

# miRNA-192, miRNA-21 a miRNA-200: nové markery karcinomu pankreatu u diabetiků?

Pavel Škrha<sup>1</sup>, Aleš Hořínek<sup>2</sup>, Michal Anděl<sup>1</sup>, Jan Škrha<sup>2</sup>

<sup>1</sup> II. interní klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady Praha, přednosta prof. MUDr. Michal Anděl, CSc.

<sup>2</sup> III. interní klinika 1. LF UK a VFN Praha, přednosta prof. MUDr. Štěpán Svačina, DrSc., MBA

## Souhrn

**Úvod:** U osob středního a staršího věku může být nově diagnostikovaný diabetes mellitus (DM) již prvním symptomem karcinomu pankreatu (PC). Dostatečně citlivé markery PC stále chybí. MicroRNA (miRNA) hrají významnou roli v regulaci buněčné odpovědi. U karcinomů byly pozorovány významné změny v expresích jednotlivých miRNA. Cílem naší studie bylo porovnat exprese vytipovaných miRNA u pacientů s PC, DM a u kontrol. **Metody:** Do studie bylo zařazeno 74 pacientů s PC (42/32, s/bez DM), 29 pacientů s DM 2. typu a 17 zdravých kontrol. U 9 pacientů s PC byl následně tumor resekován. MicroRNA byla získána ze séra pacientů, u uvedených 9 pacientů s PC byla navíc doplněna kontrola 3 měsíce po operaci tumoru. V séru jsme stanovili expresi u 8 miRNA, které byly vytipovány v předchozí pilotní studii (miR-21, miR-30, miR-191, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423, miR-454). **Výsledky:** Expresе všech 6 miRNA byly mezi skupinami signifikantně změněny. Nejvýznamnější rozdíl byl pozorován u miR-192, miR-21 a miR-200, které byly výrazně vyšší u pacientů s PC proti DM a kontrolám: miR-192: 1,6 (1,2–2,0) vs 0,3 (0,2–0,4) vs 0,3 (0,2–0,5),  $p < 0,00001$ ; miR-21: 1,4 (1,2–1,7) vs 0,3 (0,2–0,5) vs 0,5 (0,4–0,7),  $p < 0,00001$ ; miR-200: 1,6 (1,1–2,3) vs 0,3 (0,3–0,4) vs 0,3 (0,2–0,4),  $p < 0,00001$ . Mezi DM a kontrolami nebyl pozorován rozdíl, stejně tak nebylo možné odlišit uvnitř PC skupiny pacienty s diabetem a bez něho. Celkový rozdíl expresí miRNA u 9 pacientů po operaci pankreatu nebyl signifikantní v porovnání se stavem před operací. Byly však patrné významné interindividuální rozdíly. **Závěr:** Naše data ukazují, že miR-21, miR-192 a miR-200 by mohly být použity jako nové diagnostické markery karcinomu pankreatu. Sledování dynamiky těchto miRNA u pacientů po odstranění karcinomu by pak mohlo sloužit i jako prognostický marker. K posouzení, zda tyto markery bude možno použít jako časné markery v diagnostice karcinomu pankreatu, bude zapotřebí prospektivní studie u pacientů s nově diagnostikovaným diabetem.

