

# 간암에서 Differential Display Polymerase Chain Reaction을 이용한 발암 및 아포토시스 관련 유전자의 발굴

전북대학교 의과대학 내과학교실

김 대 곤

## 서 론

국내 간암의 유병율은 세계에서 가장 높으며 암사망율 또한 매우 높다. 간암은 화학요법이나 방사선요법에 내성을 보이는 예후가 매우 나쁜 암종으로 현재로서는 조기발견에 의한 수술적 절제가 유일한 근치적 치료방법이나 대부분의 간암은 발견시 다발성이거나 큰 종괴 형성, 잔여 간 실질의 경변 등을 합병하고 있어 수술이 불가능하다. 따라서 최근 간동맥화학색전요법, 종양내 알콜주입법 등이 생존율을 높이는 방법으로 널리 사용되고 있다<sup>1-3)</sup>.

효과적인 치료를 위해서는 간암의 발암기전과 세포의 생물학적 특징을 이해하여야 한다. 따라서 다단계적으로 축적된 유전자 변형의 결과로서 비정상적 발현에 의해 암이 발생한다고 보아야 한다. 암연구의 초기 단계에서는 발암유전자(oncogene)에 대해 모든 관심이 집중되었으나 바이러스 발암유전자의 암유발기전이 세포의 암억제 유전자의 산물들의 기능을 방해하는 전략을 이용한다는 것이 보고된 이래 암억제 유전자에 관한 연구가 집중적으로 이루어졌다<sup>4)</sup>. 그러나 현재까지 기능이 밝혀진 암억제 유전자는 Rb, p53, p21, p16, WT1 등 아직 소수에 지나지 않는다<sup>5)</sup>. 이들 유전자 또는 유전자 산물은 암세포에서 다양하게 발현된다는 것이 보고되고 있으나 암종류에 따라, 인종에 따라 암발생과의 상관관계가 일치하지 않는다. 현재 human genome project에서는 암억제 유전자는 암발생시 없어지는 유전자라는 개념에 입각하여 loss of heterozygosity (LOH)를 보이는 염색체 부위에 대한 연구를 매우 광범위하게 수행하고 있다<sup>6)</sup>. BRCA1, BRCA2, APC, NF2, DCC, VHL, KPI (CDKN4), INK 4a(CDKN2/MTS1) 등은 암세포에서 LOH를 보이는 유전자로 생각되고 있다. 이중 간암의 발생에 관여하는 암억제 유전자는 아직 밝혀진 것이 없으며 인체 암세포 조직이나 동물모델에서 LOH를 보이는

염색체 부위에 대해서만 연구가 진행되고 있다<sup>6)</sup>. 최근에 밝혀진 LOH는 chromosome 16q와 16p에 있으나, 이외의 부위에도 간암관련 LOH가 있을 가능성은 매우 높으며 특히 한국형 간암에 영향을 주는 암억제 유전자에 대한 연구가 광범위하게 이루어져야 할 것이다. 새로운 암억제 유전자들을 찾기위해 암관련 LOH와 단독 유전자를 연결하는 연구가 수행 되고 있다. 일례로 FHIT (fragile histidine tria) 유전자는 소세포 폐암 (SCLC)에서 100% LOH를 보이는 3p14.2에 있음이 확인되었으며 폐암에서 비정상성을 보인다는 것이 보고되었다<sup>7)</sup>. 그러므로 암관련 LOH와 암억제 유전자와의 연결이 유전자 치료나 암위험환자 진단에 매우 중요하다고 할 수 있다. 발암유전자나 암억제 유전자 이외의 유전자 발현에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있는 바 특히 아포토시스 관련 유전자와 그 경로에 대한 많은 연구가 시작되었다.

다세포기관의 homeostasis는 세포의 증식과 분화 뿐만 아니라 세포사에 의해서도 조절을 받게된다. 발생, 변형, 호르몬의존성 조직위축과 정상조직 교체는 계획화된 세포사(세포사멸)로 이루어진다. 이러한 아포토시스관련 유전자 역시 발암작용에 중요한 역할을 하는 바 일찌기 bcl-2 유전자는 아포토시스를 유발하는 신호를 억제함으로써 발암작용을 일으킨다고 알려졌다. 즉 bcl-2 유전자의 과발현은 조혈세포와 신경세포에서 성장인자 제거에 의한 아포토시스를 억제하며 감마 X선 조사, 글루코코르티코이드, heat shock 과 다제 화학요법제에 의해 유도되는 아포토시스를 억제하는 가계유전자인 bcl-x, bax, mcl-1과 A1 등과 더불어 아포토시스 조절유전자의 하나로 알려졌다<sup>8,9)</sup>. 또한 bcl-2는 c-myc, ras family 등의 다른 유전자와 협동하여 세포형질전환을 일으킨다고 한다<sup>10)</sup>. 이러한 아포토시스 관련 유전자 역시 임파구 등의 조혈세포와 신경세포 등에서 연구되었으나 간세포 암에서는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 간세포암에서 이러한 발암관련 유전자와 아포토시스 관련 유전자의 발굴과 그 기능의 정확한 규명은 간암의 진단 및 치료에 중요한 열쇠가 될 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 정상 간 및 간암조직에서 total RNA 분리

