

تغییرات بیان ژنهای N-ras ، c-Fos ، RB1 ، Cyclin-D1 ، P53

در هپاتوسلولار کارسینوما در ایران

دکتر سید جواد میرحسینی مقدم، دکتر محمدعلی دانشمند، دکتر نگین شهید، دکتر سعید سمیعی،
دکتر نسترن نوروزی، مریم توکلی، دکتر محمدرضا زالی *

* مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: هپاتوسلولار کارسینوما شایع‌ترین تومور بدخیم اولیه کبد و چهارمین علت مرگ مرتبط با سرطان در جهان می‌باشد. تأثیر برخی ژن‌ها به خصوص آنهایی که در تنظیم چرخه سلولی نقش دارند، در ایجاد این سرطان در مطالعات بسیاری به اثبات رسیده است. اما هنوز تناقضاتی در این زمینه وجود دارد. در این مطالعه، ما تغییرات بیان برخی از این ژن‌ها را مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روشها: نمونه بافتی پارافینه ۲۵ بیمار (۱۸ مرد و ۷ زن) مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوم ثابت شده، از ۲۲ مرکز پاتولوژی در تهران طی ۲ سال (از سال ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۰) جمع‌آوری شدند. با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی (آویدین-بیوتین-پراکسیداز)، این نمونه‌ها را جهت بررسی از نظر وجود پروتئین‌های P53، Cyclin-D1، RB1، c-Fos و N-ras رنگ آمیزی کردیم. نتایج مطالعه به صورت فراوانی و نسبت شانس بیان شدند.

یافته‌ها: میانگین $\pm$ انحراف معیار سن در بیماران این مطالعه $60/6 \pm 12/5$ سال بود. نمونه‌های مثبت از نظر وجود پروتئین‌های P53، RB1، Cyclin-D1، c-Fos و N-ras به ترتیب ۶ مورد (۲۴٪)، ۳ مورد (۱۲٪)، ۵ مورد (۲۰٪)، ۱۲ مورد (۴۸٪) و ۲ مورد (۸٪) بودند. در ۲۲ نمونه (۸۸٪)، تغییراتی در پروتئین‌های checkpoint فاز G1 چرخه سلولی (RB1 یا Cyclin-D1) وجود داشت. با استفاده از نسبت شانس، مقایسه موارد مثبت P53 با موارد منفی آن نشان داد که گروه اول شانس بیشتری (۹ برابر) برای مثبت بودن ژن RB1 داشتند. این شانس برای N-ras، c-Fos و Cyclin-D1 به ترتیب ۳/۶، ۲/۷۵ و ۲/۶۶ برابر بود. عدم بیان ژن RB1 در تمام موارد مثبت Cyclin-D1، ۲۰ مورد (۹۰،۹٪) N-ras منفی و ۱۱ مورد (۵۰٪) c-Fos مثبت دیده شد. در موارد مثبت Cyclin-D1، شانس مثبت بودن N-Ras ۴/۷۵ برابر بیشتر از شانس منفی بودن این ژن محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: با انجام این مطالعه، ما به وجود موتاسیون در برخی ژن‌ها بخصوص ژنهای P53، RB1، c-Fos و نقش کلیدی آنها در کارسینوژنز هپاتوسلولار کارسینوما در ایران پی بردیم. همچنین ارتباط معنی‌داری که بین موتاسیون‌های همزمان این ژن‌ها دیده می‌شود، می‌تواند در ایجاد هپاتوسلولار کارسینوما نقش داشته باشد.

واژگان کلیدی: هپاتوسلولار کارسینوما، ژنتیک.