**Klíčová slova:** diabetes mellitus – karcinom pankreatu – microRNA – miRNA-21 – miRNA-192 – miRNA-200

## miRNA-192, miRNA-21 and miRNA-200: new pancreatic cancer markers in diabetic patients?

### Summary

**Introduction:** Newly-onset diabetes mellitus (DM) in middle-aged and older people may be an early symptom of pancreatic cancer (PC). However, sensitive markers for PC are still missing. MicroRNAs (miRNAs) play an important role in a cell response regulation. Significant changes in miRNA expressions were observed in cancers. Our goal was to compare expressions of selected miRNAs in patients with PC, DM and controls. **Methods:** We enrolled 74 patients with PC (42/32, with/without DM), 29 type 2 diabetic patients and 17 controls. MicroRNA was determined in serum of all examined subjects. In 9 patients with PC the tumor was resected subsequently and after 3 months the measurements were repeated. We analyzed the expressions of 8 miRNAs that we had identified in a previous pilot study (miR-21, miR-30, miR-191, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423, miR-454). **Results:** MicroRNA expressions were significantly higher in patients with PC than in DM and controls: miR-192: 1.6 (1.2 to 2.0) vs 0.3 (0.2–0.4) vs 0.3 (0.2 to 0.5),  $p < 0.00001$ ; miR-21: 1.4 (1.2–1.7) vs 0.3 (0.2 to 0.5) vs 0.5 (from 0.4 to 0.7),  $p < 0.00001$ ; miR-200: 1.6 (1.1 to 2.3) vs 0.3 (0.3–0.4) vs 0.3 (0.2 to 0.4),  $p < 0.00001$ . No difference was observed between DM and controls, as well as between diabetic and non-diabetic patients within the PC group. There were no significant differences in miRNA expressions in 9 patients after pancreatic surgery. But there were significant interindividual differences. **Conclusion:** Our data shows that miR-21, miR-192 and miR-200 could be used as new diagnostic markers for pancreatic cancer. A dynamics of these miRNAs could serve as a prognostic marker in patients after cancer removal. Further prospective studies with newly-onset diabetic patients with no signs of malignancy will be needed to validate if suggested miRNAs could be used as early markers as well.

**Key words:** diabetes mellitus – microRNA – miRNA-21 – miRNA-192 – miRNA-200 – pancreatic cancer

## Úvod

Karcinom pankreatu (PC) se projevuje agresivním chováním s časným metastazováním. Proto se diagnostikuje obvykle již v pokročilém stadiu. Zlepšení prognózy by bylo možné v případě nalezení časných a dostatečně citlivých markerů, které dosud chybějí. Současná kurativní terapie spočívá v pankreatektomii s odstraněním celého nádoru, který nepřesahuje pankreas. V roce 2011 byla v ČR incidence PC 20,79/100 000 obyvatel a mortalita 18,41/100 000 obyvatel [1].

Role diabetes mellitus (DM) při karcinomu pankreatu je nejednoznačná, obecně lze říci, že DM zvyšuje riziko neogeneze téměř dvojnásobně [2], ale nově diagnostikovaný DM (manifestující se jako diabetes mellitus 2. typu – DM2T) již může být symptomem karcinomu pankreatu, a tedy sekundárním diabetem při karcinomu (T3c). Čerstvě diagnostikovaný DM (do 2 let) zvyšuje riziko PC až o 50 % proti DM diagnostikovanému před více než 5 lety [2]. Problémem zůstává, že T3cDM je prakticky nerozeznatelný od DM2T, a tak jsou tyto pacienti obvykle léčeni jako jiní diabetici. K plnému rozvoji karcinomu s již typickými symptomy tak dochází až později. Úbytek hmotnosti je mnohými pacienty zprvu vnímán pozitivně, lékař tak bývá vyhledán až s dalšími obtížemi (zvracení, nechutenství, bolest, ikterus aj).

Riziko karcinomu pankreatu roste mimo jiné s věkem, zejména od středního věku, s maximem v 70 letech [1]. Ve stejném období dochází také ke zvýšení výskytu DM2T. 40% prevalence DM u karcinomu pankreatu tak činí nově diagnostikované diabetiky jako ideální cílovou skupinu pro screening PC v časných stádiích [3].

MicroRNA (miRNA) jsou krátké jednovláknové molekuly RNA s potenciálem posttranskripční inhibice proteosyntézy. Svým navázáním na vlákno mRNA dle komplementarity bází dojde k označení tohoto vlákna mRNA a následné inhibici translace, případně k přímé degradaci vlákna mRNA při úplné shodě komplementarity miRNA-mRNA. Pokud je tak nadbytek miRNA, která inhibuje produkt tumor supresorového genu, může dojít k neogenezi podobně jako při nedostatku miRNA, která inhibuje onkogen.

Cílem naší práce bylo ověřit výsledky předchozí pilotní studie, v níž jsme vytypovali 6 miRNA odlišně exprimovaných u PC, které by umožnily odlišit pacienty s karcinomem pankreatu od zdravých jedinců. Dále jsme chtěli ověřit, zda bude rozdílná exprese těchto miRNA u diabetiků proti zdravým jedincům, což by mohlo alespoň částečně vysvětlit výsledky epidemiologických studií o diabetu jako rizikovém faktoru rozvoje PC. Dalším cílem pak bylo porovnat expresi miRNA u pacientů s PC před operací tumoru a 3 měsíce po ní.

