

간암세포에서 간염 바이러스 X 단백질의 전사 조절에 대한 Retinoblastoma (Rb) 종양억제 단백질의 역할

고려대학교 의과대학 외과학교실

이 상 달* · 최 상 용

= Abstract =

The Role of N-terminal Truncated Retinoblastoma Protein (pRb⁹⁴) in Transcriptional Regulation of the Hepatitis B Virus X-protein in Human Hepatoma Cells

Sang-Dal Lee, M.D. and Sang-Yong Choi, M.D.

Department of Surgery, College of Medicine, Korea University

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading causes of cancer deaths in the world, especially in Korea where 6~12% of the general population show positive for HbsAg. The accumulating studies suggest that the HBV-X protein found in HBV DNA may be the causative factor in the development of a HCC.

Method: We studied the role of retinoblastoma (Rb) protein in the suppression of the tumorigenicity of a HCC by using cytomegalovirus (CMV) co-transfected HBV-X protein with retinoblastoma protein (pRb) or N-terminal truncated retinoblastoma protein (pRb⁹⁴) in HepG2 cell lines.

Results: First, culturing HepG2 cells with CMV-Rb/liposome or CMV-Rb⁹⁴/liposome, we observed the suppression of cell growth by using hemocytometric counting of the cells stained by trypan blue and by using a [³H]thymidine incorporation assay. Then, by using a plasmid co-transfected with the chloramphenicol acetyl transferase(CAT) gene, we investigated the role of HBV-X gene in regulating the transcriptional activity in the HepG2 cells under the control of a *kB*-like sequence of HIV-1 enhancer and the suppression of its activity by pRb and pRb⁹⁴.

Conclusions: We concluded that both pRb and pRb⁹⁴ were capable of suppressing cell growth of a HepG2 cell line containing recombinant plasmids coding HBV-X protein. Furthermore, it was demonstrated that the suppression activity of pRb⁹⁴ was more potent and sustaining than that of pRb. These results suggest that if additional research is performed on the method of gene delivery, gene therapy using pRb⁹⁴ might be used as a new modality for the treatment of a HCC.

Key Words: Hepatitis B virus X-protein, Retinoblastoma protein, Retinoblastoma⁹⁴ protein

서 론

종양 억제 단백질의 하나인 Rb 단백질은 세포분

책임저자 : 이상달, 서울시 구로구 구로동 80, ☎ 152-050
고려대학교 의과대학 외과학교실

접수일 : 1998년 1월 30일, 게재승인일 : 1998년 9월 2일

*현재: 성균관대학교 삼성서울병원 일반외과 전임의

화에 강력한 억제 조절자로서 작용한다고 알려져 있으며 이때 종양억제에 관계하는 Rb 단백질의 작용 기전은 세포 증식 조절과 전사 조절기능이 서로 관계하여 이루어진다고 볼 수 있다. 면역결핍 mouse에 대한 동물실험에서 Rb 유전자가 결여된 종양세포에 정상 Rb 유전자를 대체시킨 경우 종양세포의 성장이 억제됨이 알려져 왔고 간암 환자의 44%에서 Rb 유전자의 소실을 관찰할 수 있다고 보고되고 있다.⁹⁾

우리나라는 B형 간염 표면항원(HBsAg)의 양성률 612%로 보고되고 있으며^{1,3)} 간암의 발생률과 B형 간염 바이러스(HBV) 감염 간에는 높은 상관관계가 있다고 알려지고 있다. 즉, 대다수의 간암환자의 암 조직에 HBsAg이 존재하며, 또 HBV DNA가 환자의 간세포 17번 염색체에 동화(integration) 되어 있음이 보고된 바 있다.²⁷⁾ 이때 HBV의 감염과 간암 발생 기전에 관여한다고 알려진 HBV-X 단백질은 16,560 Da의 단백질을 생산할 수 있으며 특정한 heterologous viral sequence의 전사 증강작용이 있음이 증명되었다.^{16,23)}

최근 N-terminal 112 아미노산을 제거한 retinoblastoma⁹⁴ 단백질(pRb⁹⁴)에 의해 비 소세포 폐암(non-small cell lung carcinoma)과 방광암의 종양성장이 완전히 억제되었다는 실험결과에 착안하여²⁴⁾ pRb 및 pRb⁹⁴의 간암 세포주 및 HBV-X 단백질에 대한 작용을 관찰하였다.

본 연구는 배양 간암세포에서 Retinoblastoma(pRb) 및 Retinoblastoma⁹⁴ 단백질(pRb⁹⁴)에 의한 간암세포의 성장억제 작용을 알아보고 아울러 HIV-1의 NF κ B site를 통한 HBV-X 단백질의 전사 증강 작용에 대한 조절기전을 규명하고자 하는 목적으로 시행되었다.