مقدمه

زنان می‌باشد (۲). البته شیوع بیشتر این بدخیمی در مردان نسبت به زنان در جوامعی که ریسک ابتلا به تومور در آنها بالاست، بیشتر از جوامعی می‌باشد که ریسک پایین یا متوسط دارند (۳/۷ به ۱ نسبت به ۲/۴ به ۱). HCC دارای پراکندگی جغرافیایی متنوعی می‌باشد. کشورها یا مناطقی که

هپاتوسلولار کارسینوما^۱ شایع‌ترین تومور بدخیم اولیه کبد و چهارمین علت مرگ مرتبط با سرطان در جهان می‌باشد (۱). این بدخیمی هفتمین سرطان شایع در مردان و نهمین در

¹ Hepatocellular carcinoma (HCC)

HCC در ایران که شیوع هپاتیت مزمن ناشی از عفونت های HBV و HCV و تماس با آفاتوکسین غذایی بالاست، انجام نشده است.

مواد و روشها

نمونه بافتهای فیکس شده در فرمالین و پارافین از ۲۵ بیمار (۱۸ مرد و ۷ زن) مبتلا به هپاتوسلولار کارسینوما قطعی (نمونه بافت تهیه شده حین جراحی یا بیوپسی) برای انجام این مطالعه تهیه شدند. این نمونه ها از ۲۲ مرکز پاتولوژی شهر تهران در طی ۲ سال از ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۰ جمع آوری شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی بر اساس دستورالعملهای اخلاقی اعلامیه هلسینکی سال ۱۹۷۵، تأیید شد.

از پرونده های بیمارستانی بیماران جهت ثبت سن، جنس و سایر اطلاعات دموگرافیک استفاده شده است.

تهیه بافت

نمونه ها را برش داده و با همتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی نمودیم. تشخیص قطعی HCC و درجه تمایز تومورها مجدداً توسط پاتولوژیست های مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد، با استفاده از معیارهای پیشنهادی سازمان بهداشت جهانی انجام شد. تومور زمانی برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی کافی به حساب می آمد که اندازه بلوکها کافی باشد (سطح مقطع برشها بیش از ۴ سانتیمتر مربع و بیش از ۱۰٪ سطح مقطع بلوک توسط تومور اشغال شده باشد).

رنگ آمیزی / ایمونوهیستوشیمیایی

تکنیک مطالعه بر اساس روش آویدین- بیوتین- پراکسیداز با استفاده از برشهای فیکس شده در فرمالدئید ۱۰٪ و پارافین بوده است. ابتدا با گذراندن بافتها از غلظت های مختلف گزیلول و الکل، آنها را دیپارافینه کردیم. سپس برای بازیافت آنتی ژنی، بافتها را در دماها و فشارهای متفاوت در محیط حاوی محلول سیترات با PH های مختلف حرارت دادیم. پس از آن با انکوباسیون بافتها در مجاورت محلول پراکسید هیدروژن ۳٪، پراکسیداز بافتی مهار شد. بعد به منظور کاهش رنگ آمیزی غیر اختصاصی، انکوباسیون بافتها در تماس با غلظت های بالای آلبومین سرم گاوی انجام شد. انکوباسیون با آنتی بادی اولیه (پروتئین مونوکلونال موشی ضد انسانی اولیه از شرکت DAKO، Lot 108[p53]، Lot 012[Cyclin-D1]، Lot 019[RB1] و شرکت Santa Cruz Biotechnology Inc، Lot I 251 [N-ras]، Lot J 251[c-fos] ابتدا در تیتراهای

بروز HCC بالایی دارند (۵۰ تا ۱۲۰ مورد در ۱۰۰،۰۰۰ نفر در سال) عبارتند از: چین، تایوان، کره و سایر کشورهای جنوب شرقی آسیا به علاوه نواحی جنوبی صحرای آفریقا. بروز HCC با افزایش سن نسبت مستقیم دارد، البته این نسبت در کشورهای مختلف متفاوت است (۳). در مناطقی که بروز HCC بالاست، این بدخیمی بیشتر در بالغین جوان دیده می شود، در صورتی که در مناطق با ریسک پایین این بدخیمی اغلب در بیماران مسن ایجاد می گردد (۵،۴). مطالعات اپیدمیولوژی متعددی نشان داده اند که ریسک فاکتور اصلی برای HCC عبارتند از: سن، جنس و سیروز با هر اتیولوژی. اما علت اصلی HCC، مصرف بیش از اندازه الکل و/ یا عفونت مزمن با ویروس هپاتیت B یا ویروس هپاتیت C و تماس با آفاتوکسین می باشد (۶،۴).

