를 시행한 결과, miR-203 0.2에서 6ng/ml까지의 농도에서는 vector만 처리한 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제의 차이를 볼 수 없었으며, 20ng/ml에서는 대조군과 비교하여 세포성장 억제경향은 확인할 수 있었으나 통계적 의의는 없었다(Fig. 4). 그러나 miR-203 60과 200ng/ml에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 YD-38 세포성장 억제효과를 볼 수 있었으며, 이 효과는 농도에 의존적임을 확인할 수 있었다(Fig. 4). MiR-125a의 경우에는 0.2에서 20ng/ml까지의 농도에서는 vector만 처리한 대조군과 비교하였을 때 세포성장 억제의 차이를 볼 수 없었으며, 60ng/ml에서는 대조군과 비교하여 세포성장 억제경향은 확인할 수 있었으나 통계적 의의는 없었다(Fig. 5). 그러나 miR-125a 200ng/ml에서는 대조군과 비교하여 볼 때 뚜렷한 YD-38 세포성장 억제효과를 볼 수 있었다(Fig. 5).

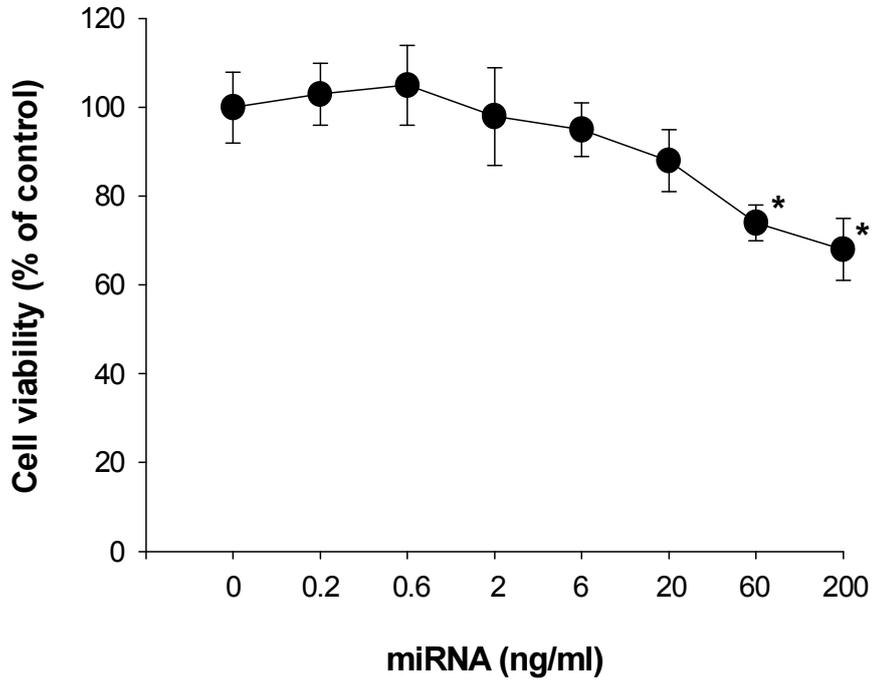


Fig. 4. The effect of miR-203 on the cell viability in YD-38 cells. The YD-38 cells were treated with various concentrations of miR-203 or without miR-203 for 48 hours. The cell viabilities were determined by the MTT assays. The percentage of cell viability was calculated as a ratio of $A_{570\text{nm}}$ of miR-203 treated cells and untreated control cells. Each data point represents the mean \pm SEM of four experiments. * $P < 0.05$ vs. control (the control cells measured in the absence of miR-203).

