



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.


이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위 논문

한국인 전신 홍반 루푸스와 연관된

microRNA의 동정

The logo of Ajou University is a large, faint watermark in the background. It is circular with the Korean text '아주대학교' at the top and 'AJOU UNIVERSITY' at the bottom. In the center is a stylized flame or leaf-like symbol, and the year '1973' is written below it.

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

김봉식

한국인 전신 홍반 루푸스와 연관된
microRNA의 동정

지도교수 서 창 희

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2014년 2월

아주대학교 대학원
의생명과학과/분자의학전공

김 봉 식

김봉식의 이학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 박 선 인

심사위원 서 창 희 인

심사위원 정 선 용 인

아주대학교 대학원

2013년 12월 13일

한국인 전신 홍반 루푸스와 연관된 microRNA의 동정

목적 : 전신 홍반 루푸스는 잘 알려진 전신적인 자가 면역 질환이며, 현재까지 연구에 의하면 유전적 소인이 중요한 역할을 할 것으로 추측하고 있으나, 구체적으로 어떠한 유전자가 어떠한 기전으로 발병에 관여하는 지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다. 특히 기존의 연구들은 거의 서양인을 대상으로 한 연구인데, 인종에 따라 유전자의 발병에서의 역할에 차이가 있을 수 있고, 한국인 전신 홍반 루푸스의 발병에 관여하는 유전자는 서양인과 다를 수 있으므로 한국인을 대상으로 한 유전자 연구가 매우 필요하다고 할 수 있겠다. 최근 microRNA (miRNA)가 전신 홍반 루푸스 질환에 관여한다는 보고가 있다. 하지만 인종에 따라 병인에서의 miRNA 역할에 차이가 있을 수 있고, 한국인 전신 홍반 루푸스의 병인에 관여하는 miRNA는 서양인과 다를 수 있으므로 한국인을 대상으로 한 miRNA 연구가 매우 필요하다고 생각 된다. 이에 본 연구자는 miRNA가 전신 홍반 루푸스의 발병에 중요한 역할을 할 것이라는 사실을 가정으로 한국인 전신 홍반 루푸스 환자에서 miRNA의 특성에 대해서 밝히고자 한다.

재료 및 방법 : 아주대학교병원 류마티스 내과에서 진단받은 한국인 전신 홍반 루푸스 환자 70명과 정상 대조군 40명을 연구대상자로 선정하였다. 전신 홍반 루푸스 환자 70명의 평균 나이는 33.5 ± 7.3 세, 정상 대조군 40명의 평균 나이는 33.1 ± 6.3 세로 전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군은 비슷하고, 여성의 비율도 전신 홍반 루푸스 환자에서 90%, 정상 대조군에서 90%로 전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군의 비율도 같았다. 환자에서 수집한 혈액의 말초혈액단핵세포에서 total RNA를 추출하여 microarray를 진행하였고, 혈장에서 total RNA를 추출하여 cDNA를 합성하여 실험 재료로 사용하였다. miRNA PCR array를 통하여 후보 miRNA를 선별하고, quantitative real-time polymerase chain reaction

(PCR) 방법으로 후보 miRNA의 발현량을 분석하였다.

결과 : 전신 홍반 루푸스 환자와 정상대조군의 혈장으로부터 4개의 후보 miRNA의 발현량을 통계적으로 비교해 보았을 때, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p 2개의 miRNA는 유의한 결과를 보이지 않았고, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p 2개의 miRNA에서는 p value가 각 0.046, 0.048로 발현량이 전신 홍반 루푸스에서 유의하게 발현증가 되어있는 것을 확인하였다. 전신 홍반 루푸스 환자에 있어서 miRNA와 여러 임상적 특징과의 상관관계를 분석하여, hsa-miR-223-3p에서 구강궤양과 루푸스항응고인자 양성률에서 유의한 결과를 나타내었다.

결론 : 한국인에서 전신 홍반 루푸스에서의 miRNA의 발현을 정상 대조군과 비교를 해 보았을 때, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p 이 2개의 miRNA가 통계적으로 유의하게 과 발현 되어있는 것을 확인 할 수 있었고, 이 2개의 혈장 miRNA가 전신 홍반 루푸스의 생물학적 표지자로서의 사용가능성이 있을 것이라고 생각되어진다.

핵심어: 전신 홍반 루푸스, 혈장, miRNA, 생물학적 표지자

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	v
표 차례	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
A. 대상 환자군과 대조군의 선별 및 채혈	4
1. 대상 환자군과 대조군	4
2. 환자군과 대조군으로부터 채혈 및 보관	4
B. RNA 추출 및 준비	4
1. 말초혈액단핵세포에서 total RNA 추출	4
2. 혈장으로부터 total RNA 추출	5
3. cDNA 합성	5
4. RNA 농도 확인	6
C. Microarray	6
1. Microarray	6
2. Target miRNA 선별	6
D. 혈장에서의 miRNA 발현량 검정 및 후보 miRNA 선별 과 발현량 확인	6
1. has-miR-16-5p의 발현량 안전성 확인	6
2. miRNA PCR array	6
3. 후보 miRNA 선별	7
4. miRNA quantitative real-time polymerase chain reaction	7
E. 통계분석	7
III. 결과	8

A. 전신 홍반 루푸스 환자군과 정상 대조군의 임상적 특징	8
B. 말초혈액단핵세포에서의 전신 홍반 루푸스 환자군과 정상 대조군의 miRNA 프로파일링	10
1. miRNA 선별	10
C. 전신 홍반 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 miR-16의 발현량 안정성 확인	12
D. miRNA PCR array	13
E. 전신 홍반 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 혈장 miRNA의 발현량 확인	14
F. 전신 홍반 루푸스 환자군의 miRNA와 임상적 특징과의 상관관계	16
IV. 고찰	18
V. 결론	23
참고문헌	24
ABSTRACT	32

그림 차례

Fig. 1. PBMC microRNAs profiling using microarray	10
Fig. 2. miR-16 level is stable in plasma of both normal controls and SLE patients	12
Fig. 3. The expression levels of miR-16	13
Fig. 4. Relative plasma microRNA expression levels normalized by hsa-miR-16	15

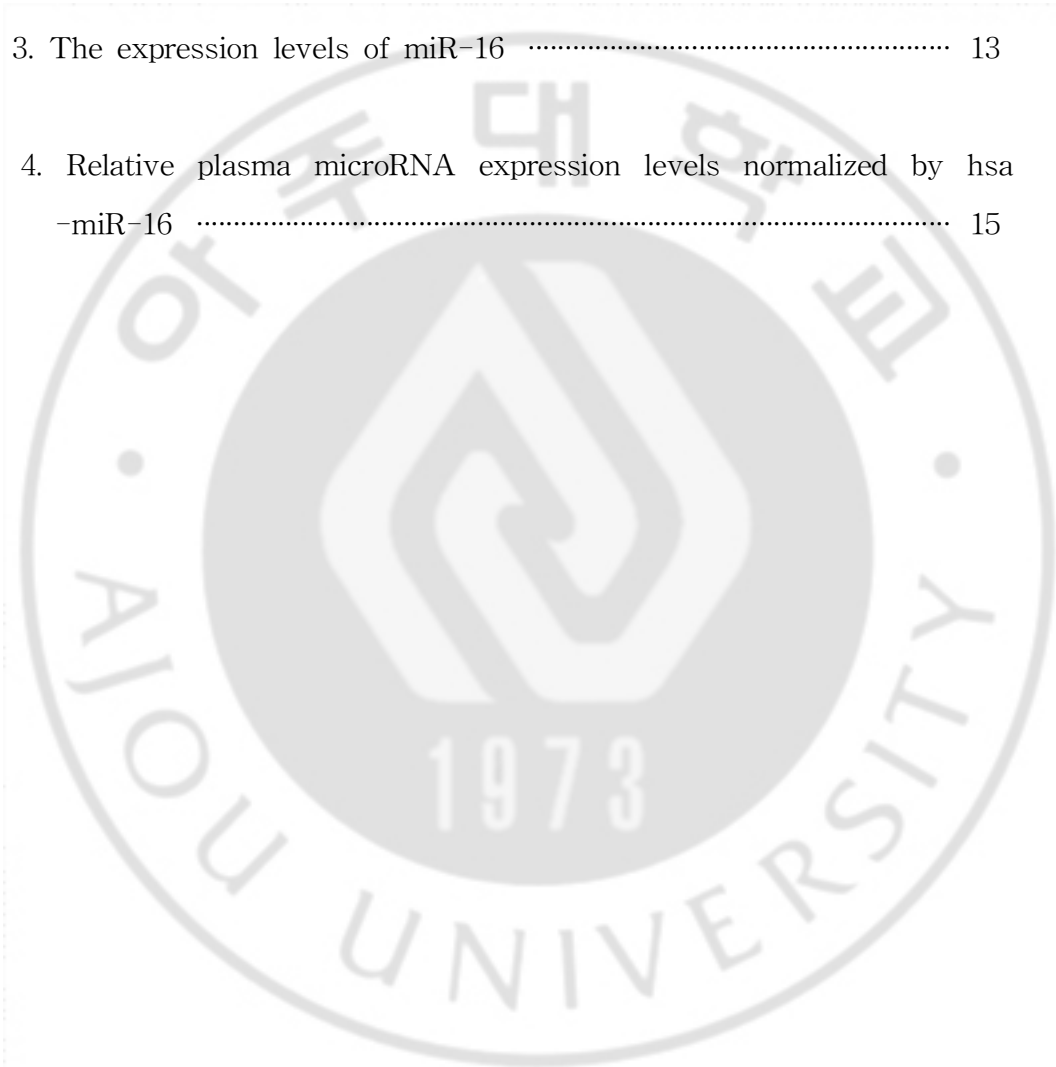


표 차례

Table 1. Comparison of the clinical characteristics of the study subjects	9
Table 2. PBMC microRNAs expression levels in SLE patients compared to normal controls	11
Table 3. Circulating plasma microRNA expression levels in SLE patients compared to normal controls by miRNA PCR array	14
Table 4. Comparison of the clinical characteristics according to the microRNAs	17

I. 서 론

전신 홍반 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE)는 면역학적 관용의 소실에 의해 다양한 자가 항체를 생성하는 비정상적인 면역반응에 의해 유도되는 만성적인 염증에 의해서 여러 조직 특히 피부, 관절, 혈액, 신장 등이 파괴되는 임상적 특성을 동반하는 전신적인 자가 면역 질환이다.