احتمالاً ژنهای سرکوب کننده تومور از قبیل RB1 و P53 در ایجاد سرطان کبد نقش مهمی را ایفا می کنند (۳). به نظر می رسد که سیروز کبدی با ایجاد تغییرات ژنتیکی زودرس در سلولها، زمینه مناسبی برای ایجاد تغییرات بدخیمی بوجود می آورد. البته تاکنون مطالعات بسیار کمی در این زمینه انجام شده است. Ashida و همکاران، هم در HCC و هم در سیروز، عدم وجود هتروزیگوتی را به میزان ۶۰٪ در ۱۳q (جایگاه ژن RB1) گزارش نموده اند (۷).

عدم وجود هتروزیگوتی و اختلال در ساختار و عمل ژن P53، غالباً در HCC وجود دارد (۸). یک جهش P53 خاص در بیش از ۵۰٪ HCC های یافت شده در هند، چین و آفریقای جنوبی که آفاتوکسین موجود در رژیم غذایی آنها یک عامل اصلی برای ایجاد سرطان کبد محسوب می شود، دیده شده است (۸-۱۴). البته این جهش خاص در بیماران مبتلا به HCC در کشورهای غربی کمتر اتفاق می افتد (۸،۳). فعال شدن انکوژنهای خانواده ras در طی القای شیمیایی HCC در جوندگان دیده شده است. اما شواهد بسیار اندکی از فعال شدن آنها در تومورهای انسان وجود دارد (۱۵). بیان بیش از اندازه Cyclin-D1 ممکن است یک واقعه زود هنگام در ایجاد بدخیمی کبد باشد و این واقعه نقش مهمی را در تمایز تومور ایفا می نماید (۱۶). Yuen و همکاران، بیان بیش از حد ژن c-Fos در بافتهای تومورال را در مقایسه با بافتهای غیر تومورال مشاهده نموده اند (۱۷).

جهشهای خاصی از ژنهای P53، RB1، Cyclin-D1، c-Fos، N-ras در هپاتوسلولار کارسینوما از کشورهای مختلف جهان گزارش شده اند؛ اما بر طبق دانسته های نگارندگان این مقاله، تاکنون هیچ مطالعه ای در مورد وضعیت این ژنها در بیماران

در مورد تومور اولیه، ۲۲ مورد، عدم بیان کامل پروتئین RB1 را نشان دادند و سایر تومورها به نسبت‌های گوناگون، پروتئین RB1 مثبت داشتند. شدت و محل زیر سلولی رنگ آمیزی در سلولهای تومورال، مشابه با آنچه در اپیتلیوم طبیعی دیده می‌شود، بود.

ما سطوح بالای پروتئین Cyclin-D1 را در ۵ مورد پیدا کردیم، در صورتیکه ۲۰ مورد سلولهای تومورال از نظر بیان پروتئین Cyclin-D1 منفی بودند.

فراوانی رنگ آمیزی مثبت در مورد N-ras و c-fos به ترتیب ۱۲ مورد و ۲ مورد بود.

در این مطالعه، بیان ژن P53 با بیان ژنهای Cyclin-D1، RB1، c-Fos و N-ras مقایسه شدند (جدول ۱). در تمام موارد (۵ مورد) Cyclin-D1 مثبت، عدم بیان ژن RB1 گزارش شد؛ در صورتیکه در موارد Cyclin-D1 منفی، ۳ مورد RB1 مثبت و ۱۷ مورد RB1 منفی گزارش شدند. زمانی که بیان بیش از حد P53 در سلولها مشاهده شد، ۴ مورد عدم بیان ژن RB1 وجود داشت. بالاخره در تمام موارد بیان بیش از حد N-ras (۲ مورد)، عدم بیان ژن RB1 مشاهده گردید. در صورتیکه در موارد عدم بیان ژن RB1، ۱۱ مورد بیان بیش از حد c-Fos یافت شد.