본 연구는 일반외과 조백환교수와의 공동연구로 수술 간암 환자에서 정상 간조직과 간암 조직을 가능한 탈혈 관 절제 후 신속히 획득하여 휴대용 액체질소통에 넣어 운반하고 -80℃나 liquid nitrogen tank에 보관한 다음 필요에 따라 total RNA를 분리한다. 1g 정도의 조직을 1 ml의 Tri-reagent(GTC, phenol solution)에 넣고 마쇄한다. 0.2 ml을 chloroform을 가하여 phase 분리한 후 수층을 새 튜브에 옮기고 1.5ml의 isopropanol을 가하여 RNA를 침전시키고 원심 분리한다. RNA를 75% 에탄올 1ml로 씻고 건조시킨 후 200 $\mu$ l의 TE에 녹인 후 55℃에 10 분간 가열한다.

### 2. 환자의 profile기록

HBV, HCV의 혈청표지자에 의한 감염 여부,  $\alpha$ -feto-protein 등 암표지자 분석, 병리조직적 분화도 및 Edmondson grade 분리 등으로 환자 선별에 이용한다.

### 3. 간암세포주와 아포토시스 간암세포주에서의 total RNA 분리

같은 방법으로 시행하며 15 cm 디쉬당  $1 \times 10^8$  세포에 역시 1 ml의 Tri-reagent가 요한다.

### 4. Total RNA에서 DDPCR 시행

#### 1) Gene clean

Total RNA를 정량하여 1-2  $\mu$ g을 취하여 RNasin (40 unit/ $\mu$ l) 1 $\mu$ l을 가하고 DNase I (10 unit/ $\mu$ l)을 0.5 $\mu$ l 가하여 37℃에서 30분간 incubation한 후 phenol/chloroform (3:1)을 100 $\mu$ l 넣고 extraction 한다. absolute ethanol 및 3 M sodium acetate를 가하여 침전시킨 후 -80℃에 보관한다.

#### 2) cDNA synthesis

저장한 total RNA를 이용하여 1st strand를 만든다. 간기하면 DEPC 처리 H<sub>2</sub>O 18.8 $\mu$ l, total RNA 4.0 $\mu$ l, 5 X RT buffer 8.0 $\mu$ l, dNTP(250  $\mu$ M) 3.2 $\mu$ l, H-T11G, A, C(10  $\mu$ M) 4.0 $\mu$ l를 가하여 65℃에서 5분간 incubation하며 37℃에 10분간 incubation한 후 RT(superscript) 2 $\mu$ l을 가하고 이때 1st strand 합성율을 보기 위하여 반응혼합

액중 5 $\mu$ l을 새 튜브에 옮기고 <sup>32</sup>P-dCTP를 혼합하여 대조 튜브와 더불어 두 튜브를 37℃에서 50분간 incubation 한다. 75℃에 5분간 가열하고 RT로 비활성화 시킨 후 -20℃에 보관한다.

#### 3) DDPCR

3가지의 H-3' primer와 80가지의 H-5' primer인 10개의 임의 primer 쌍으로 샘플 당 240 회의 DDPCR을 시도한다. 5' primer (2  $\mu$ M) 2 $\mu$ l, 3'primer (10  $\mu$ M) 2 $\mu$ l, 10 X Dynazyme buffer 2 $\mu$ l, dNTP(25  $\mu$ M) 2 $\mu$ l, <sup>32</sup>P-dCTP 0.1 $\mu$ l, DEPC H<sub>2</sub>O 9.4 $\mu$ l, Dynazyme 0.5 $\mu$ l을 혼합 반응을 시켜 94℃ 3분간 denature 후 다시 94℃ 30초, 42℃ 1분, 72℃ 30초의 40 cycle 시행하고 72℃ 5분 최종 extension 시켜 4℃에서 유리시킨다.