전신 홍반 루푸스는 주로 15세에서 40세의 가임기 여성에서 발병하고, 유병율은 남성보다 여성이 8 ~ 13배 정도 높으나 소아에서나 폐경기의 여성에서는 남성보다 2배정도로 높은 양상을 보인다. 인종적으로는 동양인과 흑인에서의 빈도가 백인에서의 빈도보다 좀 더 높은 것으로 보고되고 있다(Lipsky, 2001; Tsokos, 2011).

전신 홍반 루푸스의 정확한 원인 및 발병 기전은 아직 잘 밝혀지지 않았으나, 전신 홍반 루푸스의 원인으로 유전적인 요인을 살펴보면, 전신 홍반 루푸스 환자의 10% 이내에서 환자의 가족이 전신 홍반 루푸스를 이미 앓고 있거나 앞으로 발병할 가능성이 있는 것으로 알려져 있고, 전신 홍반 루푸스가 일란성 쌍둥이에서 24%의 빈도로, 이란성 쌍둥이에서 2%의 빈도로 발생한다는 보고가 있으며, 이러한 연구 결과는 전신 홍반 루푸스의 다유전자 유전을 뒷받침하고 있다. 또한 어떤 유전적 소인을 가지고 있는 사람에서 감염, 자외선, 호르몬, 약물 등의 환경적인 요인의 작용에 의해 이상 면역 반응을 나타내어 자가 항체를 생성하고 혈중 면역 복합체를 형성하여 다양한 장기를 침범하는 것으로 생각되어 지고 있다(Robson과 Walport, 2001; Marshall, 2002; Mok와 Lau, 2003).

microRNA (miRNA)는 약 22개의 염기서열로 이루어진 짧은 non-coding RNA로 유전자의 발현과정에 전사 후 조절 인자로서 기능을 한다고 알려져 있다. 이들은 상보적인 염기 서열을 가진 표적 mRNA의 3' untranslated region (3'UTRs)에 상보적으로 결합함으로써 표적 mRNA들을 분해시키거나 단백질로 번역되는 것을 억제 하고, 면역 반응 형성에 영향을 끼친다고 알려져 있다. 또한 small non-coding RNA는 DNA damage 반응의 조절에 관여 하고 있다(Francia,

2012). 현재, 2578개의 mature human miRNA의 염기서열이 등록 되어있다 (Sanger miRBase release 20; <http://www.mirbase.org/>).

1993년에 첫 번째 miRNA인 Lin-4가 선충류인 *Caenorhabditis elegans*에서 발견되었지만, 이 miRNA는 DNA의 mRNA 전사과정에서 발생하는 부산물쯤으로 생각되어졌다. 2000년에 같은 선충에서 인간과 상동성을 가지는 첫 번째 miRNA, Let-7이 발견이 되어 그 실체를 인정받게 되었고, 2001년에 Ambros가 처음으로 이를 miRNA라고 명명하였다. 그 후에 miRNA가 전사 후 및 번역 후 단계에서 사실상 모든 진핵세포의 유전자 발현 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Lee, 1993; Reinhart, 2000).

21-22 nucleotide 길이의 mature miRNA는 70-100 nucleotide 길이의 pre-miRNA로부터 만들어지는데 이는 헤어핀(hairpin) 모양의 구조로 되어 있고, 각각의 arm에 mature miRNA가 존재한다. pre-miRNA는 RanGTP/exportin 5에 의해 세포의 핵에서 세포질로 운반되고, 세포질에서 ribonuclease III-like nuclease에 의해 분해되어 mature miRNA가 된다. mature miRNA는 RNA-induced silencing complex (RISC)라 불리는 ribonucleoprotein complex와 결합한다. 이 RISC complex는 miRNA와 상보적인 혹은 부분적으로 상보적인 표적 mRNA로 유도되어 결합하게 되고 RISC는 mRNA를 분해하거나 번역을 억제하여 miRNA가 유전자 발현을 조절하게 된다(Lodish, 2008).

또 다른 흥미로운 발견은 일부 바이러스가 miRNA 생성에 의한 숙주의 기전을 이용해 숙주의 면역을 극복한다는 것이다. 예를 들어 바이러스 miRNA miR-LAT는 TGF- β 신호 조절에 의한 세포 사멸에 저항성을 가지게 함으로써, 감각신경에 잠복 형태로 herpes simplex virus (HSV)의 지속성을 가지게 한다 (Gupta, 2006).

miRNA는 악성종양과 자가면역(류마티스 관절염, 다발성 경화증, 건선, 염증성 장 질환)에도 역할을 하고 있다(Millington, 2008; Dalal, 2010; Junker, 2011; Wittmann, 2011).

miRNAs는 유전자 발현을 조절 하는 세포 내 RNA 역할을 하는 것으로

간주 되었다. 그러나 miRNA가 혈액에서 매우 안정적이며 동결 / 해동 주기를 반복해도 견딜 수 있는 것을 보여 주었다(Chen, 2008; Fichtlscherer, 2010). 그것은 miRNA가 RNase 소화에 저항력이 있는 막 결합성 소포 내에 순환되어 있다는 것이 발견되어졌고, 생물학적 표지자로서도 사용 가능하다는 것을 알려주고 있다.

또한 몇 년 전, miRNA는 내인성 RNase의 활성으로부터 보호되어 매우 안정적인 형태로 혈장에 존재하는 것을 알 수가 있었다. 또한, miRNA는 혈청이나 혈장뿐만 아니라 요, 타액, 눈물, 척수액, 흉강 및 복강액 등 신체 내 모든 체액에서 발견되었고, 특정 체액에 특이한 miRNA가 주위 조직과 관련되어 어떤 역할을 수행할 수 있다고 알려졌다. 따라서 특이 miRNA 농도는 여러가지 질병을 진단하고 모니터링하는 생물학적 표지자로도 활용할 수도 있다는 가능성 때문에 활발한 연구가 진행중이다(Mitchell, 2008; Murata, 2010; Weber, 2010; Liu, 2012; Schrauder, 2012).

전신 홍반 루푸스에서 miRNA의 대한 연구는 중국에서 처음 연구가 되었는데, 중국인에서 전신 홍반 루푸스 환자 23명, 특발성 혈소판 감소성 자반증 환자 10명, 정상 대조군 10명을 대상으로 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)로부터 miRNA의 발현량 차이를 확인하여 저발현 되는 miRNA 7개와 발현증가되는 miRNA 9개를 확인하였다(Dai, 2007). 이후에도 중국인 전신 홍반 루푸스 환자 에서의 miRNA에 대한 많은 연구가 보고되어지고 있고, 유럽이나 다른 아시아 국가에서의 연구는 거의 보고된 바 없다(Frangou, 2013).

뿐만 아니라 한국인 전신 홍반 루푸스에서도 miRNA에 대한 연구는 아직 보고 된 바 없기 때문에 본 연구자는 석사학위를 통해 한국인 전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군간의 비교에서 유의한 차이를 보이는 miRNA를 밝히고 이 miRNA가 한국인 전신 홍반 루푸스의 병인기전에 어떤 특성을 가지는지에 대해서 연구를 시행하고자 한다.

II. 재료 및 방법

A. 대상환자군과 대조군의 선별 및 채혈

1. 대상 환자군과 대조군

대상 환자군으로는 미국 류마티스 학회에서 1982년에 개정된 전신 홍반 루푸스의 진단기준을 최소한 4가지 이상 만족하는 한국인 전신 홍반 루푸스 환자 70명을 선별하여 환자의 임상적 특징을 표준화된 양식에 따라 파악하여 데이터베이스화하여 보관하고 있으며, 대조군(normal control, NC)으로 류마티스 질환의 기왕력이 없는 정상인 40명을 설문 검사를 통하여 선별하였다. 이 연구는 아주대학교 병원 Institutional Review Board (IRB)의 승인을 받은 후 모든 연구 대상자에게 동의를 받은 후 진행하였다.