جدول ۱- مقایسه بیان ژن P53 با بیان ژنهای N-ras, c-fos, RB1 و Cyclin-D1

بیان ژنها	P53 مثبت	P53 منفی
RB1	مثبت (۳۳/۳)۲*	(۵/۳)۱
	منفی (۶۶/۷)۴	(۹۴/۷)۱۸
Cyclin-D1	مثبت (۳۳/۳)۲	(۱۵/۸)۳
	منفی (۶۶/۷)۴	(۸۴/۲)۱۶
c-fos	مثبت (۶۶/۷)۴	(۴۲/۱)۸
	منفی (۳۳/۳)۲	(۵۷/۹)۱۱
N-ras	مثبت (۱۶/۷)۱	(۵/۳)۱
	منفی (۸۳/۳)۵	(۹۴/۷)۱۸

* اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند

از سه مورد RB1 مثبت یک مورد c-fos مثبت بود و هیچ یک N-ras مثبت نبودند. از ۲۲ مورد RB1 منفی ۱۱ مورد c-fos مثبت و ۲ مورد N-ras مثبت بودند. در مواردیکه c-Fos مثبت گزارش شد، ۱ مورد N-Ras مثبت و ۱۱ مورد N-Ras منفی بودند. از سوی دیگر در موارد c-Fos منفی، ۱ مورد N-Ras مثبت و ۱۲ مورد N-Ras منفی یافت شد.

مختلف صورت گرفت و در نهایت برای هر ژن به غلظت خاصی دست یافتیم. سپس انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه و نشانه گذاری با HRP (Universal, HRP, Lot 10106) انجام گرفت. پس از رنگ آمیزی نمونه ها با محلول های کروموزن مانند AEC و DAB و رنگ آمیزی زمینه ای با محلول هماتوکسیلین، نمونه ها را در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار دادیم. قابل ذکر است که در بین هر یک از مراحل فوق شستشوی بافت با بافرهای لازم انجام گرفت. ضمناً برای افزایش حساسیت و اختصاصیت روش فوق و کنترل کیفی نمونه ها در هر دوره رنگ آمیزی، یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی نیز رنگ آمیزی شدند. نمونه کنترل مثبت ما نمونه بافتی خاصی بود که مطمئن بودیم نسبت به آنتی بادی ها مثبت است. نمونه کنترل منفی همان نمونه بافتی بیمار بود که با آنتی بادی تماس نیافته بود.

ارزیابی رنگ آمیزی /ایمونوهیستوشیمیایی

بررسی رنگ آمیزی P53, RB1, Cyclin-D1, c-Fos, N-ras در زیر میکروسکوپ نوری استاندارد با بزرگنمایی ۴۰۰ صورت گرفت. رنگ آمیزی هسته، زمانی مثبت محسوب می شد که رنگ گیری یکنواخت هسته یا رنگ گیری غیر یکنواخت در بیش از ۱۰٪ سلولهای سرطانی دیده شده باشد.

آنالیز آماری

نتایج این مطالعه به صورت فراوانی بیان ژن ها و نسبت شانس برای یافتن ارتباط بین تغییرات بیان این پنج ژن بیان شده است. تمام آزمون های آماری با استفاده از برنامه نرم افزار آماری برای علوم اجتماعی (SPSS 11، شیکاگو، IL) انجام شده است.

یافته ها

میانگین $\pm$ انحراف معیار سن در بیماران این مطالعه $60/6 \pm 12/5$ سال و بیشترین فراوانی سنی در دهه ۶ زندگی بود. نسبت مرد به زن $2/57$ (۱۸ مرد و ۷ زن) بود و میانگین $\pm$ انحراف معیار سن بیماران در هر جنس به ترتیب $62/7 \pm 10/4$ و $55/0 \pm 16/4$ سال بود.