## Pacienti a metody

Do studie bylo zařazeno 74 pacientů s duktálním adenokarcinomem pankreatu (PC, z nich 42 byli zároveň diabetici), 29 pacientů s DM2T a 17 zdravých kontrol. U 9 pacientů s PC byl následně tumor resekován a u nich byla doplněna kontrola 3 měsíce po odstranění

tumoru. Vzorky sér byly získány od pacientů z Interní kliniky 1. LF UK a ÚVN Praha a III. interní kliniky 1. LF UK a VFN Praha.

Průměrný věk ve skupině pacientů s PC byl 67 (v intervalu od 25 do 87) let, s DM 64 (od 53 do 73) let a u kontrol 52 (od 30 do 68) let.

miRNA byla izolována ze séra pacientů pomocí kitu Exiqon, za použití TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) byla provedena reverzní transkripce a k následnému real-time PCR (RT-PCR) byl užít Taqman Universal Master Mix II a jednotlivé eseje – primery (Applied Biosystems). Takto jsme stanovili exprese u 8 vytypovaných miRNA (miR-21, miR-30, miR-191, miR-192, miR-196, miR-200, miR-423, miR-454). Relativní exprese 6 miRNA vztažené na exprese miR-191 a miR-454 jsou vyjádřeny v relativních jednotkách.

Software ExpressionSuite vygeneroval základní data, která byla následně statisticky zpracována v programu Biogazelle qbase+. Jako referenční geny k relativnímu porovnání expresí jednotlivých vzorků pacientů byly aplikací GeNorm finder stanoveny miR-191 a miR-454.

Ke statistickému vyhodnocení byly použity testy ANOVA, párový a nepárový t-test, jako signifikantní byl považován výsledek, kde  $p < 0,05$ .

## Výsledky

Při srovnání 3 skupin (PC, DM, kontroly) byl nejvýznamnější rozdíl pozorován u miR-192, miR-21 a miR-200, jejichž exprese byly výrazně vyšší u pacientů s PC proti DM a kontrolám: **miR-192**: 1,6 (1,2–2,0) vs 0,3 (0,2–0,4) vs 0,3 (0,2–0,5),  $p < 0,00001$ ; **miR-21**: 1,4 (1,2–1,7) vs 0,3 (0,2–0,5) vs 0,5 (0,4–0,7),  $p < 0,00001$ ; **miR-200**: 1,6 (1,1–2,3) vs 0,3 (0,3–0,4) vs 0,3 (0,2–0,4),  $p < 0,00001$ . Signifikantní rozdíl s  $p < 0,00001$  byl pozorován i u miR-196 a miR-30, jejichž exprese byly u pacientů s PC 2krát zvýšené proti kontrolám i proti DM.

Rozdíly expresí miRNA mezi kontrolami, diabetiky a diabetiky s karcinomem pankreatu ukazuje [graf 1](#).

Ve skupině PC byly proti pacientům s DM a kontrolám zvýšeny exprese miR-192 a miR-200 5krát, miR-21 4krát, miR-196 2krát, miR-30 2,5krát ( $p < 0,00001$ ).

Mezi skupinou s DM a kontrolami nebyl pozorován rozdíl, stejně tak nebyl zjištěn rozdíl v expresích miRNA uvnitř PC skupiny mezi pacienty s diabetem a bez něho. Výsledky ukazuje [tab.](#)

Rozdíly expresí miRNA u 9 pacientů před operací a po operaci pankreatu nebyly signifikantní ([obr. 2](#)). Byly však patrné významné interindividuální rozdíly, u 2 jedinců došlo k výraznému zvýšení expresí miR-192, miR-21, miR-200.

Při porovnání této skupiny 9 pacientů po operaci tumoru pankreatu se skupinou s DM a s kontrolami bylo patrné stále signifikantní zvýšení všech miRNA v PC skupině.