#### 4) Gel electrophoresis

6% sequencing denaturing gel 에 약 3시간 전개하여 3M paper에 부착하여 건조시킨후 X-ray film에 노출시키고 차이나게 발현되는 밴드를 선택하여 절제 수거한 뒤 튜브에 넣고 TE 100 $\mu$ l를 가하여 5분간 boiling한다. 상청액을 새로운 튜브에 넣어 5 $\mu$ l glycogen (10mg/ml)을 넣은 후 absolute ethanol 및 3M sodium acetate로 침전시킨다.

#### 5) First amplification of PCR Products

4 $\mu$ l의 template에 같은 5' primer(2  $\mu$ M) 2 $\mu$ l, 3' primer (10  $\mu$ M) 2 $\mu$ l, dNTP(250  $\mu$ M) 4 $\mu$ l, 10 X Dynazyme buffer 5 $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 32.5 $\mu$ l, Dynazyme 0.5 $\mu$ l 로 혼합하여 같은 PCR cycle을 이용하여 증폭시킨다. 증폭산물을 Nusive : Sea plaque (3:1) gel에 전기영동하여 증폭된 DNA 산물의 크기를 확인하고 gel extraction한다.

#### 5. Cloning of PCR products

pGem-T vector를 이용하여 gel에서 추출한 PCR 산물을 ligation 한 뒤 E. coli(DH5  $\alpha$ )를 host cell로 transformation 시킨 후 alkaline lysis protocols에 의해 이중나선 DNA를 분리한다. Hind III의 제한효소로 절단하여 gel 전기 영동에 의하여 그 크기를 확인한다.

#### 6. Dot blot analysis

Mini prep으로 얻어진 DNA 1 $\mu$ l를 3cm x 2cm, transfer membrane에 점적하여 0.5N NaOH + 1.5M NaCl에 5분간, 0.5 M Tris + 1.5 M NaCl에 3분간 2번 담근 후 2 X SSC로 rinse하여 건조시키고 80℃에서 1시간 이상 baking한다. 이때 probe로는 1차 증폭된 PCR products를 사용하여 다시 <sup>32</sup>P-dCTP를 이용하여 같은

방법으로 증폭시켜 사용된다. 5ml tube를 이용하여 membrane을 넣고 refinded Church buffer를 가하여 68℃에 prehybridization 30분간 incubation하고 PCR probe 산물을 10 $\mu$ l씩 각 tube에 새로운 Church buffer와 혼합하여 넣고 68℃에서 2-3 시간 incubation하여 hybridization을 실시한다. 세척은 2 X SSC/0.1% SDS 용액으로 20분씩 2회 0.1 X SSC/0.1% SDS 용액으로 20분 세척한 후 X-ray film에 노출한다. 각 점적된 clone들의 양성 시그널을 관찰하고 올바른 클론을 선택한다.

## 7. Northern blot analysis

각 정상 간 및 간암조직과 대조 간암세포 및 아포토시스 간암세포의 total RNA 20-30 $\mu$ g을 1% formaldehyde gel에 전기영동하여 nylon membrane에 전이시키고 UV cross link 또는 80℃로 baking시켜 RNA를 고착시키고 mini prep DNA를 Hind III 제한효소로 자른 절편을 젤 분리하여 동위원소로 표지시킨 후 Church buffer에서 2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml 농도로 68℃에서 prehybridization 후 hybridization을 실시하고 2 X SSC/0.1% SDS, 0.2 X SSC/0.1% SDS로 각각 2회씩 20분간 세척하고 X-ray film에 -80℃에서 노출한다.

## 8. 정량적 RT-PCR에 의한 발현 변화 확인

RT-PCR은 cDNA의 합성과 PCR amplification의 두 반응을 요구하므로 mRNA level의 정량은 두 단계 모두에서 요구된다. 먼저 cDNA 합성량을 정량함으로써 동일한 양의 cDNA를 PCR의 주형으로 이용하는 것이 중요하다. PCR amplification 방법은 exponential 과정을 따르므로 PCR 산물의 수율이 포화되지 않는 조건에서 PCR을 수행하여야 한다. 일반적으로 PCR 산물은 10<sup>-8</sup>M 까지 exponentially 누적되고, 10<sup>-7</sup>M 이상이 되면 더 이상 PCR 산물의 수율이 크게 증가하지 않는다. 이러한 원리를 이용하여 합성된 cDNA의 PCR을 수행한다. 그러나 각 유전자의 발현양상이 서로 상이하므로 사용하는 cDNA 양과 PCR 조건을 표준화하기는 매우 힘이 드는 작업이다. 각 유전자에 따른 알맞은 조건을 설정하는 일이 중요하다.