2. 환자군과 대조군으로부터 채혈 및 보관

대상 환자 및 정상 대조군들의 채혈은 연구 목적에 대한 설명 및 동의를 구한 후에 시행하였으며, 채취한 전혈(whole blood)로부터 혈장(plasma)을 분리한 후 영하 80℃ 에 보관하였다.

B. RNA 추출 및 준비

1. 말초혈액단핵세포에서 total RNA 추출

전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군의 전혈로부터 Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, NJ, USA)를 사용하여 miRNA를 분리하였다. 전혈과 PBS (phosphate buffered saline)를 1:1 비율로 섞어주어 다시 1:1 비율로 Ficoll-Paque Plus위에 섞이지 않게 쌓아주었다. 1500 rpm으로 30분간 18-20 °C로 원심분리 하여 준 뒤 버피코트(buffy coat)를 분리하였다. 분리한 버피코트를 miRNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 total RNA를 분리하였다. 버피코트에 QIAzol 700 μ l를 섞어주어 5분간 실온에 놔두어 핵단백질을 해리 시켰고, 클로로포름 140 μ l를 섞어준 뒤 실온에서 2-3분간 반응시킨 뒤

12,000 g로 4 °C에서 15분간 원심분리 시켜주었다. 그 뒤 맑은 상층액만을 사용하여 1.5배의 에탄올을 섞어주어 RNeasy mini spin column을 이용해 8,000 g로 15-25 °C에서 15초간 원심분리 하고, 차례대로 700 μ l의 완충용액(buffer) RWT와 500 μ l의 완충용액 RPE를 똑같이 원심분리 하였다. 마지막으로 RNase-free water로 1분간 8,000 g로 원심분리 하여 total RNA를 분리하여 영하 80 °C에 보관하였다.

2. 혈장으로부터 total RNA 추출

전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군의 혈장으로부터 miRNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 total RNA를 분리 하였다. 혈장 200 μ l에 QIAzol 700 μ l를 섞어주어 5분간 실온에 반응 시켜 핵단백질을 해리 시켰고, 클로로포름 140 μ l를 섞은 후 실온에서 2-3분간 반응 시킨 뒤 12,000 g로 4 °C에서 15분간 원심분리 하였다. 그 뒤 맑은 상층 액 만을 사용하여 1.5배의 에탄올(ethanol)을 섞어주어 RNeasy mini spin column을 이용해 8,000 g로 15-25 °C에서 15초간 원심분리 하고, 차례대로 700 μ l의 완충용액 RWT와 500 μ l의 완충용액 RPE를 똑같이 원심분리 하였다. 마지막으로 리보뉴클레아제 자유수(RNase-free water)로 1분간 8,000 g로 원심분리 하여 total RNA를 분리하여 영하 80 °C에 보관하였다.

3. cDNA 합성

혈장으로부터 분리한 total RNA를 miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 reverse transcription을 통해 cDNA를 합성하였다. Total RNA를 5x miScript HiSpec Buffer 4 μ l, 10x Nucleics Mix 2 μ l, RNase-free water 10 μ l, miScript Reverse Transcriptase Mix 2 μ l, template RNA 2 μ l을 섞어준 뒤 37 °C에서 60분, 95 °C에서 5분간 중합효소연쇄반응을 시행하여 cDNA를 합성하였다.

4. RNA 농도 확인

모든 RNA는 nanodrop lite spectrophotometer (Thermo, MA, USA)을 이용하여 농도를 확인 하였다.

C. Microarray

1. Microarray

말초혈액단핵세포에서 분리한 total RNA를 이용하여 전신 홍반 루푸스 환자 5명과 정상 대조군 8명의 RNA를 각 그룹으로 풀링(pooling)하여 microarray를 실시하였다(Genochek Co., Ansan, Korea). 실험에는 GeneChip® miRNA 2.0 Array (Affymetrix, CA, USA)를 사용하였다.

2. Target miRNA 선별

Microarray 결과를 바탕으로 fold change값이 2 이상인 miRNA를 선별하였다.

D. 혈장에서의 miRNA 발현량 검정 및 후보 miRNA 선별과 발현량 확인

1. hsa-miR-16-5p의 발현량 안전성 확인

hsa-miR-16-5p가 안정적으로 혈장에 존재하는지 알아보기 위해 전신 홍반 루푸스와 정상 대조군간의 hsa-miR-16-5p의 발현량을 비교해보고, 추가로 *C. elegans*의 miRNA인 cel-miR-39를 total RNA 추출 과정에서 넣어 준 뒤, cDNA로 합성 후, quantitative real-time PCR을 하여 cel-miR-39로 hsa-miR-16-5p를 normalization 하여 발현량을 확인하였다.

2. miRNA PCR Array

합성한 cDNA를 이용하여 전신 홍반 루푸스 환자 10명과 정상 대조군 10명의 sample을 각 그룹으로 풀링 하여 miRNA PCR array를 실시하였다. 실험에는 miScript® miRNA PCR Array Human Serum & Plasma: MIHS-106Z

(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였다.

3. 후보 miRNA 선별

miRNA PCR array 결과를 바탕으로 fold change값(≥ 1.5 fold change)으로 후보 miRNA를 선별 하였다.

4. miRNA quantitative real-time polymerase chain reaction

전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군을 대상으로 각각 70명, 40명씩 혈장에서 분리된 total RNA를 가지고 miScript II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 사용하여 Reverse Transcription을 하여 cDNA를 합성하였고, QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)으로 ABI PRISM® 7000 (Applied Biosystems, CA, USA)을 이용해 quantitative real-time PCR을 실시하여 발현량 차이를 확인하였다.

(A) 후보 miRNA

hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p 의 primer (Qiagen)를 사용하여 quantitative real-time PCR을 진행하였다.

(B) 각 miRNA의 발현량 확인은 hsa-miR-16-5p를 이용하여 normalization 하였다.

E. 통계분석

전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군 간에 miRNA 발현에 따른 fold-change값은 널리 사용되는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 구하였고, ANOVA test와 *t*-test로 분석하여 *p* 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

miRNA 발현에 따른 전신 홍반 루푸스의 발병, 임상양상, 검사 수치 등을 ANOVA test와 *t*-test로 분석하여 서로간의 상관관계를 밝히고, 연구 결과의 통계학적 분석은 SPSS version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) 프로그램을 사용하여 *p* 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

Ⅲ. 결 과

A. 전신 홍반 루푸스 환자군과 정상 대조군의 임상적 특징

전신 홍반 루푸스의 환자군 70명의 평균 나이는 33.5 ± 7.3 세, 정상 대조군 40명의 평균 나이는 33.1 ± 6.3 세, 전신 홍반 루푸스 환자의 비율은 여성 63명(90%), 남성 7명(10%), 정상 대조군의 비율 또한 여성 36명(90%), 남성 4명(10%)으로 두 군 모두 약 9:1의 성비를 나타내었다. 전신 홍반 루푸스 환자군의 호소하는 증상 및 검사 소견에서 구강궤양(oral ulcer)은 13례(18.6%), 관절염(arthritis)은 35례(50.0%), 발진(rash)은 20례(28.6%), 신장염(nephritis)은 27례(38.6%), 백혈구감소증(leukopenia)은 18례(25.7%), 림프구감소증(lymphopenia)은 15례(21.4%), 혈소판감소증(thrombocytopenia)은 4례(5.7%), anti-dsDNA는 45례(64.3%), anticardiolipin 항체는 16례(22.9%), 감광성은 7례(10.0%), 신경계 손상은 2례(2.9%) 있었으며, C3에서는 43례(61.4%), C4에서는 16례(22.9%)가 감소하였고, 항핵항체(antinuclear antibody, ANA)는 70례(100.0%), 루푸스 항응고인자(lupus anticoagulant, LAC)는 12례(17.1%), C반응 단백(C-reactive protein, CRP)는 23례(32.8%), 적혈구 침강속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR)은 34례(48.6%)에서 양성을 보였고, SLE disease activity index (SLEDAI) 점수는 6 ± 3 으로 나타내어 졌다(Table 1).