## Diskuse

Nové markery karcinomu pankreatu by mohly zásadně změnit prognózu pacientů s tímto onemocněním. V posledních 10 letech se stále častěji objevují zprávy o nových

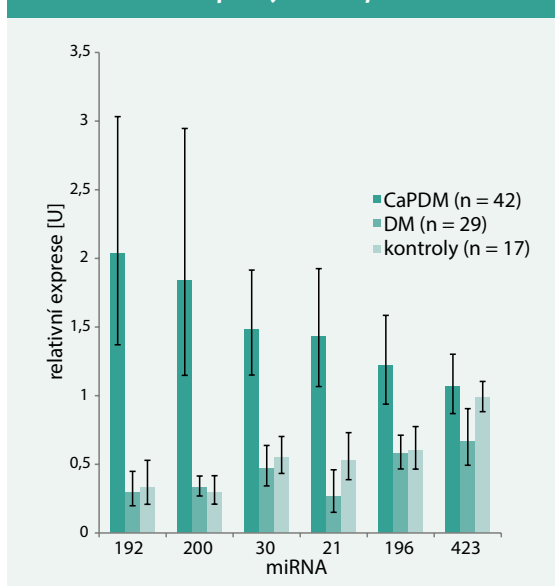
Tab. Relativní exprese jednotlivých miRNA [U]

|         | CaPDM            | CaPNDM           | DM               | kontroly         | p         |
|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------|
| miR-192 | 2,04 (1,37–3,03) | 1,18 (0,90–1,55) | 0,30 (0,20–0,45) | 0,33 (0,21–0,53) | < 0,00001 |
| miR-21  | 1,43 (1,07–1,93) | 1,44 (1,16–1,80) | 0,26 (0,15–0,46) | 0,53 (0,39–0,73) | < 0,00001 |
| miR-200 | 1,84 (1,15–2,95) | 1,33 (0,74–2,40) | 0,34 (0,27–0,42) | 0,30 (0,21–0,42) | < 0,00001 |
| miR-196 | 1,22 (0,94–1,59) | 1,45 (1,09–1,94) | 0,58 (0,47–0,71) | 0,60 (0,47–0,78) | < 0,00001 |
| miR-30  | 1,48 (1,15–1,92) | 0,96 (0,57–1,61) | 0,47 (0,34–0,64) | 0,55 (0,43–0,70) | < 0,00001 |
| miR-423 | 1,06 (0,87–1,30) | 1,01 (0,79–1,30) | 0,67 (0,49–0,91) | 0,99 (0,88–1,10) | < 0,03    |

Statisticky významný rozdíl mezi pacienty s DM, resp. kontrolami a pacienty s karcinomem

CaPDM – pacienti s karcinomem pankreatu s diabetem CaPNDM – pacienti s karcinomem pankreatu bez diabetu DM – diabetici 2. typu

Graf 1. Porovnání exprese jednotlivých miRNA



CaPDM – pacienti s karcinomem pankreatu a diabetem (n = 42)

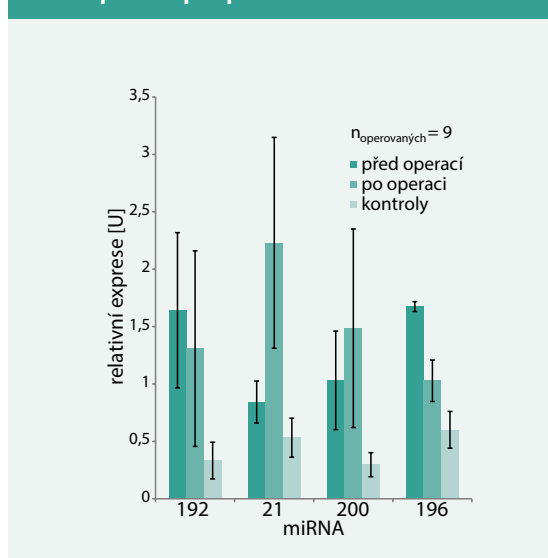
DM – pacienti s diabetes mellitus (n = 29), kontroly (n = 17)

poznatků o miRNA. Naprostá většina původních prací se věnuje studiu buněčných kultur, případně testům na laboratorních zvířatech. Ne všechny takto získané výsledky jsou v souladu s výsledky klinických studií.

Proto jsme provedli studii u pacientů, u nichž jsme použili sérum ke stanovení miRNA.