## 9. Sequencing and blast search

Subclone된 plasmid를 SP6 primer나 T7 primer를 이용하여 유전자의 염기서열을 결정하기 위해 deoxynucleotide-chain termination method를 이용한다. 결정된

염기 서열을 컴퓨터에 입력하여 NIH GeneBank에 접속하고 상동성을 비교 검토하여 전혀 새로운 유전자이거나 기존에 알려진 유전자임을 확인한다.

## 10. Full length cDNA cloning

정상 간 및 간암조직과 배양 간암세포와 아포토시스 유도 간암 세포로부터 ZAP-cDNA library 합성키트를 이용하여 expression cDNA library를 제작하고 library를 탐색하여 full length cDNA를 분리하여 nested deletion 및 deoxynucleotide-chain termination method에 의해 전체 염기서열을 정한다.

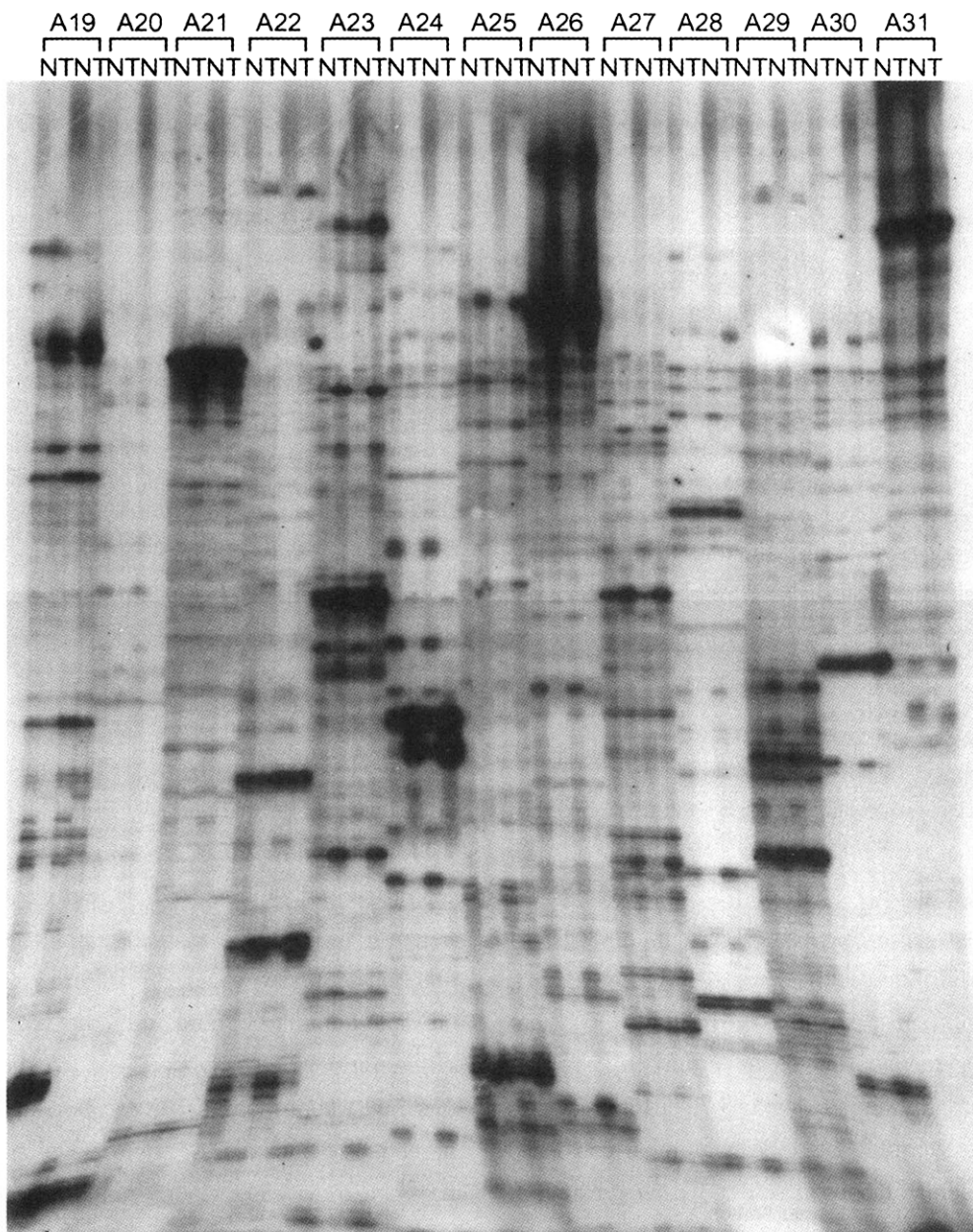
## 결 과

One-base anchored oligo dT primer법 개발에 의해 각 RNA 샘플에 대한 RT 반응의 수를 감소시키고 redundancy를 최소화하며 primer의 degeneracy에 의한 under representation을 최소화할 수 있는 기술적인 DDPCR 방법의 질적 향상이 본연구의 주요한 관건이 되겠다. 본 연구는 초기 기술적 방법의 단점을 보완하고 효과적인 정성적 및 정량적 방법의 보정이 절실하다고 보고 two-base anchored oligo dT primer법에 대한 one-base anchored oligo dT primer법의 결과를 비교 분석 하였던 바 differentially display되는 band에 있어 약 47%의 증가가 있었다. 또한 Northern 분석에 있어서도 오류적인 differtial display를 약 3% 감소시킬 수 있었다. 즉 one-base anchored oligo dT primer법의 사용은 differentially display되는 band 수를 2배 증가시키나 false positive clone의 제거에는 효과적이지 못했다.

한편 low strigency PCR condition으로 false positive clone이 얻게 되는 점 때문에 만족할만한 재현성이 떨어짐을 보완하기 위해 RNA finger printing에 사용하는 20mers AP-PCR primer를 사용하고자 하는 연구는 현재 진행중에 있으며 예비결과로는 매우 고무적이거나 경제적 부담이 크기 때문에 cost-effectiveness를 고려해야 할 것으로 보인다.

Fig. 1은 정상 간 및 간암조직에서 만들어진 cDNA template 1 $\mu$ l와 2 $\mu$ l를 가지고 DDPCR을 시행하여 6% sequencing gel에 전기영동하여 전개하고 X-ray film에 노출한 autoradiogram으로 정상 간, 간암, 태아 간 조직에서 서로 특이적으로 발현되는 밴드를 잘라내어 TE로 용해시켜 증폭하고 증폭된 절편을 3% Nusive + 1% Sea plaque gel로 전기영동하여 추출한 다음 pGem-T

vector에 ligation하고 E. coli에 형질 전환 시킨 뒤 alkaline lysis protocol에 의해 DNA를 분리하고 dot blot analysis에 의해 real clone임을 확인하였다.