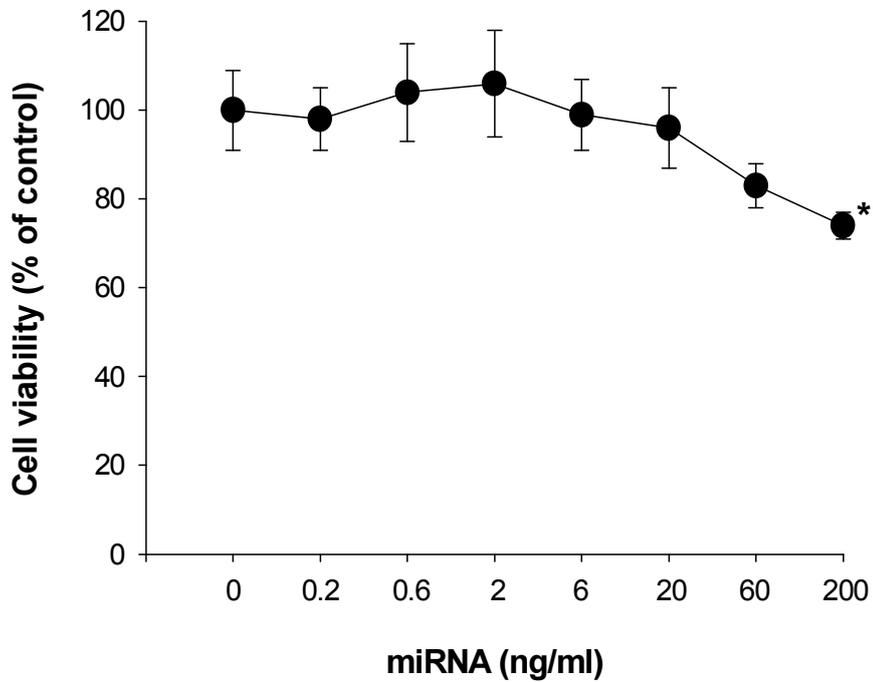


Fig. 5. The effect of miR-125a on the cell viability in YD-38 cells. The YD-38 cells were treated with various concentrations of miR-125a or without miR-125a for 48 hours. The cell viabilities were determined by the MTT assays. Other legends are the same as in Fig. 4.

IV. 총괄 및 고안

게놈프로젝트 수행 전, 많은 과학자들은 인체의 복잡한 기능을 정상적으로 수행하기 위해서는 사람 유전자 수가 적어도 10만개는 될 것으로 예측하였다. 그러나 게놈프로젝트 완결 후 밝혀진 사람의 유전자 수는 약 25,000개에 불과하였으며, 이는 꼬마선충(*C. elegans*)의 유전자 수 약 20,000개와 크게 차이하지 않았다(Novik et al., 2002). 원시적 작은 벌레의 유전자 수와 별다른 차이가 없는 사람의 유전자 수로는 인체의 복잡하고 다양한 특성을 설명할 수 없기 때문에 과학자들은 인체의 특성을 설명하기 위해 유전자 이외의 다른 조절기전에 주목하기 시작하였으며, 이로 인한 후생유전(epigenetics)이라는 학문이 발전하게 되었다(Callinan and Feinberg, 2006; Esteller, 2006). 후생유전이란 DNA 염기서열 변화 없이 DNA를 둘러싼 여러 요인들의 변화로 유전자가 조절되는 것을 말하고, 후생유전의 구성요소에는 염색질 변형(chromatin modification), DNA 메틸화(DNA methylation) 및 RNA 간섭(RNA interference) 등이 있으며, 이들 세 요소들이 각기 다른 역할도 하지만 서로 밀접하게 관련되어 표적유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다(Callinan and Feinberg, 2006; Esteller, 2006).

최근 miRNA 발현변화가 종양의 시작과 진행단계에서 매우 중요하다는 실험결과가 발표되고 있으며, 종양에서 miRNA의 비정상적인 발현은 염색체 결손, 증폭, point mutation과 같은 유전적인 원인 또는 비정상적인 DNA 메틸화 등과 같은 후생유전에 의한 것으로 보고되고 있다(Hardy and Tollefsbol, 2011; Lorincz, 2011). 종양과 관련된 이러한 miRNA 연구결과들은, miRNA가 암의 형성, 진행 및 전이에 암 억제인자로서 매우 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 암의 진단이나 예후를 예측하는 중요한 생물학적 마커로 사용될 수 있다는 것을 시사하고 있다(Hardy and Tollefsbol, 2011; Lorincz, 2011). 따라서 본 연구에서는 구강암세포에서 특이 miRNA를 확립하고 그

miRNA의 제어에 따른 구강암세포의 성장과 증식에 대한 기능적 정보를 축적하여 이를 구강암세포 성장억제와 구강암 치료를 위한 적용을 위하여, 정상 사람 구강각화세포(NHOK)와 한국인에서 유래한 구강암세포주 YD-38에서 miRNA의 발현을 비교·분석하여 구강암 특이 miRNA를 확립하고자 하였다.