Table 1. Comparison of the clinical characteristics of the study subject

Characteristics	SLE	NC	SLE vs. NC
	N=70 (%)	N=40 (%)	<i>p</i> value
Age (year)*	33.5 ± 7.3	33.1 ± 6.3	0.921
SEX Male	7 (10%)	4 (10%)	1
Female	63 (90%)	36 (90%)	
Oralulcer [§]	13 (18.5%)	NA	NA
Arthritis [§]	35 (50%)	NA	NA
Rash [§]	20 (28.6%)	NA	NA
Nephritis [§]	27 (38.6%)	NA	NA
Leukopenia [§]	18 (25.7%)	NA	NA
Lymphopenia [§]	15 (21.4%)	NA	NA
Thrombocytopenia [§]	4 (5.7%)	NA	NA
Anti-dsDNA [§]	45 (64.3%)	NA	NA
AnticardiolipinAntibody [§]	16 (22.9%)	NA	NA
Photosensitivity [§]	7 (10%)	NA	NA
Neurologic disorder [§]	2 (2.9%)	NA	NA
Decreased Complement 3 [§]	43 (61.4%)	NA	NA
Decreased Complement 4 [§]	16 (22.9%)	NA	NA
ANA [§]	70 (100%)	NA	NA
LAC [§]	12 (17.1%)	NA	NA
CRP [§]	23 (32.9%)	NA	NA
ESR [§]	34 (48.6%)	NA	NA
SLEDAI*	6 ± 3	NA	NA

* This value was presented as mean ± SD. § This value was presented as number of patients positive for feature or antibody. SLE; systemic lupus erythematosus, NC; normal control, NA; not applicable, ANA; antinuclear antibody, LAC; lupus anticoagulant, CRP; c-reactive protein, ESR; erythrocyte sedimentation rate, SLEDAI; systemic lupus erythematosus disease activity index

B. 말초혈액단핵세포에서의 SLE와 NC간의 miRNA 프로파일링

1. miRNA 선별

유의하게 발현 변이 차이를 나타내는 178개의 miRNA중에서 fold change 값이 2 이상을 나타내는 miRNA들을 선별하였다. 상향조절된 miRNA는 49개, 하향조절된 miRNA는 15개로, 64개의 miRNA가 선별 되었다(Fig. 1) (Table 2).

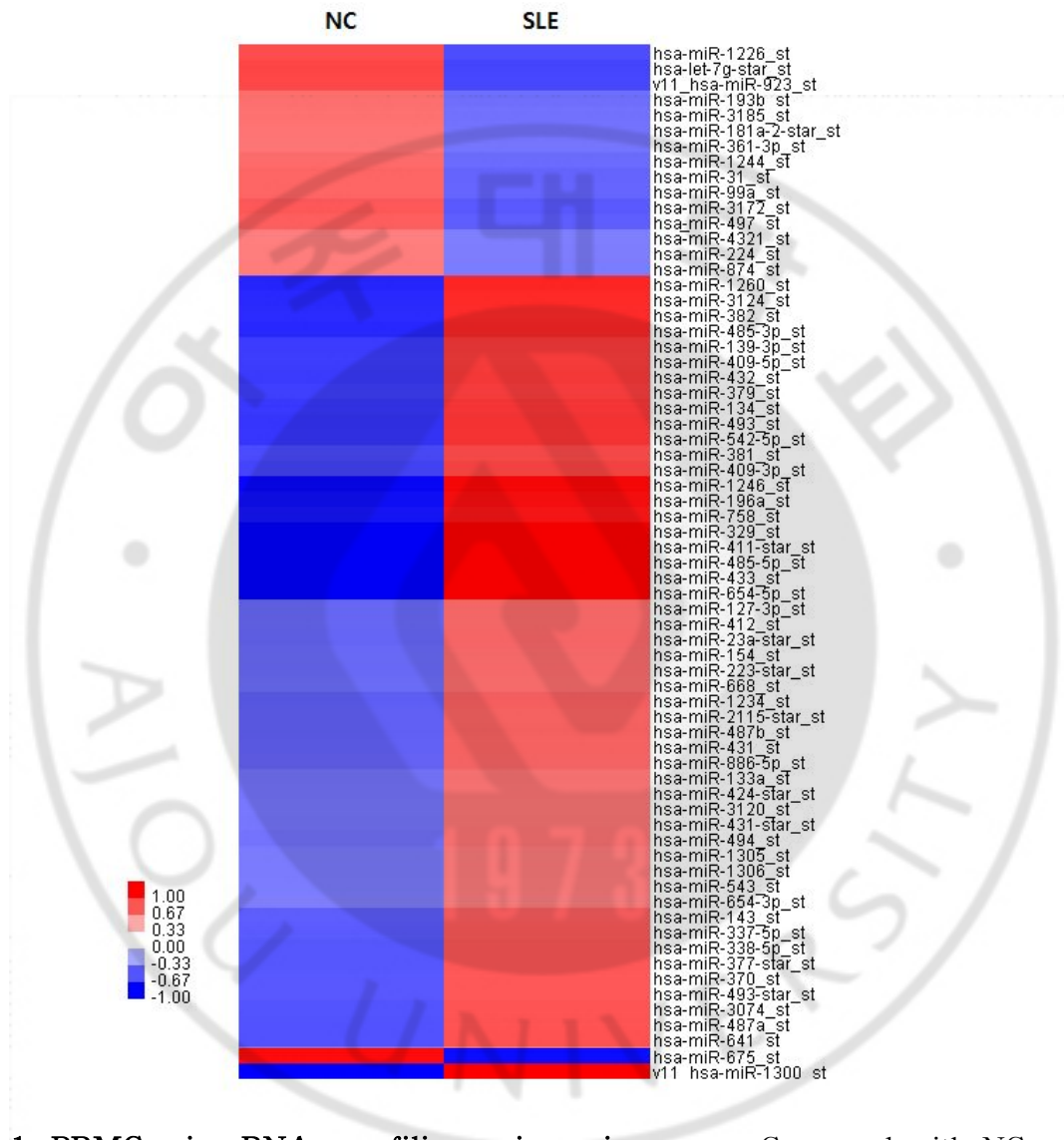


Fig. 1. PBMC microRNAs profiling using microarray. Compared with NC, altered expression of 64 miRNAs with fold change (>2) was found in SLE by miRNA microarray analysis. (red: upregulation; blue: downregulation)

Table 2. PBMC microRNAs expression levels in SLE patients compared to normal controls.

Upregulated miRNAs	Fold change	Downregulated miRNAs	Fold change
hsa-miR-433	5.9040	hsa-miR-338-5p	2.4783
hsa-miR-654-5p	5.0975	hsa-miR-493-3p	2.4653
hsa-miR-485-5p	4.1850	hsa-miR-370	2.4610
hsa-miR-411-3p	4.1595	hsa-miR-337-5p	2.4245
hsa-miR-329	4.0053	hsa-miR-143	2.3934
hsa-miR-1246	3.8233	hsa-miR-1234	2.3389
hsa-miR-196a	3.6648	hsa-miR-487b	2.3112
hsa-miR-758	3.5097	hsa-miR-2115-3p	2.3045
hsa-miR-1260	3.2590	hsa-miR-431	2.2850
hsa-miR-485-3p	3.2063	hsa-miR-23a-5p	2.2344
hsa-miR-3124	3.1815	hsa-miR-412	2.2230
hsa-miR-382	3.1570	hsa-miR-127-3p	2.2207
hsa-miR-493	2.9851	hsa-miR-154	2.2030
hsa-miR-542-5p	2.9773	hsa-miR-223-5p	2.1837
hsa-miR-134	2.9382	hsa-miR-668	2.1638
hsa-miR-432	2.8940	hsa-miR-494	2.1310
hsa-miR-139-3p	2.8681	hsa-miR-133a	2.1013
hsa-miR-409-5p	2.8654	hsa-miR-424-3p	2.0954
hsa-miR-379	2.8218	hsa-miR-431-3p	2.0833
hsa-miR-409-3p	2.7437	hsa-miR-3120	2.0690
hsa-miR-381	2.6324	hsa-miR-1305	2.0432
hsa-miR-641	2.5457	hsa-miR-1306	2.0432
hsa-miR-487a	2.5422	hsa-miR-543	2.0230
hsa-miR-3074	2.5169	hsa-miR-654-3p	2.0000
hsa-miR-377-5p	2.4846		

Compared with normal controls, altered expression of 67 miRNAs with fold change (>2) was found in SLE, with 49 miRNAs upregulated and 15 downregulated.

C. 전신 홍반 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 miR-16의 발현량 안전성 확인

miR-16으로 다른 miRNA의 발현량을 확인 할 수 있는 miRNA으로 사용할 수 있는지 확인하기 위해 cel-miR-39로 normalization (SLE n=8, NC n=8) 하여 전신 홍반 루푸스와 정상 대조군이 비슷하게 나오는 것을 확인하였고(Fig. 2), 1차(SLE n=39, NC n=36)와 2차(SLE n=66, NC n=31)에 걸쳐 miR-16의 발현량을 확인하였다. 발현량을 확인한 결과 전신 홍반 루푸스와 정상 대조군의 발현량이 비슷하게 나오는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). miR-16이 다른 miRNA의 발현량을 확인 할 수 있는 miRNA로서 사용 할 수 있다고 확인 되었다.