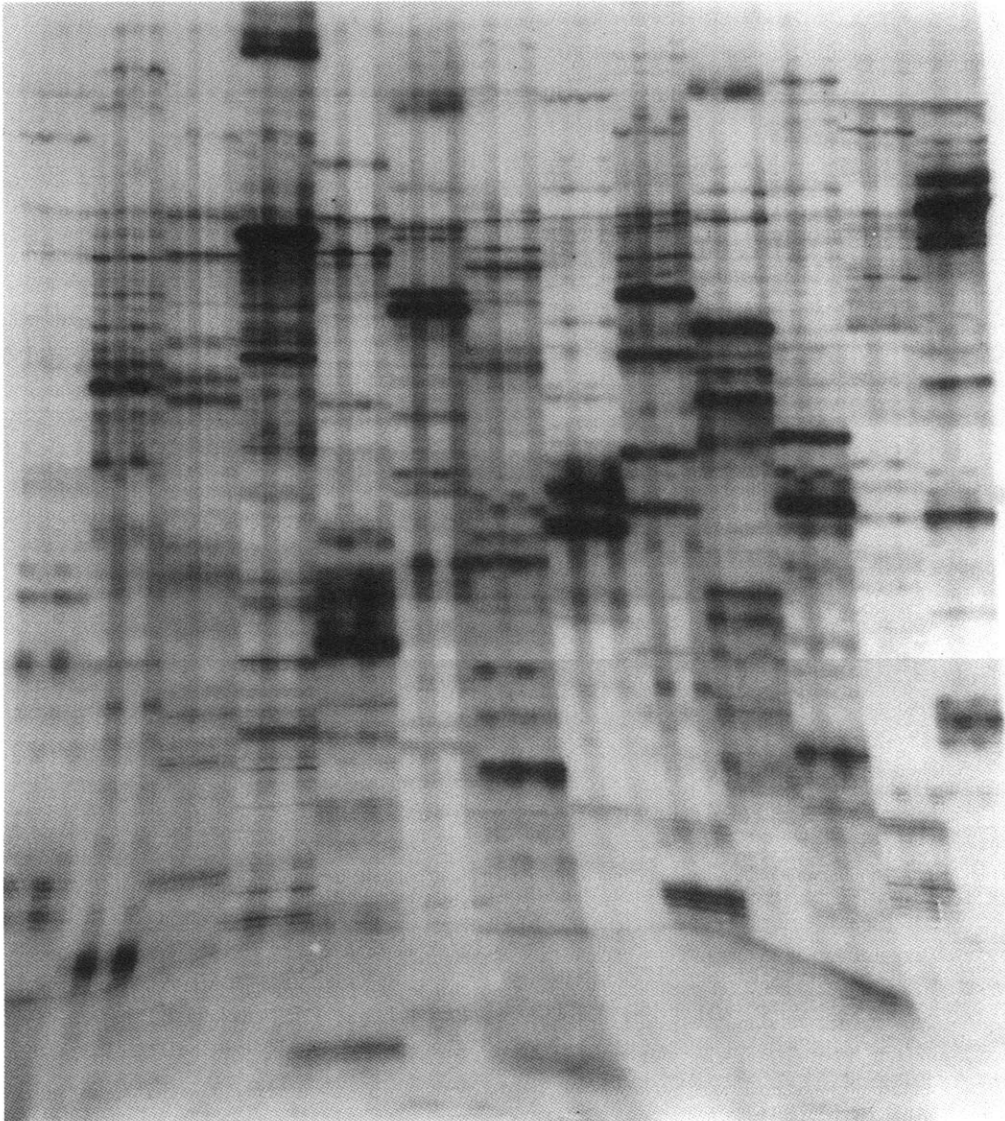


**Fig. 1.** Differential display of mRNAs from a normal *versus* a human hepatocellular carcinoma using multiple primer sets.

Fig. 2는 Hep 3B 간암세포에서 20  $\mu$ M N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide에 의한 아포토시스를 유도하고 유도 전후의 세포에서 DDPCR을 시행하여 역시 6% 폴리

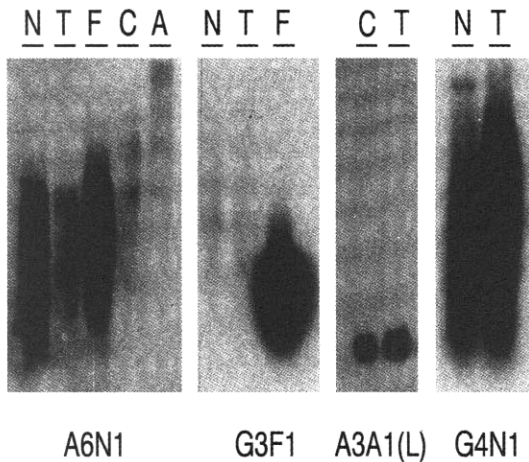
아클라마이드젤에 전개한 사진으로 일부 유전자 발현의 차이를 발견할수 있다.

AP48 AP49 AP50 AP51 AP52 AP53 AP54 AP55 AP56 AP57 AP58 AP59 AP60  
CACACACACACA CACACACA CACACACACACA CACA CACACACA CACACACA



**Fig. 2.** Differential display of mRNAs from the untreated cells *versus* the treated Hep 3B cells with 20  $\mu$ M N-(4-hydroxyphenyl)retinamide for 3d.

Fig. 3은 total RNA 20  $\mu$ g을 젤에 전기영동하여 Northern 분석을 시행하였던 바 예상대로 서로 다른 조직 특이적으로 그 발현차이를 관찰할 수 있었다. clone G4N1은 HCC에 발현이 증가 되었으며 G3F1은 fetal liver에서만 발현됨을 알수 있고 clone A6N1은 normal liver 와 HCC에서 발현이 증가되었고 clone A3A1은 아포토시스를 일으킨 Hep 3B세포에서 발현증가를 볼 수 있다.