تمام ۲۵ نمونه، تومورهای با تمایز خوب (درجه تمایز I) بودند. رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی پروتئین های P53, RB1, Cyclin-D1, c-Fos و N-ras در هسته سلولهای بافتها مورد مطالعه قرار گرفت. در کل، ۶ مورد تجمع هسته ای پروتئین P53 با نسبتهای مختلف در سلولهای تومور نشان داده شد، مابقی تومورها منفی بودند.

با استفاده از نسبت شانس، مقایسه موارد مثبت P53 با موارد منفی آن نشان داد که گروه اول شانس بیشتری (۹ برابر) برای مثبت بودن ژن RB1 داشتند. این شانس برای N-ras، c-Fos و Cyclin-D1 به ترتیب ۳/۶، ۲/۷۵ و ۲/۶۶ برابر بود. در موارد مثبت Cyclin-D1، شانس مثبت بودن N-Ras، ۴/۷۵ برابر بیشتر از شانس منفی بودن این ژن محاسبه شد.

بحث

مطالعات بسیاری در مورد تغییرات بیان انکوژنها و ژنهای سرکوب کننده توموری که در ایجاد هیپاتوسلولار کارسینوما ناشی از HBV/HCV یا کارسینوژنهای شیمیایی و عوامل دیگر نقش دارند، انجام شده است. در بعضی مناطق، موتاسیون ژن سرکوب کننده P53 در بیماران مبتلا به هیپاتوسلولار کارسینوما، به میزان ۵۰-۳۰٪ مشاهده شده است (۱۸). مطالعه An و همکارانش نشان داد موارد هیپاتوسلولار کارسینوم همراه با بیان بیش از حد ژن P53 بوده است (۱۹). بیان بیش از حد ژن P53 در ژاپنی ها، ۳۷/۵٪ و در ساکنین اندونزی به میزان ۶۲/۵٪ گزارش شده است (۲۰). البته میزان موتاسیون ژن P53 در هیپاتوسلولار کارسینوما در هندوستان بسیار پایین است و ممکن است که نقش مهمی را در ایجاد سرطان در این منطقه نداشته باشد (۲۱).

در مطالعه Zhou و همکاران ذکر شده است که موتاسیون ژن P53 ممکن است در ایجاد هیپاتوسلولار کارسینوما در رابطه با ویروس هپاتیت B نقش داشته باشد؛ اما با این وجود به دلیل پایین بودن میزان موتاسیون ژن P53 در این مطالعه، نگارندگان به این نتیجه رسیدند که عوامل دیگری نیز در هپاتوژنر نقش دارند (۲۲). اخیراً Ming و همکاران به این نتیجه رسیده اند که موتاسیون ژن P53 در مناطقی از چین که هیپاتوسلولار کارسینوما شیوع بالایی دارد، بیشتر از مناطقی است که شیوع این بیماری کم می باشد. بیش از ۹۵٪ نمونه های سرطانی بررسی شده در این طرح، تجمع داخل هسته ای قابل توجهی از پروتئین P53 را نشان دادند، که به وسیله ایمونوهیستولوژی شناسایی شدند (۲۳). با این وجود، در مطالعه Biersing و همکاران در سوئد (۲۴) و Vesey و همکاران در استرالیا (۲۵)، موتاسیون نقطه ای ژن P53 در هیپاتوسلولار کارسینوما یا اصلاً وجود نداشت و یا در حد بسیار کمی بود. بنابراین، بیان بیش از حد پروتئین P53 در نمونه های هیپاتوسلولار کارسینوما می تواند بعنوان یک علامت بیوپاتولوژیک در بافتهای تومورال به حساب