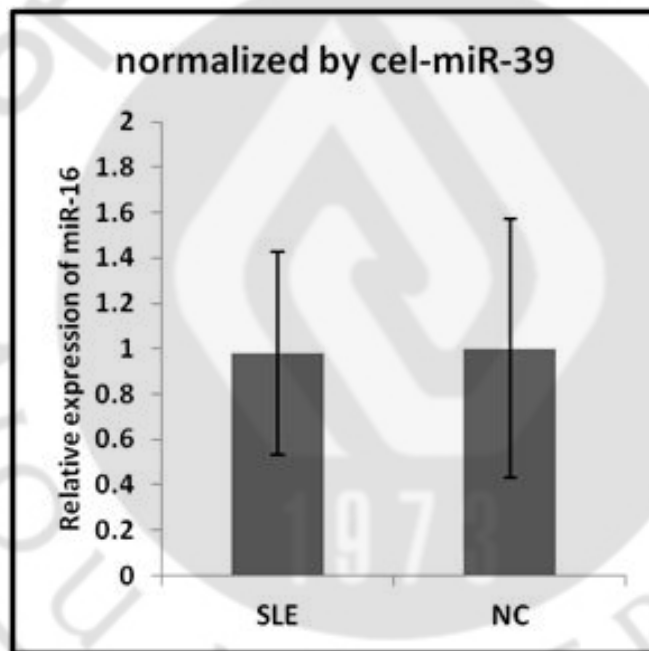


Fig. 2. miR-16 level is stable in plasma of both normal controls and SLE patients. MiR-16 expression levels were assessed by qRT-PCR and normalized by cel-miR-39. each experiment was conducted in duplicate for each sample, and the results are expressed as mean + SD.

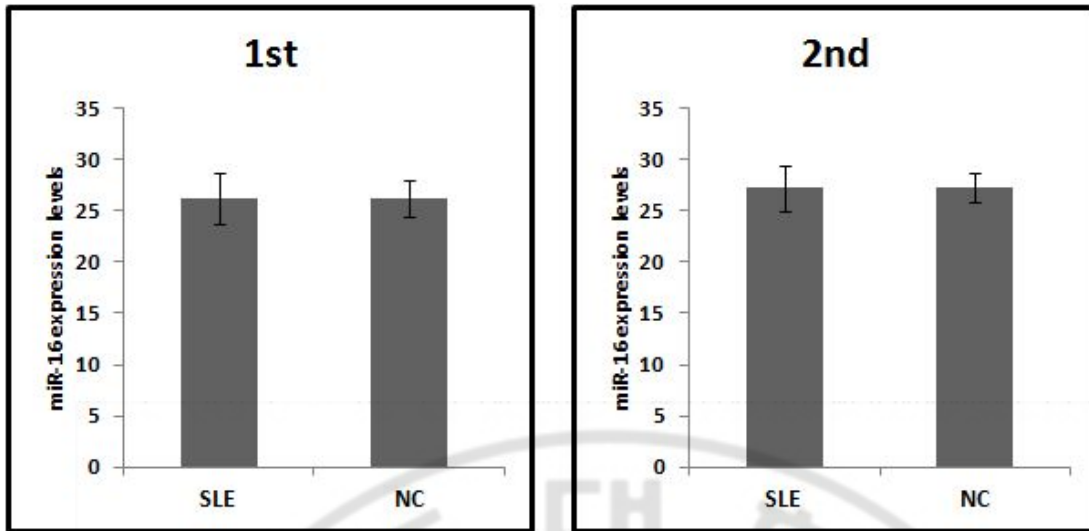


Fig. 3. The expression levels of miR-16. miR-16 expression levels were assessed by qRT-PCR. each experiment was conducted in duplicate for each sample, and the results are expressed as mean + SD. Probability values were calculated by the *t*-test compared with normal controls.

D. miRNA PCR array

miScript[®] miRNA PCR Array Human Serum & Plasma kit에 있는 84개의 miRNAs중에서 전신 홍반 루푸스군과 정상 대조군간의 유의하게 발현량 차이를 나타내는 miRNA인 9개의 후보 miRNA들을 선별하였다(Table 3).

Table 3. Circulating plasma microRNAs expression levels in SLE patients compared to normal controls by miRNA PCR array.

miRNA	SLE		NC		$\Delta \Delta CT$	fold change
	ΔCT	mean \pm SD	ΔCT	mean \pm SD		
hsa-miR-17-5p	3.7795	0.0190	5.3228	0.2880	-1.5433	2.9146
hsa-miR-19a-3p	4.3508	1.4537	5.2276	0.0518	-0.8768	1.8362
hsa-miR-223-3p	-0.7546	0.1906	0.8615	0.3157	-1.6161	3.0653
hsa-miR-30e-5p	4.9412	0.3569	7.3231	0.0920	-2.3819	5.2120
hsa-miR-150-5p	2.1557	0.5317	3.8193	0.0412	-1.6636	3.1681
hsa-miR-21-5p	0.0738	0.2661	3.0909	0.1783	-3.0171	8.0954
hsa-miR-25-3p	1.1501	0.1529	3.3776	0.2926	-2.2275	4.6832
hsa-miR-92a-3p	-1.0719	0.14821	2.7083	0.2703	-3.7802	13.7385
hsa-miR-26b-5p	3.2091	1.3550	4.1072	0.1858	-0.8981	1.8636

To measure the circulating levels of miRNAs, we performed plasma miRNA profiling to compare the SLE pool (n=10) to the normal control pool (n=10). The expressed levels of miRNAs were normalized to hsa-miR-16-5p. SLE: systemic lupus erythematosus, NC: normal control, SD: standard deviation

E. 전신 홍반 루푸스 환자군과 정상 대조군간의 plasma miRNA의 발현량 확인

miRNA PCR array에서 유의하게 발현량 차이를 나타내는 9개의 miRNA 중 4개의 후보 miRNA (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p)를 real-time PCR을 통해 전신 홍반 루푸스 70명과 정상 대조군 40명의 발현량 차이를 확인한 결과 4개의 후보 miRNA는 모두 발현증가 되어 있는 것을 알 수가 있지만, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p는 유의한 발현량 차이를 보이지 않고, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p는 통계적으로도 유의하게 발현량 차이를 나타낸다 (Fig. 4).

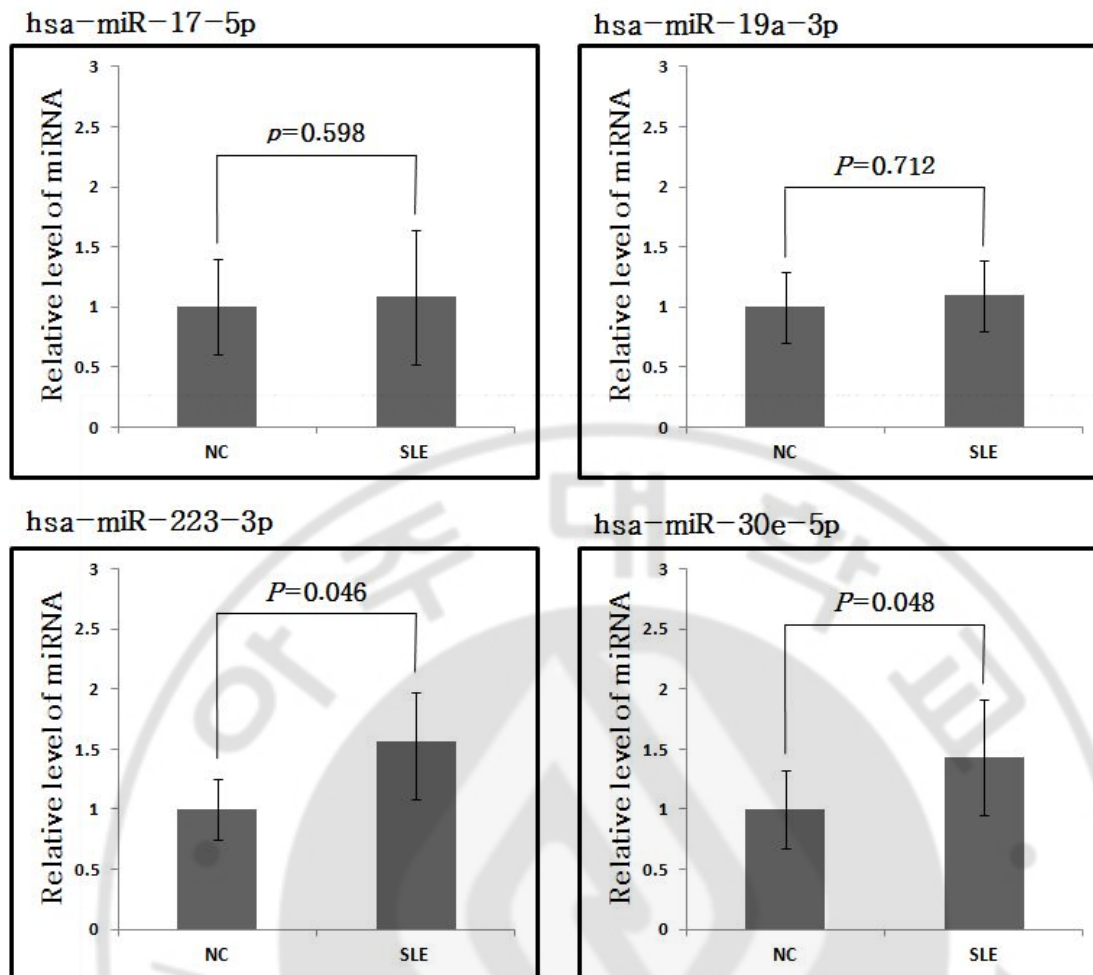


Fig. 4. Relative plasma miRNAs expression levels normalized by **hsa-miR-16**. Four miRNAs are significantly differentially expressed in the plasma of SLE patients (n=70) when compared to normal controls (NC) (n=40). *p*-values for each miRNA are shown.