NHOK와 YD-38 세포에서 miRNA 발현양상을 비교하기 위한 microarray 분석결과, NHOK와 비교하여 구강암세포주인 YD-38에서 가장 크게 증가한 miRNA는 miR-30a와 miR-1246이었으며, 가장 크게 감소한 miRNA는 miR-203과 miR-125a이었다(Fig. 2). MiRNA microarray 결과를 정량 PCR 분석으로 재확인한 결과, miR-30a와 miR-1246은 NHOK에 비해 YD-38에서 그 발현이 각각 약 74배와 53배 증가하였고, miR-203과 miR-125a는 그 발현이 각각 약 8배와 3배 감소하였으며, 정량 PCR에 의한 miRNA 발현분석 결과와 miRNA microarray 분석결과가 유사함을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이는 정상과 두경부암에서 다양한 방법을 통해 miRNA 발현양상을 비교하여 miR-30a는 두경부암에서 그 발현이 증가하였고 miR-203은 그 발현이 감소하였다는 Liu 등(2009)의 연구결과와 일치하였으나, 본 연구에서 발현차이를 보였던 miR-1246과 miR-125a는 그 발현차이가 없었으며(Liu et al., 2009), 이는 분석방법의 차이와 세포유래의 차이에서 오는 결과라 생각된다. 본 연구의 miRNA microarray와 정량 PCR 결과는, 구강암세포에서 증가한 miRNA와 감소한 miRNA가 암세포 성장에 대한 특이적인 역할을 지닐 수 있음을 시사한다.

본 연구에서 miRNA에 의한 암세포 성장 억제효과를 조사하기 위한 MTT 분석에서, YD-38 구강암세포에서 그 발현이 감소했던 miR-203과 miR-125a는 YD-38 세포의 성장을 뚜렷이 억제시켰다(Fig. 4와 5). 이는 대장암세포에서 miR-203의 발현이 감소하고 miR-203이 대장암세포의 성장을 억제시킨다는 Li 등(2011)의 연구결과와, 위암세포에서 miR-125a의 발현이 감소하고 miR-125a가 위암세포의 성장을 억제시킨다는 Nishida 등(2011)의 연구결과와 일치하였다(Li et al., 2011; Nishida et al., 2011). 이러

한 결과들은 구강암세포에서 miR-203과 miR-125a가 암세포 성장억제에 대한 특이적인 효과를 가지고 있다는 것을 시사하며, 또한 구강암 치료의 표적으로서 이들 miRNA의 잠재적인 가치를 시사하고 있다.

그러나 본 연구에서 실험에 이용한 구강암 세포 등 표본들의 수에는 한계가 있었으며, 이들 miRNA가 유도하는 구강암세포 성장억제에 관한 표적 유전자 분석 등 세포 및 분자적 기전연구는 더 추구하고야 할 과제로 생각된다. 본 연구의 대상이 되는 miRNA는 다른 유전자 조절 메커니즘에 비해 최근에 밝혀지고 있지만, 그 작용기전과 표적하는 유전자가 최근 들어 많이 연구되고 그 기능 연구 또한 매우 활발히 진행되고 있다(Gomes and Gomez, 2008; Liu et al., 2009; Majid et al., 2010; Li et al., 2011; Nishida et al., 2011). 이러한 miRNA에 의한 유전자 발현조절은 향후 매우 중요한 유전자 조절 방식의 하나로 자리매김할 것으로 여겨지고 있다. 특히 구강암에서 특이 miRNA를 확립하여 miRNA 제어에 따른 구강암세포의 성장과 증식에 대한 기능적 정보를 규명한다면, 구강암에서 표적 miRNA를 생물학적 표지자로의 사용도 가능할 것이며, 궁극적으로 이 miRNA를 이용한 항암물질, 유전자 치료법 및 구강암 진단키트를 개발하여 구강암 치료의 새로운 전략도 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 사람 구강암세포 YD-38에서 miR-203과 miR-125a는 정상 사람 구강각화세포 NHOK에서보다 그 발현이 크게 감소하였고 miR-203과 miR-125a는 YD-38 세포의 성장을 뚜렷이 억제시켰다. 또한 본 연구의 결과로 이들 miRNA를 이용한 구강암 세포 성장억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

miRNA는 21-25개 염기의 작은 noncoding RNA 분자이며, 주로 표적 유전자의 3'-UTR 결합부위에 상보적인 염기서열을 가지면서 그 표적유전자의 단백질합성을 억제시키거나 촉진시킨다. 또한 miRNA는 진핵세포 내에서 다양한 유전자를 조절함으로써 세포분화, 성장 및 증식 등 대부분의 생명현상에 관여하며, 특히 악성종양에서 특이적인 발현양상을 보여 종양유전자 혹은 종양억제자로서 발암과정에 다양하게 관여한다. 본 연구에서는 정상 구강세포와 구강암세포에서 miRNA들의 발현을 비교·분석하여 구강암 특이 miRNA를 확립하기 위해, 정상 사람 구강각화세포 NHOK와 한국인에서 유래한 구강암세포주 YD-38에서 세포배양, miRNA 추출, miRNA microarray 분석, 정량 PCR 분석, vector 제작 및 세포성장 억제실험을 시행하였다.