**Fig. 3.** Northern blot analysis of the isolated clones by DDPCR in normal liver and hepatocellular carcinoma

Table 1은 위 subclone된 유전자 염기서열을 결정하여 blast search한 결과로 새로운 유전자나 또는 기존에 알려진 유전자의 일부임이 밝혀졌다. clone G4N1은 mitochondrial genome의 일부이며, clone G3F1은 인간 태아 gamma globulin 유전자이며 clone A6N1은 인간 유전자의 CpG DNA로 satellite 2 DNA로 밝혀졌으며 clone A3A1은 전혀 새로운 유전자로 사료되었다.

## 고 안

다단계 유전자변이를 일으켜 발암단계로 이행하는 간세포암의 발암 및 분화관련 유전자의 발굴은 많은 환자의 간세포암의 발암 관련유전자의 분석에 의해서만 가능하다. 최근 Liang P 등<sup>11)</sup>에 의해 개발된 DDPCR은 많은 진핵세포에서 mRNA 수준의 유전자발현을 동정하고 분석하게 하였다. 그들이 two-base anchored primer T12MN를 사용하는데 반해 독립적으로 single arbitrary

primer를 사용하는 유사한 DDPCR 방법이 Welsh 등<sup>12)</sup>에 의해 개발되었다. differential display 방법은 본 연구와 같은 발암관련 유전자 분석 뿐 만 아니라 광범한 변화된 유전자발현 분석에 사용되고 있으나 단점이 있다.