F. 전신 홍반 루푸스 환자군의 microRNA와 임상적 특징과의 상관관계

전신 홍반 루푸스 환자에 있어서 miRNA의 발현량과 여러 임상적 특징과의 상관관계를 분석하여 miRNA의 발현량이 임상적으로 어떠한 영향을 미치는지 알아보하고자 하였다.

먼저 그룹간의 독립표본 *t*-test를 시행하였다. 그 결과 hsa-miR-223-3p에서 구강궤양과 루푸스 항응고인자의 양성률에서 *p* value는 각각 <0.001, 0.031로 유의한 결과를 나타내었다(Table 4).



Table 4. Comparison of the clinical characteristics according to the microRNAs.

Characteristics	SLE	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-30e-5p
	N = 70 (%)	<i>p</i> value	<i>p</i> value
Oralulcer [§]	13 (18.6%)	<0.001	0.214
Arthritis [§]	35 (50.0%)	0.132	0.860
Rash [§]	20 (28.6%)	0.236	0.373
Nephritis [§]	27 (38.6%)	0.490	0.429
Leukopenia [§]	18 (25.7%)	0.144	0.354
Lymphopenia [§]	15 (21.4%)	0.101	0.361
Thrombocytopenia [§]	4 (5.7%)	0.109	0.093
Anti-dsDNA [§]	45 (64.3%)	0.671	0.160
Anticardiolipin Antibody [§]	16 (22.9%)	0.578	0.859
Photosensitivity [§]	7 (10.0%)	0.564	0.682
Neurologic disorder [§]	2 (2.9%)	0.691	0.845
Decreased Complement 3 [§]	43 (61.4%)	0.988	0.804
Decreased Complement 4 [§]	16 (22.9%)	0.192	0.243
ANA [§]	70 (100.0%)	NA	NA
LAC [§]	12 (17.1%)	0.031	0.071
CRP [§]	23 (32.9%)	0.284	0.857
ESR [§]	34 (48.6%)	0.067	0.531
SLEDAI*	6 ± 3	0.890	0.533

*This value was presented as mean ± SD. [§]This value was presented as number of patients positive for feature or antibody. SLE; systemic lupus erythematosus, NC; normal control, NA; not applicable, ANA; antinuclear antibody, LAC; lupus anticoagulant, CRP; C-reactive protein, ESR; erythrocyte sedimentation rate, SLEDAI; systemic lupus erythematosus disease activity index

IV. 고찰

miRNA가 유전자 발현을 위한 세포내부의 중요한 조절자로서 알려져 있다(Cortez, 2009; Ferracin, 2010). miRNA를 연구하는 것은 miRNA가 존재하여 질병에 대한 감수성이 차이를 보인다는 것을 가정함으로써 질병의 감수성이나 치료 반응 등의 차이에 대한 원인을 규명하는 것이 주된 연구내용이다.

전신 홍반 루푸스는 인구 1만명당 40~50명 정도의 빈도를 보이는 대표적인 전신적인 자가 면역 질환이며, 현재까지 연구에 의하면 miRNA가 어떠한 조절자로서 역할을 할 것으로 추측하여 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나 구체적으로 어떠한 miRNA가 어떠한 기전으로 발병에 관여하는 지에 대해서는 아직 확실하게 밝혀지지 않았다.

최근 연구에 따르면 전신 홍반 루푸스와 관련해서 말초혈액단핵세포에서 분리된 miRNA에서 miR-21, miR-148a, miR-126, miR-155, miR-31, miR-182등이 상향 조절되고, miR-146a, miR-125a가 하향 조절되어 진다고 알려져 있다(Amarilyo, 2012). 발현증가되는 miRNA들 중 miR-21은 RasGRP1 (RAS guanyl-releasing protein 1)이라는 mRNA를 표적으로 DNMT1 (DNA methyltransferase 1)을 억제하거나 DNA 저메틸화를 일으키고(Pan, 2010), PDCD4 (Programmed cell death protein 4) mRNA를 표적으로 하여 IL-10 (interleukin 10)을 발현증가 시켜 AP-1 (activator protein 1)을 억제한다고 보고되었다(Tsytsykova, 1996; Sheedy, 2010; Stagakis, 2011). miR-148a와 miR-126은 DNMT1 mRNA를 표적으로 하여 DNA 저메틸화를 유도한다고 보고 되었으며(Pan, 2010; Zhao, 2011), miR-155는 CD62L (L-selectin) mRNA를 표적으로 하여 조절 T 세포를 변화시키고(Divekar, 2011), miR-31은 FOXP3 (forkhead box P) mRNA를 표적으로 하여 조절 T 세포를 하향 조절 한다고 알려져 있다(Rouas, 2009). 발현감소 되는 miRNA들로 miR-146a는 IRF5 (interferon regulatory factor 5)와 STAT-1 (signal transducer and activator of transcription 1) mRNA를 표적으로 해 IFN- α signaling을 상향 조절 한다고 보

고 되었으며(Tang, 2009), miR-125a는 KLF-13 (Kruppel-like factor 13) mRNA를 표적으로 해 RANTES (regulated upon activation, normal T expressed and secreted)를 상향 조절 한다고 보고 되었다(Zhao, 2010).

위에 언급한 연구들은 말초혈액단핵세포에서의 miRNA에 대한 연구가 대부분이었지만, 최근 연구에서 혈장에서의 circulating miRNA가 생물학적 표지자로서의 가능성이 있는지에 대해 연구 되었다(Wang, 2012; Carlsen 2013). 이에 본 연구자는 circulating miRNA가 전신 홍반 루푸스에서 생물학적 표지자로서의 가능성이 있는지 연구 하고, 말초혈액단핵세포에서의 miRNA와 연관성을 가지는지 연구하였다 .

일반적으로 전신 홍반 루푸스의 활성도를 확인하는 고전적 표지자로서 anti-dsDNA 항체, 보체의 활성화 정도, 면역 복합체 등이 흔히 사용되는 면역학적 방법이지만 이러한 방법은 그 가치가 불분명한 점이 있다. 질병의 활성도나 특이 임상 양상과 관련되었는지에 관하여 다양한 자가항체들의 많은 연구가 이루어 졌다. 그럼에도 불구하고 전신 홍반 루푸스의 전반적인 활성도를 반영하는 대표적인 표지자는 없는 상태이다. Anti-dsDNA 항체와 보체는 몇몇의 연구에서 루푸스 신염에서 질병의 활성도와 예후를 예측할 수 있는 좋은 표지자로 확인된 바 있다. 또 몇몇 연구자들은 anti-dsDNA 항체의 증가가 질병의 활성도를 반영하는 신뢰할 수 있는 표지자라고 말하고 있다. 그러나 다른 연구에서는 anti-dsDNA 항체가 질병의 활성을 반영하지 못한다고 발표된 바 있다(Illei 등, 2004). 이전에, anti-dsDNA 항체의 높은 수치는 활동성 루푸스 신염의 표지자로 널리 받아들여졌으나, 최근 53명의 추적 연구에서는 루푸스 신염의 악화에서 오히려 anti-dsDNA 항체가 증가하지 않고 감소하는 것을 확인한 바 있다(Ho 등, 2001). 이러한 결과는 실험의 빈도, 사용 방법, 질병 활성화의 정의 등에 따라 상반되는 결과가 나올 수 있으며, 그러한 표지자들이 루푸스 신염 뿐만 아니라 전반적인 전신 홍반 루푸스의 활성도를 보는 생물학적 표지자로 사용되기에는 문제가 있음을 말한다. 따라서 환자의 질병 활성도를 반영할 수 있는 좋은 표지자를 찾는 것은 전신 홍반 루푸스의 치료와 예후 판정에 있어 매우 필요한 일이겠

다.

따라서 전신 홍반 루푸스에서 circulating miRNA가 생물학적 표지자로서의 사용 가능성이 기대가 되고, 특히 한국인을 대상으로 한 연구가 없기 때문에, 한국인 전신 홍반 루푸스 환자를 대상으로 한 circulating miRNA 연구가 매우 필요하다고 할 수 있겠다.

연구에 앞서 normalization은 qRT-PCR을 통해 RNA 수준의 정확한 정량을 위한 중요한 단계이다. 본 연구에서는 miR-16이 혈장 miRNA의 정량을 위한 내부통제자로서 사용이 되었는데 이미 유방암이나 난소암 등 다양한 종양에서 환자와 정상 대조군간에 비슷한 발현량을 나타내는 것을 알 수가 있었다 (Fayyad-Kazan, 2013). 그렇지만 아직 정확히 입증되지 않은 참조 유전자이기 때문에, 전신 홍반 루푸스와 정상대조군간에 비슷한 발현량을 나타내는지 확인하기 위해 *C. elegans*의 miRNA인 cel-miR-39를 total RNA 추출 과정에서 넣어주어 qRT-PCR을 하여 miR-16의 발현량을 확인하여 두 그룹간에 비슷한 발현량을 나타내는 것을 확인 할 수가 있었고, miR-16을 normalization을 위한 miRNA로 사용하였다.