NHOK와 YD-38 세포에서 microarray 분석으로 총 1,769개의 miRNA를 비교·분석한 결과, YD-38에서 40개의 miRNA가 발현이 증가하였으며 31개의 miRNA가 발현이 감소하였다. 특이적으로 10배 이상 발현이 증가한 miRNA는 miR-30a, miR-1246, miR-720 및 miR-934이었으며, 10배 이상 감소한 miRNA는 miR-203, miR-125a, miR-132, miR-UL70-3p 및 miR-1228이었다. 정량 PCR 결과, miR-30a는 YD-38에서 그 발현이 약 74배 증가하였으며 miR-1246은 약 53배 증가하였다. miR-203은 YD-38에서 그 발현이 약 8배 감소하였고 miR-125a는 약 3배 감소하였다. YD-38 세포에서 miR-203과 miR-125a는 세포의 성장을 뚜렷이 억제시켰다.

본 연구의 결과로서 miR-203과 miR-125a는 사람 구강암세포 YD-38에서 정상 사람 구강각화세포에서보다 그 발현이 크게 감소하였고, YD-38 세포의 성장을 뚜렷이 억제시킴을 알 수 있었으며, 본 연구의 결과로 이들 miRNA를 이용한 구강암 세포 성장억제에 관한 하나의 방향을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 참고 문헌

- Albinsson S, Sessa WC. Can microRNAs control vascular smooth muscle phenotypic modulation and the response to injury? *Physiol Genomics*. 2011;43:529-33.
- Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001;107:823-6.
- Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol*. 2006;33:167-73.
- Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet*. 2006;15:R95-101.
- Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immunol*. 2005;17:155-65.
- Chen PS, Su JL, Cha ST, Tarn WY, Wang MY, Hsu HC, Lin MT, Chu CY, Hua KT, Chen CN, Kuo TC, Chang KJ, Hsiao M, Chang YW, Chen JS, Yang PC, Kuo ML. miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. *J Clin Invest*. 2011;121:3442-55.

Cho WC. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*. 2007;6:60–6.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:13944–9.

Dostie J, Dreyfuss G. Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol*. 2002;12:1060–7.

Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 2006;27:1121–5.

Gomes CC, Gomez RS. MicroRNA and oral cancer: future perspectives. *Oral Oncol*. 2008;44:910–4.

Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics*. 2011;3:503–18.

Hermeking H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2010;17:193–9.

Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A

cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science*. 2001;293:834-8.

Kataoka N, Diem MD, Kim VN, Yong J, Dreyfuss G. Magoh, a human homolog of *Drosophila mago nashi* protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. *EMBO J*. 2001;20:6424-33.

Kim VN, Kataoka N, Dreyfuss G. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science*. 2001;293:1832-6.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294:853-8.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002;12:735-9.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-54.

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294:862-4.

- Li J, Chen Y, Zhao J, Kong F, Zhang Y. miR-203 reverses chemoresistance in p53-mutated colon cancer cells through downregulation of Akt2 expression. *Cancer Lett.* 2011;304:52-9.
- Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics.* 2009;837514:1-11.
- Lorincz AT. The Promise and the Problems of Epigenetics Biomarkers in Cancer. *Expert Opin Med Diagn.* 2011;5:375-9.
- Majid S, Dar AA, Saini S, Yamamura S, Hirata H, Tanaka Y, Deng G, Dahiya R. MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer.* 2010;116:5637-49.
- Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:15228-33.
- Meister J, Schmidt MH. miR-126 and miR-126*: new players in cancer. *Scientific World Journal.* 2010;10:2090-100.
- Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing

numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002;16:720-8.

Nervi C, Fazi F, Rosa A, Fatica A, Bozzoni I. Emerging role for microRNAs in acute promyelocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2007;313:73-84.

Nishida N, Mimori K, Fabbri M, Yokobori T, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Ishii H, Doki Y, Mori M. MicroRNA-125a-5p is an independent prognostic factor in gastric cancer and inhibits the proliferation of human gastric cancer cells in combination with trastuzumab. *Clin Cancer Res.* 2011;17:2725-33.

Notani PN. Epidemiology and prevention of head and neck cancer: A Global View. In: Saranath D, editor. *Contemporary Issues in Oral Cancer.* Oxford University Press 2000. pp. 1-29.

Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol.* 2002;4:111-28.

Osada H, Takahashi T. let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer Sci.* 2011;102:9-17.

Pan X, Wang ZX, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer. *Cancer Biol Ther.* 2011;10:1224-32.

Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, Berger EM, Ambros V. The expression of the let-7 small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*. 2002;244:170-9.

Tili E, Croce CM, Michaille JJ. miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *Int Rev Immunol*. 2009;28:264-84.

Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55:613-23.

Urbich C, Kuehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008;79:581-8.