하나는 즉 어떤 mRNA의 redundancy와 under representation이며 다른 하나는 Northern blot 분석에서 확인되지 않은 "false positive"의 높은 클론들의 분리이다<sup>13)</sup>. 이러한 단점을 중식시키기 위한 방법의 적정화와 합리적 방법들을 만들기 위해 연구가 지속되어왔다<sup>14, 15)</sup>. 그러나 실제 여러 문제들 즉 외인적 요인들 중에는 pipetting 오류나, RNA 샘플의 integrity, RNA에 DNA 오염, 또는 불량 PCR tube<sup>16)</sup>와 내인적 요인들이 관여한다. 따라서 이러한 요인들을 개선함으로써 효율적이고 강력한 DDPCR 방법의 set up이 필요하다. 본실험의 방법은 T12MN 을 사용하는 고식적 방법으로는 위양성 클론 분리율이 20-30%에 이르고 있었다. 최근 one-base anchored oligo dT primer법 개발에 의해 각 RNA 샘플에 대한 RT 반응의 수를 감소시키고 redundancy를 최소화하며 primer의 degeneracy에 의한 under representation을 최소화 할 수 있게 되었다<sup>17)</sup>. 따라서 본 연구는 DDPCR 방법은 GenHunter사의 RNA image Kit의 H-T11 G, A, C 3' primer와 80쌍의 H-AP primer(5' primer)를 사용하여 많은 서로 다른 HCC 환자를 대상으로 DDPCR을 수행하고 있다. 또한 low stringency PCR condition으로 false positive clone이 얻게 되는 점 때문에 만족할 만한 재현성이 떨어짐을<sup>18)</sup> 보완하기 위해 RNA finger printing에 사용하는 20 mers AP-PCR primer를 사용하여<sup>7)</sup> 역전사시킨 후 PCR하는 방법이 보고된 바<sup>19)</sup>, PCR을 40℃의 low stringency cycling을 시도하여 신속성과 재현성을 증가시키는 방법을 검증하는 DDPCR의 양적 및 질적인 실험방법을 발전시키고자 한다. 따라서 개선된 DDPCR 방법과 다량의 환자 샘플을 이용하여 간암의 발암 및 분화 유전자를 발굴하는 것이 중요하다.

가능한 많은 간암 조직에서의 공통적인 발암 및 분화 유전자의 탐색이 필수적으로서 개인적 차이가 아닌 간암 조직 특이 발현을 분석하고자 하기 때문에 다년간의 연구 기간이 필요하다. 본 연구자는 현재 간암 환자들로부터 간암 세포주를 확립하고 있으며 기술적 축적에 의해 이러한 발암 및 암억제 유전자를 실험실적으로 입증하고 분석할 수 있는 실험실적 체계를 갖추고자 하며 특히 장차 수행하고자 하는 DNA 수준에서의 representational difference analysis (RAD) 법<sup>20)</sup>과의 연계하고자 한다. 또한 발암 및 암억제 유전자 응용에 의해 간암의 유전자 치료의 목적에 응용될 수 있으리라 본다.

**Table 1. Blast search of the cloned sequences and Northern analysis of differentially expression genes**

Clone	Product size	Results of homology serch	% ID/LEN	Northern analysis		
				Transcript in HCC	Transcript in normal liver	Consistency with DDPCR
G3T1	310bp		novel	+++	+	true
G3N1	271bp		novel	+	++	true
G3N2	234bp	Human Hep G2 3' region cDNA,clone	92/97	+++	+	false
G4N1	271bp	H.sapiens mitochondria gene	98/99	++	+	false
A3A1-u	600bp	Human Xq28 genomic DNA		++++	++	true
A6N1	500bp	Human CpG DNA	83/102	+	+++	true
A7A1	500bp		novel	+++	+	true
A9T1	400bp	Human B2 integrin $\alpha$ D subunt Human DNA sequence from cosmid L13	164/214 novel	++++	+	true
A11T1	210bp	Human IAP-like protein mRNA homologue	49/57 novel	++++	+	true
A15T1	281bp	Human guanyl cyclase C	62/83 novel	+	++	false
C1T1	200bp		novel	+++	+	true
C2N1	230bp		novel	not detective		
C2N2	180bp		novel	not detective		
C2N3	170bp		novel	not detective		
C2N4	118bp		novel	not detective		
C2N5	117bp		novel	-	+	true
C2T1	160bp			++	+	true
C3N1	281bp			+	+++	true
C3N2	210bp			not detective		
C3T1	281bp			+++	+	
TLK	300bp	Human mitochondrial gene		++	-	true
NLK	100bp		novel	+	+	false
C3T2	270bp			+++	-	true
C5T1	120bp			++	+	true
C5T2	110bp			++	+	true
C7N2	110bp			not detective		