본 연구에서는 전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군간의 혈장에서 발견되는 여러개의 miRNA들을 발견 할 수 있었다. 이 중에 9개의 miRNA (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-26b-5p)를 miRNA PCR array를 통해 발현증가 된다는 것을 확인 할 수가 있었고, 다시 4개의 miRNA (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p)를 miRNA quantitative real-time polymerase chain reaction을 통하여 이 중 2개(hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p)의 miRNA가 전신 홍반 루푸스에서 유의하게 발현증가 되는 것을 확인 할 수가 있었다.

이 중 hsa-miR-223-3p은 간암(Wang, 2008)이나 만성 림프구성 백혈병 (Stamatopoulos, 2009), 급성 림프구성 백혈병(Chiaretti, 2010), 급성 골수성 백혈

병(Eyholzer, 2010; Pulikkan, 2010), 위 MALT 림프종(Liu, 2010), 재발성 난소암(Laios, 2008)에서 일반적으로 억제되는 것을 알 수가 있었고, 류마티스 관절염에서는 T 림프구에서 과발현 되고(Fluci, 2010), 패혈증에서 유의하게 감소하는 것을 알 수가 있었고(Wang, 2010), 당뇨에서는 지속적으로 발현증가가 되는 것을 확인 할 수가 있었다(Lu, 2010). 전신 홍반 루푸스와 관련하여 덴마크인과 스웨덴인을 대상으로 전신 홍반 루푸스 환자와 정상 대조군으로 한 연구에서는 hsa-miR-223-3p가 덴마크인에서는 전신 홍반 루푸스에서 정상대조군보다 fold-change가 0.71로 감소되어 있는 것을 볼 수 있었고, 스웨덴인에서는 통계적으로 의의는 없었지만 1.05로 약간 증가하는 것을 확인 할 수가 있었다(Carlsen, 2013). 한국인 전신 홍반 루푸스에서는 hsa-miR-223-3p의 fold-change 값이 1.57로 유의하게 증가 되어 있는 것으로 보아 덴마크인과는 다른 양상을 나타내는 것을 확인 할 수가 있었다. 그렇지만 중국인을 대상으로 한 연구에서는 전신 홍반 루푸스에서 hsa-miR-223-3p의 fold-change 값이 11.86으로 증가되는 것을 확인 할 수 있었는데, 이는 본 연구와 비슷한 양상을 나타내는 것으로 확인 할 수가 있었다(Wang, 2012). 또 전신 홍반 루푸스 환자에서 hsa-miR-223-3p가 구강 궤양과 루푸스 항응고인자의 양성률에서 유의한 상관관계를 보여 전신 홍반 루푸스의 생물학적 표지자로서의 사용 가능성을 제시한다.

hsa-miR-30e-5p의 경우에는 비소세포폐암(non small cell lung cancer ; NSCLC) 환자의 혈장에서 과발현 된다는 것이 보고되었지만, 아직 전신 홍반 루푸스에서 발표된 연구는 보고되지 않았다. 본 연구에서는 한국인 전신 홍반 루푸스에서 정상대조군의 비교해 봤을 때, fold-change값이 1.43으로 통계적으로 유의하게 증가 되어 있는 것을 확인 할 수가 있었다. 그렇지만 hsa-miR-30e-5p와 전신 홍반 루푸스 환자의 임상적 특징과는 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

또한, 말초혈액단핵세포에서 추출한 miRNA의 microarray 결과를 보았을 때, 말초혈액단핵세포의 miRNA와 혈장에서의 miRNA가 서로 다른 경향의 miRNA 발현량을 나타내는 것을 볼 수 있는데, 이는 혈장에서의 circulating miRNA와 말초혈액단핵세포에서의 miRNA같은 세포 기반 miRNA의 연관성을

찾아 볼 수는 없었다.

본 연구의 한계점은 첫 번째로는 본 연구가 각 군을 대표하기에 충분한 숫자라고 볼 수가 없고, 두 번째로는 말초혈액단핵세포에서의 유의한 결과를 보였던 miRNA에 대한 추가적인 실험이 부족하고, 세 번째로 본 연구에서는 혈장에서 유의한 결과를 나타내는 9개의 miRNA중 4개의 miRNA (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p)만 실험이 이루어 졌고, 네 번째로는 miRNA에 대한 기능적인 연구가 되어 있지 않았다.

따라서 이 circulating miRNA와 세포기반 miRNA의 연관성을 알아보고, 전신 홍반 루푸스의 생물학적 표지자로서 사용할 수 있는지에 대해서 좀 더 많은 수의 검체를 모아서 추가적인 연구를 시행하고, 말초혈액단핵세포에서의 miRNA에 대한 추가적인 실험과 혈장에서의 나머지 5개의 miRNA (hsa-miR-150-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-26b-5p)에 대한 실험도 필요할 것으로 생각되어지고, 이에 대한 추가적인 전신 홍반 루푸스에서 circulating miRNA의 기능적 연구가 필요할 것으로 생각 되어 진다.

지금까지의 본 연구 결과를 바탕으로 전신 홍반 루푸스에 대한 이해의 폭을 넓힐 수 있으며, 전신 홍반 루푸스로 발병할 가능성이 있는 환자를 조기에 발견할 수 있는 검사방법의 개발뿐만 아니라 치료제 개발 및 약물 반응과 관련된 약물 유전체 연구에 귀중한 기초 자료가 되리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구자는 전신 홍반 루푸스 환자와 류마티스 질환의 기왕력이 없는 정상인을 대조군으로 하여, miRNA PCR array를 통하여 선택된 9개의 miRNA (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-26b-5p)의 발현을 분석하였다.

Quantitative real-time polymerase chain reaction 방법을 통해 선택된 4개의 후보 miRNA의 발현량을 확인하였고, 이중 2개의 miRNA (hsa-miR-223-3p, hsa-miR-30e-5p)가 전신 홍반 루푸스 환자군에서 정상 대조군보다 통계적으로 유의하게 발현량 변화 값이 증가되었다. 또한, hsa-miR-223-3p의 경우 구강궤양과 루푸스 항응고인자의 양성률에서도 유의한 상관관계를 나타나는 것을 확인 하였다. 따라서 이들 2개의 혈장 miRNA가 전신 홍반 루푸스의 생물학적 표지자로서의 사용 가능성이 있을 것이라고 생각된다.

참고 문헌

1. Amarilyo G, La Cava A: miRNA in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 144(1):26-31, 2012
2. Carlsen AL, Schetter AJ, Nielsen CT, Lood C, Knudsen S, Voss A, Harris CC, Hellmark T, Segelmark M, Jacobsen S, Bengtsson AA, Heegaard NH: Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 65(5):1324-34, 2013
3. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 18(10):997-1006, 2008
4. Chiaretti S, Messina M, Tavolaro S, Zardo G, Elia L, Vitale A, Fatica A, Gorello P, Piciocchi A, Scappucci G, Bozzoni I, Fozza C, Candoni A, Guarini A, Foà R: Gene expression profiling identifies a subset of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia with myeloid-like gene features and over-expression of miR-223. *Haematologica.* 95 (7): 1114 - 21, 2010
5. Cortez MA, Calin GA: MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 9(6):703-711, 2009
6. Dai R, Zhang Y, Khan D, Heid B, Caudell D, Crasta O, Ahmed SA: Identification of a common lupus disease-associated microRNA expression pattern in three different murine models of lupus. *PLoS One.* 5(12):e14302, 2010
7. Dai Y, Huang YS, Tang M, Lv TY, Hu CX, Tan YH, Xu ZM, Yin YB:

- Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 16(12):939-46, 2007
8. Dalal SR, Kwon JH: The role of microRNA in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 6(11):714-22, 2010
 9. Divekar AA, Dubey S, Gangalum PR, Singh RR: Dicer insufficiency and microRNA-155 overexpression in lupus regulatory T cells: an apparent paradox in the setting of an inflammatory milieu. *J Immunol*. 186(2):924-30, 2011
 10. Eyholzer M, Schmid S, Schardt JA, Haefliger S, Mueller BU, Pabst T: Complexity of miR-223 regulation by CEBPA in human AML. *Leuk Res* 34. (5): 672 - 6, 2010
 11. Fayyad-Kazan H, Bitar N, Najjar M, Lewalle P, Fayyad-Kazan M, Badran R, Hamade E, Daher A, Hussein N, ElDirani R, Berri F, Vanhamme L, Burny A, Martiat P, Rouas R, Badran B: Circulating miR-150 and miR-342 in plasma are novel potential biomarkers for acute myeloid leukemia. *J Transl Med*. 7:11:31, 2013
 12. Ferracin M, Veronese A, Negrini M: Micromarkers: miRNAs in cancer diagnosis and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 10(3):297-308, 2010
 13. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S: Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 107(5):677-84, 2010. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S: Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 107(5):677-84, 2010
 14. Francia S, Michelini F, Saxena A, Tang D, de Hoon M, Anelli V, Mione