**miR-21** je jedna z klasických miRNA, jejíž zvýšená exprese bývá přítomna u celé řady onkologických onemocnění (karcinomu jícnu [4], žaludku [5], jater [6], pankreatu [7], plic [8], prsu [9], kolorektálního karcinomu [10] a dalších). Jedním z cílů miR-21 je tumor supresorový enzym PTEN, fosfatáza, která defosforyluje fosfatidyl inositol 3 fosfát (PIP3), což následně vede k inhibici signální dráhy Akt. Funkcí PTEN je zástava buněčného dělení, případně naprogramování buněčné smrti (apoptózy). Aktivita PTEN často u mnoha karcinomů chybí. Dojde-li ke snížení aktivity PTEN, buňka se dále dělí a přežívá. Naproti tomu Akt je serin/treonin specifická

Graf 2. Porovnání exprese miRNA u 9 pacientů před operací a po operaci karcinomu s kontrolami



kináza fungující jako onkogen, která fosforyluje proapoptotický protein BAD, čímž jej inaktivuje, a buňka tak přežívá. Navíc Akt aktivací NFκB nasmahuje geny pro přežití buňky. Je-li zvýšené množství miR-21, která inhibuje PTEN, je pak málo inhibována signální dráha Akt a buňka ztrácí schopnost apoptózy a nadále se dělí. Zvýšené množství Akt je schopno překonat zástavu v G1 i G2/M fázi buněčného cyklu [11,12]. Mutace DNA se tak v nádorové buňce snadno klonují. Zvýšená exprese miR-21 navíc negativně ovlivňuje chemoterapii, neboť významně snižuje cis-platinou navozený antiproliferativní efekt a schopnost apoptózy [13]. Naopak blokování miR-21 a miR-221 pomocí antisense oligonukleotidů (antagomiR-21, antagomiR-221) snížilo proliferaci a invazivitu nádorových buněk a jejich chemorezistenci ke gemcitabinu a 5-fluorouracilu [14].

Funkce **miR-192** je zatím méně zřejmá a studie se ve výsledcích rozcházejí. Zatímco na jedné straně je miR-192 prezentována jako induktor tumor supresorového genu p53, který je zodpovědný za zástavu buněčného

cyklu v G1 a G2 fázi [15], na straně druhé zvýšená exprese miR-192 vedla k buněčné proliferaci a usnadnila přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Tato zvýšená exprese miR-192 byla pozorována v klinické studii u pacientů s karcinomem pankreatu [16]. Naše data ukázala také významně zvýšenou expresi miR-192, a je tak ve shodě s nálezy ve druhém případě.

miR-200 ovlivňuje signální dráhu p53, angiogenezi cestou VEGF, apoptózu a chemosenzitivitu [17]. V buňkách karcinomu pankreatu s vysokým metastatickým potenciálem byla pozorována její zvýšená exprese [18].

miR-196 usnadňuje proliferaci a migraci nádorových buněk přímým působením na IκBα (inhibitor κ-B α). Aktivace NFκB vede k progresi karcinomu pankreatu. Naopak jeho inaktivace směřuje buňky k apoptóze. Za tuto inaktivaci je zodpovědný zmiňovaný IκBα. Zvýšená exprese miR-196 tak inhibicí IκB vede ke zvýšené aktivitě NFκB, vedoucí k proliferaci karcinomu pankreatu [19].

Z výše uvedeného vyplývá, že miRNA, které byly v naší studii významně zvýšeny u karcinomu pankreatu, zasahují do zásadních signálních kaskád ovlivňujících buněčný cyklus, apoptózu a angiogenezi. Bylo pozorováno, že jejich zvýšená exprese souvisí i se špatnou odpovědí na chemoterapeutika. Pokud by se podařilo ovlivnit expresi těchto miRNA (snížit ji), nelze vyloučit i vliv na prognózu nemocných.

Jedním z přístupů je použití anti-miRNA, které by se tak výhledově mohlo uplatnit terapeuticky, ať už přímým působením na nádorové buňky nebo nepřímo, cestou snížení chemorezistence. Problémem zatím zůstává dopravení těchto substancí do cílových tkání organismu.