آید. در مطالعه ما در ۲۴٪ نمونه ها تجمع هسته ای پروتئین P53 و در ۸٪ آنها تجمع پروتئین N-ras دیده شد. Cerutti (۲۶) و Tong (۲۷) گزارش داده اند که تغییرات بیان ژن سرکوب کننده تومور P53 و ژنی از خانواده ras ممکن است مهمترین تغییر در هیپاتوسلولار کارسینوما باشد. بیان بیش از حد انکوژن N-ras در درصد بالایی از بیماران مبتلا به هیپاتوسلولار کارسینوما دیده شده است (۱۸). Ushijima و همکاران (۲۸)، Imai و همکاران (۲۹) و Tamano و همکاران (۳۰) به این نتیجه دست یافتند که موتاسیون انکوژن ras ممکن است یک واقعه زودرس در هیپاتوسلولار کارسینوما باشد و بیان این ژن در بافتهای تومورال و غیر تومورال به میزانهای متفاوتی وجود دارد. Lin YZ و همکاران به این نتیجه رسیدند که بیان N-ras در تومور کبد با میزان درجه تمایز سلولها ارتباط دارد (۳۱). البته Chao و همکاران ذکر کردند که فعال شدن ژن ras در ایجاد هیپاتوسلولار کارسینوماهای ناشی از آفاتوکسین نقش مهمی را ایفا نمی کند (۱۲). مطالعه ای نیز در آفریقای جنوبی بر روی بیماران سیاهپوست که در معرض تماس با آفاتوکسین غذایی بودند، انجام شده است و همین نتیجه را تأیید می کند (۳۲).

Lin GY و همکاران غیر فعال شدن ژن سرکوب کننده P53 و RB1 را به صورت مختلف مشاهده کردند و آنرا به عنوان پاتوژنر بیماریهای بدخیم در انسان ذکر نمودند (۱۰). همچنین Kodoh و همکاران، غیرفعال شدن ژنهای P53 و RB1 و چند ژن دیگر را در ایجاد هیپاتوسلولار کارسینوما مؤثر دانسته اند (۳۳). عدم بیان ژن سرکوب کننده RB1 در ۲۵-۲۰٪ بیماران مبتلا به هیپاتوسلولار کارسینوما و در ۸۶-۸۰٪ هیپاتوسلولار کارسینوماهایی که موتاسیون ژن P53 داشته اند، گزارش شده است. بطور کلی عدم بیان ژن RB1 در بیماری هیپاتوسلولار کارسینوما در مطالعات متعددی یافت شده است (۳۴، ۳۵). در مطالعه ما، در ۸۸٪ موارد عدم بیان پروتئین RB1 وجود داشت که با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد.

در مطالعه Choi و همکاران، بیان بیش از حد Cyclin-D1 با موتاسیون ژن P53 ارتباط مستقیمی داشت. بعلاوه، بیان بیش از حد Cyclin-D1 و موتاسیون ژن P53 در ارتباط با پیشرفت هیپاتوسلولار کارسینوما ناشی از ویروس هپاتیت B گزارش شده است (۳۶). در مطالعه حاضر ارتباطی بین بیان بیش از حد Cyclin-D1 و RB1 بدست آمد، بطوری که در تمام مواردیکه بیان بیش از حد Cyclin-D1 وجود داشت (۵ مورد) عدم بیان ژن RB1 دیده شد.

می شود که در آینده مطالعات بیشتری جهت بررسی نوع موتاسیون ها و علل ایجاد این موتاسیون ها انجام شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقای دکتر حمید اسدزاده و خانم فاطمه سلگی به خاطر کمک در جمع آوری نمونه ها، کمال تشکر را دارند. همچنین از خانم سودابه قاسمی و خانم شبنم امامی که مسئولیت آماده سازی بافتها را در این طرح بر عهده داشتند، سپاسگزارند. در پایان نیز از خانم فرنوش افشار امین به خطر جمع آوری داده ها، قدردانی می نمایند.

Abuthnot و همکاران برای اولین بار در سال ۱۹۹۱، افزایش بیان ژن های c-fos و c-myc و در نتیجه پروتئینهای مربوط به آنها را در سلولهای تعدادی از سرطانهای کبد گزارش نموده اند (۳۷). همچنین Wang و همکاران، مشاهده نمودند که بیان ژنهای c-fos و N-ras در سلولهای سرطانی کبد بیشتر از سلولهای سالم می باشد (۳). در مطالعه ما میزان بیان ژن c-fos در نمونه ها، ۱۲ مورد (۴۸٪) بود.