- M, Carninci P, d'Adda di Fagagna F: Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response. *Nature*. 488(7410):231-5, 2012
15. Frangou EA, Bertsiak GK, Boumpas DT: Gene expression and regulation in systemic lupus erythematosus. *Eur J Clin Invest*. 43(10):1084-96, 2013
 16. Fulci V, Scappucci G, Sebastiani GD, Giannitti C, Franceschini D, Meloni F, Colombo T, Citarella F, Barnaba V, Minisola G, Galeazzi M, Macino G: miR-223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 71 (2): 206 - 11, 2010
 17. Gracias DT, Katsikis PD: MicroRNAs: key components of immune regulation. *Adv Exp Med Biol*. 780:15-26, 2011
 18. Gupta A, Gartner JJ, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG, Fraser NW: Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature*. 442(7098):82-5, 2006
 19. Heegaard NH, Schetter AJ, Welsh JA, Yoneda M, Bowman ED, Harris CC: Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*. 130(6):1378-86, 2012
 20. Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M: Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 44(10):2342-9, 2001
 21. Illei GG, Tackey E, Lapteva L, Lipsky PE: Biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 50(7):2048-65, 2004
 22. Junker A, Hohlfeld R, Meinl E: The emerging role of microRNAs in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 7(1):56-9, 2011
 23. Laios A, O'Toole S, Flavin R, Martin C, Kelly L, Ring M, Finn SP,

- Barrett C, Loda M, Gleeson N, D'Arcy T, McGuinness E, Sheils O, Sheppard B, O' Leary J: Potential role of miR-9 and miR-223 in recurrent ovarian cancer. *Mol Cancer*. 7: 35, 2008
24. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75(5):843-54, 1993
25. Lipsky PE: Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat Immunol* 2: 764-766, 2001
26. Liu H, Zhu L, Liu B, Yang L, Meng X, Zhang W, Ma Y, Xiao H: Genome-wide microRNA profiles identify miR-378 as a serum biomarker for early detection of gastric cancer. *Cancer Lett*. 316(2):196-203, 2012
27. Liu TY, Chen SU, Kuo SH, Cheng AL, Lin CW: E2A-positive gastric MALT lymphoma has weaker plasmacytoid infiltrates and stronger expression of the memory B-cell-associated miR-223: possible correlation with stage and treatment response. *Mod Pathol*. 23 (11): 1507 - 17, 2010
28. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen CZ: Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat Rev Immunol*. 8(2):120-30, 2008
29. Lu H, Buchan RJ, Cook SA: MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res*. 86 (3): 410 - 420, 2010
30. Markou A, Sourvinou I, Vorkas PA, Yousef GM, Lianidou E: Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung Cancer*. :81(3):388-96, 2013
31. Marshall E: Lupus: Mysterious disease holds its secrets tight. *Science*. 296(5568):689-91, 2002

32. Millington GW: Epigenetics and dermatological disease. *Pharmacogenomics*. 9(12):1835-50, 2008
33. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(30):10513-8, 2008
34. Mok CC, Lau CS: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*. 56(7):481-90, 2003
35. Murata K, Yoshitomi H, Tanida S, Ishikawa M, Nishitani K, Ito H, Nakamura T: Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*. 12(3):R86, 2010
36. Pan W, Zhu S, Yuan M, Cui H, Wang L, Luo X, Li J, Zhou H, Tang Y, Shen N: MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4⁺ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *J Immunol*. 15;184(12):6773-81, 2010
37. Pulikkan JA, Dengler V, Peramangalam PS, Peer Zada AA, Müller-Tidow C, Bohlander SK, Tenen DG, Behre G: Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood*. 115 (9): 1768 - 78, 2010
38. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G: The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403(6772):901-6, 2000

39. Robson MG, Walport MJ.: Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Allergy*. 31(5):678-85, 2001
40. Rouas R, Fayyad-Kazan H, El Zein N, Lewalle P, Rothé F, Simion A, Akl H, Mourtada M, El Rifai M, Burny A, Romero P, Martiat P, Badran B: Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression. *Eur J Immunol*. 39(6):1608-18, 2009
41. Schrauder MG, Strick R, Schulz-Wendtland R, Strissel PL, Kahmann L, Loehberg CR, Lux MP, Jud SM, Hartmann A, Hein A, Bayer CM, Bani MR, Richter S, Adamietz BR, Wenkel E, Rauh C, Beckmann MW, Fasching PA: Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection. *PLoS One*. 7(1):e29770, 2012
42. Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, Martin C, O'Leary JJ, Ruan Q, Johnson DS, Chen Y, O'Neill LA: Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*. 11(2):141-7, 2010
43. Stamatopoulos B, Meuleman N, Haibe-Kains B, Saussoy P, Van Den Neste E, Michaux L, Heimann P, Martiat P, Bron D, Lagneaux L: microRNA-29c and microRNA-223 down-regulation has in vivo significance in chronic lymphocytic leukemia and improves disease risk stratification. *Blood*. 113 (21): 5237 - 45, 2009
44. Stagakis E, Bertsiadis G, Verginis P, Nakou M, Hatziapostolou M, Kritikos H, Iliopoulos D, Boumpas DT: Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Ann Rheum Dis*. 70(8):1496-506, 2011
45. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, Huang X, Zhou H, de Vries N, Tak PP, Chen S, Shen N: MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by

- targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 60(4):1065-75, 2009
46. Te JL, Dozmorov IM, Guthridge JM, Nguyen KL, Cavett JW, Kelly JA, Bruner GR, Harley JB, Ojwang JO: Identification of unique microRNA signature associated with lupus nephritis. *PLoS One.* 5(5):e10344, 2010
 47. Tsokos GC: Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 365(22):2110-21, 2011
 48. Tsytsykova AV, Tsitsikov EN, Geha RS: The CD40L promoter contains nuclear factor of activated T cells-binding motifs which require AP-1 binding for activation of transcription. *J Biol Chem.* 271(7):3763-70, 1996
 49. Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y: Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res.* 160(3):198-206, 2012
 50. Wang JF, Yu ML, Yu G, Bian JJ, Deng XM, Wan XJ, Zhu KM: Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* 394 (1): 184 - 8, 2010
 51. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K: The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 56(11):1733-41, 2010
 52. Wittmann J, Jäck HM: microRNAs in rheumatoid arthritis: midget RNAs with a giant impact. *Ann Rheum Dis.* 70 Suppl 1:i92-6, 2011
 53. Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF, Wong N: MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology.* 135 (1): 257 - 69, 2008
 54. Yu CH, Xu CF, Li YM: Association of MicroRNA-223 expression with

hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci* 54 (11): 2362 - 6, 2009

55. Zhang B, Wang Q, Pan X: MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol.* 210(2):279-89, 2007
56. Zhao S, Wang Y, Liang Y, Zhao M, Long H, Ding S, Yin H, Lu Q: MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4⁺ T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis Rheum.* 63(5):1376-86, 2011
57. Zhao X, Tang Y, Qu B, Cui H, Wang S, Wang L, Luo X, Huang X, Li J, Chen S, Shen N: MicroRNA-125a contributes to elevated inflammatory chemokine RANTES levels via targeting KLF13 in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 62(11):3425-35, 2010



Identification of microRNA associated with systemic lupus erythematosus in Korean

Bong-Sik Kim

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Chang-Hee Suh)

Backgrounds: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by polyclonal B-cell activation and elevated production of pathogenic autoantibodies. MicroRNAs (miRNAs) are short, noncoding RNAs that regulate gene expression on the posttranslational level, which can be measured in the circulation and are emerging as novel biomarkers in various diseases. The measurement of circulating miRNAs provides important information concerning disease. Dysregulated expression profiles of miRNAs have been identified in the blood of patients with coronary artery disease, immune disease, and cancer. However, a systematic analysis of miRNAs in SLE patients has not yet been performed. In this study, we attempted to identify miRNAs associated with the susceptibility to SLE in Korean populations, and to elucidate their significance in clinical phenotypes of SLE.

Materials and methods: Blood samples were collected from Korean SLE patients (n = 70) and normal controls (NC, n = 40) at the rheumatology

clinic, Ajou University Hospital. The mean age of SLE patients was 33.5 ± 7.3 years and 90% were women. The mean age of NC was 33.1 ± 6.3 years and 90% were women. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood samples of 5 SLE patients and 8 normal controls. The miRNA microarray chip analysis identified miRNAs differentially expressed in SLE. For the microRNA PCR arrays, we isolated total RNA from plasma according to the manufacturer's instructions. The RNAs ($n = 10$) were pooled in each sample group with an equal amount of RNAs. A miRNA expression profiling analysis was performed and compared between the SLE the normal controls groups. To verify the microRNA PCR array results, we performed the quantitative real-time PCR in samples from the patients with SLE ($n = 70$), and the healthy controls ($n = 40$).

Results: Four miRNAs were differentially expressed in plasma between SLE patients by miRNA PCR array. The plasma expression level of hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-223-3p, and hsa-miR-30e-5p were up-regulated in the SLE group compared to the normal controls. The hsa-miR-223-3p and hsa-miR-30e-5p were significantly up-regulated in plasma from patients with SLE by quantitative real-time PCR.

Conclusions: Our data suggest that plasma hsa-miR-223-3p and hsa-miR-30e-5p may be novel important promising biomarkers in the diagnosis of SLE. These novel and promising markers warrant validation in larger prospective studies.

Key words: Systemic lupus erythematosus, plasma, circulating miRNA, biomarker