## Závěr

Vztah karcinomu pankreatu a diabetu je dlouhodobě studován. Porovnání expresí miRNA u těchto jednotek však dosud nebylo provedeno. Exprese miR-192, miR-21, miR-200, miR-196 a miR-30 byly u PC signifikantně zvýšeny proti DM i proti kontrolám. Rozdíl expresí miRNA mezi pacienty s DM a kontrolami však nebyl pozorován, stejně tak ve skupině pacientů s PC nebyly odlišné exprese miRNA v podskupině s DM. Po odstranění tumoru pankreatu nedošlo ke statisticky významným změnám, velké interindividuální rozdíly by však mohly ukazovat na významně odlišnou prognózu daných jedinců. Sledování dynamiky těchto miRNA by tak mohlo sloužit jako významný prognostický marker. K tomu, zda-li by dané miRNA mohly fungovat též jako časné markery, bude zapotřebí prospektivní studie, které by se účastnili pacienti s nově diagnostikovaným DM, zatím bez známek malignity.

*Studie byla podpořena grantem IGA NT-14254–3 a projektem Univerzity Karlovy P25.*

## Literatura

1. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Dostupné z WWW: <www.svod.cz>.

- Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A et al. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 2005; 92(11): 2076–2083.
- Chari ST, Leibson CL, Rabe KG et al. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology* 2008; 134(1): 95–101.
- Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105(1): 104–111.
- Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer* 2010; 102(7): 1174–1179.
- Xu J, Wu C, Che X et al. Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog* 2011; 50(2): 136–142.
- Wang J, Chen J, Chang P et al. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009; 2(9): 807–813.
- Tang D, Shen Y, Wang M et al. Identification of plasma microRNAs as novel noninvasive biomarkers for early detection of lung cancer. *Eur J Cancer Prev* 2013; 22(6): 540–548.
- Kumar S, Keerthana R, Pazhanimuthu A et al. Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian J Biochem Biophys* 2013; 50(3): 210–214.
- Feng YH, Wu CL, Tsao CJ et al. Deregulated expression of sprouty2 and microRNA-21 in human colon cancer: Correlation with the clinical stage of the disease. *Cancer Biol Ther* 2011; 11(1): 111–121.
- Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F et al. Regulation of G(1) progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(5): 2110–2115.
- Kandel ES, Skeen J, Majewski N et al. Activation of Akt/Protein Kinase B Overcomes a G(2)/M Cell Cycle Checkpoint Induced by DNA Damage. *Mol Cell Biol* 2002; 22(22): 7831–7841.
- Yang S-m, Huang C, Li X-f et al. miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating PTEN. *Toxicology* 2013; 306: 162–168.
- Zhao Y, Zhao L, Ischenko I et al. Antisense inhibition of microRNA-21 and microRNA-221 in tumor-initiating stem-like cells modulates tumorigenesis, metastasis, and chemotherapy resistance in pancreatic cancer. *Target Oncol* 2015; epub v tisku.
- Song B, Wang Y, Kudo K et al. miR-192 Regulates Dihydrofolate Reductase and Cellular Proliferation through the p53-microRNA Circuit. *Clin Cancer Res* 2008; 14(24): 8080–8086.
- Zhao C, Zhang J, Zhang S et al. Diagnostic and biological significance of microRNA-192 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2013; 30(1): 276–84.
- Feng B, Wang R, Chen LB. Review of MiR-200b and cancer chemosensitivity. *Biomed Pharmacother* 2012; 66(6): 397–402.
- Mees ST, Mardin WA, Wendel C et al. EP300 – a miRNA-regulated metastasis suppressor gene in ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Int J Cancer* 2010; 126(1): 114–124.
- Huang F, Tang J, Zhuang X et al. MiR-196a Promotes Pancreatic Cancer Progression by Targeting Nuclear Factor Kappa-B-Inhibitor Alpha. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e87897. Dostupné z DOI: 10.1371/journal.pone.0087897>.

**MUDr. Pavel Škrha**

✉ [pavel.skrha@email.cz](mailto:pavel.skrha@email.cz)

II. interní klinika 3. LF UK a FN Královské Vinohrady  
[www.fnkv.cz](http://www.fnkv.cz)

*Doručeno do redakce 13. 2. 2015*

*Přijato po recenzi 13. 3. 2015*