## 결 론

본 연구 과제에 최종 목표는 DDPCR 기법을 이용하여 간암의 진단, 분류, 예후 판정 등을 위한 동시 다발성 분자적 지표를 개발하고 궁극적으로는 이들 유전자들을 간암 유전자 치료의 대상으로 연결 시킴에 있다. 이러한 목표를 달성하기 위하여 간암과 정상 조직 간에 발현 수준이 변하는 유전자들 400여 clones을 탐색 발굴한 바 탐색된 유전자를 Northern 분석 및 염기서열 분석 하여 더욱 철저히 동정 하며 full-length cDNA library를 제작 하여 발굴 동정된 유전자 full-length clones을 확보하고자 한다. 따라서 본 DDPCR법은 발암 및 아포토시스 관련 유전자를 발굴하는데 있어 효과적인 실험방법으로 사료되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) El-Domeiri AA, Huvos AG, Goldsmith HS, Foote FW Jr: *Primary malignant tumor of the liver. Cancer* 27:7-11, 1971
- 2) Okuda K, Ohtsuki, Obata H, Tominatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K: *Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. Cancer* 56:918-928, 1985
- 3) Sheu JC, Sung JL, Huan GT, Chen DS, Yang PM, Lai MY, Wei TC, Su CT, Chang YM, Lee CZ et al: *Intra tumor injection of absolute ethanol under guidance for the treatment of small hepatocellular carcinoma. Hepato-Gastroenterology* 34:255-261, 1987
- 4) Nevin JR: *Cell cycle targets of the DNA tumor viruses. Curr Opin Gene Dev* 4:130-134, 1994
- 5) Weinberger RA: *Tumor suppressor genes. Science* 254:1138-1146, 1991
- 6) Davis LM, Caspary WJ, Sakallah SA, Maronpot R, Wiseman R, Barrett JC, Elliot R, Hozier JC: *Loss of heterozygosity in spontaneous and chemically induced tumors of the B6C3F1 mouse. Carcinogenesis* 15:1637-1645, 1994
- 7) Sozzo G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti s, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM: *The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. Cell* 85:17-26, 1996
- 8) Nuñez G, Clarke MF: *The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. Trend Cell Biol* 4:400-403, 1994
- 9) Farrow SN, Brown R: *New members of the Bcl-2 family and their protein partners: Onco Cell Prol* 6:45-49, 1996
- 10) Del Bufalo D, Biroccio A, Leonetti C, Zupi G: *Bcl-2 overexpression enhances the metastatic potential of a human breast cancer line. FASEB J* 11:947-953, 1997
- 11) Liang P, Pardee, AB: *Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science* 257:967-971, 1992
- 12) Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M: *Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. Nucleic Acids Res* 20:4965-4970, 1992
- 13) Liang P, Zhu W, Zhang X, Guo Z, Rober P, O'Connell, Lidia Averboukh, Feilan Wang and Arthur B. Pardee. *Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. Nucleic Acids Res* 22:5763-5764, 1994
- 14) Mou L, Miller H, Li J, Wang E, Chalifour L: *Improvements to the differential display method for gene analysis. Biochem Biophy Res Comm* 199: 564-569, 1994
- 15) Li F, Barnathan ES, Kariko K. *Rapid method for screening and cloning cDNAs generated in differential mRNA display: application of northern blot for affinity capturing of cDNAs. Nucleic Acids Res. 22:1764-1765, 1994*
- 16) Chen Z, Swisshelm K, Sager R: *A cautionary note on reaction tubes for differential display and cDNA amplification in thermal cycling. BioTechniques* 16:1002-1006, 1994
- 17) Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M: *Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). Nucleic Acids Res. 21: 4272-4280, 1993*
- 18) Mou L, Miller H, Li J, Wang E, Chalifour L: *Improvements to the differential display method for gene analysis. Biochem. Biophy. Res. Commun. 199: 564-569, 1994*



- 19) Ayala M, Balint RF, Fernandez-de-Cossio ME, Canaan-Haden L, Larrick JW, Gavilondo JV. *New primer strategy improves precision of differential display. BioTechniques 18:840-850, 1995*
- 20) Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M: *Cloning the differences between two complex genomes. Science 259:946-951, 1993*
-