بطور کلی با انجام این مطالعه، به این نتیجه دست یافتیم که تغییرات بیان ژنهای P53، RB1 و c-fos در ایجاد هیپاتوسلولار کارسینوما نقش عمده ای دارند و ارتباط معنی داری بین موتاسیون های همزمان این ژنها نیز وجود دارد. توصیه

REFERENCES

1. Roncalli M, Bianchi P, Grimaldi GC, Ricci D, Laghi L, Maggioni M, et al. Fractional allelic loss in non-end-stage cirrhosis: correlations with hepatocellular carcinoma development during follow-up. *Hepatology* 2000; 3: 846-50.
2. Okuda K. Epidemiology of primary liver cancer. In: Tobe T, editor. *Primary liver cancer in Japan*. Springer-Verlag, Tokyo, 1992; p: 3.
3. Wang Z, Xiang Q, Li D, Li S. Correlation between gene expression and chromatin conformation of c-fos and N-ras in human liver and hepatoma. *Chin Med Sci J* 1991; 6(1): 6-8.
4. Trevisani F, D'Intino PE, Grazi GL, Caraceni P, Gasbarrini A, Colantoni A. Clinical and pathologic features of hepatocellular carcinoma in young and older Italian patients. *Am Cancer Soc* 1996; 77: 2223-32.
5. Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Politi F, D'Amico G, Pagliaro L. Hepatocellular carcinoma; A world wide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci* 1991; 23: 443-7.
6. Akriviadis EA, Llovet JM, Efremidis SC, Shouval D, Canelo R, et al. Hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 1998; 85: 1319-31.
7. Ashida K, Kishimoto Y, Nakomoto K, Wada K, Shiota G, Hirooka Y, Kamisaki Y, et al. Loss of heterozygosity of the retinoblastoma gene in liver cirrhosis accompanying hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 489-95.
8. Katiyar S, Dash BC, Thakur V, Guptan RC, Sarin SK, Das BC. P53 tumor suppressor gene mutations in hepatocellular carcinoma patients in India. *Cancer* 2000; 88(7): 1565-73.
9. Lane DP. P53 Guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
10. Guo Yue Lin, Zhao Lun Chen, Cai Mo Lu, Ying Li, Xiao Jia Ping, Rong Huang. Immunohistochemical study on p53, H-rasp21, c-eRBB-2 protein and PCNA expression in HCC tissues of Han and minority ethnic patients. *World J Gastroenterol* 2000; 6(2): 234-38.
11. Lun-Xio Qin, Zhao-You Tang, Zeng-Chen Ma, Zhi-Quan Wu, Xin-Da Zhou, Qing-Hai Ye, et al. P53 immunohistochemical scoring: an independent prognostic marker for patients after hepatocellular carcinoma resection. *World J Gastroenterol* 2002; 8(3): 459-63.
12. Chao HR, Tsai TF, Lin CS, Su TS. Evidence that mutational activation of the ras genes may not be involved in aflatoxin B1-induced human hepatocarcinogenesis, based on sequence analysis of the ras and p53 genes. *Mol Carcinog* 1999; 26(2): 69-73.
13. Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T. Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5520-5.
14. Teramoto T, Satonaka K, Kitazawa S, Fujimori T, Hayashi K, Maeda S. P53 gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 231-5.
15. Dominguez-Malagon H, Gaytan-Graham S. Hepatocellular carcinoma: an update. *Ultrastruct Pathol* 2001; 25(6): 497-516.

16. Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver* 2001; 21(2): 89-95.
17. Yuen MF, Wu PC, Lai VC, Lau JY, Lai CL. Expression of c-Myc, c-Fos, and c-jun in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2001; 91(1): 106-12.
18. Tabor E. Tumor suppressor genes, growth factor genes, and oncogenes in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 1994; 42(4): 357-65.
19. An FQ, Matsuda M, Fujii H, Tang RF, Amemiya H, Dai YM, Matsumoto Y. Tumor heterogeneity in small hepatocellular carcinoma: analysis of tumor cell proliferation, expression and mutation of p53 and beta-catenin. *Int J Cancer* 2001; 93(4): 468-74.
20. Marwoto W, Miskad UA, Siregar NC, Gani RA, Boedihusodo U, Nurdjanah S, et al. Immunohistochemical study of p53, PCNA and AFP in hepatocellular carcinoma, a comparison between Indonesian and Japanese cases. *Kobe J Med Sci* 2000; 46(5): 217-29.
21. Buendia MA. Genetic of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10(3): 185-200.
22. Zhou F, Wang J, Lei B, Zhao L, Tang H, Wang X, et al. Detection of p53 gene mutation in hepatocellular carcinoma. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 1997; 28(1): 50-4.
23. Ming LH, Yuan BJ, Thorgerisson SS, Zu YR, Wu ZY, Sun ZT. Characteristics of high frequency 249 codon mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma in prevalent area of China. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1991; 21: 122-4.
24. Biersing L, Andersson C, Lithner F. Hepatocellular carcinoma in patients from northern Sweden with acute intermittent porphyria: morphology and mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 393-7.
25. Vesey DA, Hayward NK, Cooksley WG. P53 gene in hepatocellular carcinoma from Australia. *Cancer Detect Prev* 1994; 18: 123-30.
26. Cerutti P, Hussanin P, Pourzand C, Aguilar F. Mutagenesis of the H-ras protooncogene and the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Res* 1994; 54(7Suppl): 1934-8.
27. Tong ZY. Advances in primary hepatocarcinoma research. *Zhongguo Zhongliu Linchuang* 1998; 25: 137-42.
28. Ushijima T, Makino H, Kakiuchi H, Inoue R, Sugimura T, Nagao M. Genetic alterations in HCA-induced tumors. *Princess Takamatsu Symp* 1995; 23: 281-91.
29. Imai Y, Oda H, Arai M, Shimizu S, Nakatsuru Y, Inoue T, et al. Mutational analysis of the p53 and k-ras genes and allelotype study of the RB-1 gene for investigating the pathogenesis of combined hepatocellular-cholangiocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1996; 87: 1056-62.
30. Tamano S, Ward JM, Diwan BA, Keefer LK, Weghorst CM, Calvert RJ, et al. Histogenesis and the role of p53 and ras mutations in hepatocarcinogenesis by glyceryl trinitrate (nitroglycerine) in male F344 rats. *Carcinogenesis* 1996; 17: 2477-86.
31. Lin YZ, Din L, Chen JY. The expression of c-myc, N-ras mRNA and its relations to the differentiation of preneoplastic altered hepatocytes. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1993; 15: 97-100.
32. Leon M, Kew MC. Analysis of ras gene mutations in hepatocellular carcinoma in southern African blacks. *Anticancer Res* 1995; 15(3): 859-61.
33. Kondoh N, Wakatsuki T, Hada A, Shuda M, Tanaka k, Aria M, et al. Genetic and epigenetic events in human hepatocarcinogenesis. *Int J Oncol* 2001; 18(6): 1271-8.
34. Okamoto Y. Dibutyryl cyclic AMP-induced enhancement of RB protein degradation in human hepatoma cells. *Anticancer Res* 1999; 19(6B): 5181-5.
35. Buendia MA. Genetic of hepatocellular carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2000; 10(3): 185-200.
36. Choi YL, Park SH, Jang JJ, Park CK. Expression of the G1-S modulators in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and dysplastic nodule: association of cyclin D1 and p53 proteins with the progression of hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2001; 16(4): 424-32.
37. Abuthnot P, Kew M, Fitschen W. C-fos, c-myc oncoprotein expression in human hepatocellular carcinomas. *Anti Cancer Res* 1991; 11: 921-4.