재료 및 방법

1) 실험 재료

본 실험에 사용되는 HepG2는 간암 세포주로서 이는 5% CO₂가 공급되는 37°C incubator에서 10% FBS를 함유한 DMEM 배양액에 배양한 것이다.

또한 이 연구에는 hepatitis B virus(HBV)-X유전자와 이의 전사활성 증강작용에 필요한 human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) promoter를 사용하였으며,^{5,15,22)} 사용된 plasmid의 경우 HIV-1 promoter-CAT plasmid와 HIV-1 promoter에서 κ B-site를 제거한 HIV-1-(NF κ B) promoter-CAT plasmid는 Temple 대학의 Dr. Ramana Reddy로부터, HBV-X 유전자와 cytomegalovirus(CMV) promoter를 연결한 CMV-X vector는 목암 생명공학연구소 유영대 박사로부터, 그리고 CMV promoter와 Rb 유전자를 연결한 CMV-Rb vector는 Jefferson Cancer Center의 Dr. Giordano로부터 제공받았으며 CMV promoter와 N-terminal truncated retinoblastoma(Rb⁹⁴)를 연결한 CMV-Rb⁹⁴ vector

의 경우 PCR 반응을 이용하여 Rb 유전자의 coding sequence의 +1로부터 +322까지 제거된 mutant Rb 유전자를 lacZ를 제거한 CMV vector의 NotI 자리에 삽입하여 제조하였다.

2) 실험 방법

간암 세포주(HepG2)에서 plasmid의 transfection 효율을 보기 위해 Rous sarcoma virus β -galactosidase plasmid를 HepG2세포에 transfection 하여 X-gal로 염색된 세포수로써 확인하였다. 또한 HepG2 간암세포 내에서 CMV-Rb 혹은 CMV-Rb⁹⁴ 단백질의 발현을 확인하기 위하여 CMV-Rb/liposome 혹은 CMV-Rb⁹⁴/liposome의 복합체 형태로 transfection한 후 세포 추출물을 제조하여 polyacrylamide gel 상에서 전기영동하고 nitrocellulose blotting을 거친 후 Rb antibody를 이용하여 Western blot을 시행하였다. 배양 간암세포에서 Rb 단백질 생산에 의한 성장 억제작용을 관찰하기 위하여 간암세포를 $1 \sim 5 \times 10^4$ cell/ml의 농도로 100 ml/ml을 96 well microplate에 분주한 후 CMV vector, CMV-Rb vector 및 CMV-Rb⁹⁴ vector를 각각 liposome과의 결합형태(CMV vector/liposome, CMV-Rb vector/liposome, CMV-Rb⁹⁴ vector/liposome)로 만들어 각각 100 ml/well 을 배양세포에 가한 다음 plate를 3일간 CO₂ 배양기에서 배양한 후 [³H]-thymidine을 1 mCi/well씩 더해주고 18~24시간 더 배양하였다. 배양된 세포를 반 자동 수확기로 유리섬유 filter에 수확하여 DNA에 유입된 [³H]의 양을 beta-counter로 측정한다. 또한 CMV vector/liposome, CMV-Rb⁹⁴ vector/liposome, CMV-Rb vector/liposome 형태로 배양세포에서 7일간 배양하고 0.2% trypan blue로 염색하여 전체 세포수와 생존 세포수(염색되지 않은 세포수)의 수를 hemocytometry로써 계산하였다.

한편 HBV-X 단백질의 transactivator로서의 작용과 HBV-X 단백질의 HIV promoter의 전사증강 작용에 대한 Rb protein의 작용을 알아보기 위해 HepG2 간암 세포에서 CAT(chloramphenicol Acetyl Transferase) assay를 시행하였다. 이는 세포를 10% FBS를 함유한 DMEM액에서 배양하여 1×10^5 세포를 60 mm petri dish에 plate한 후 HBV-X 단백질에 의한 HIV promoter의 전사증강 작용을 보기 위하여 5 mg HIV-CAT reporter plasmid 또는 HIV-(NF κ B)-CAT reporter plasmid를 각각 20 mg의 HBV-X expression

vector와 인산칼슘 침전법으로 co-transfection하였고, 또한 HBV-X 단백질에 의한 전사 증강작용이 Rb 단백질에 의해 억제되는 것을 확인 하기위하여 HBV-X expression vector를 pCMV, pCMV-Rb, pCMV-Rb⁹⁴와 인산칼슘 침전법으로 co-transfection하였다. 16시간 후 인산칼슘을 세척, 제거한 후 serum을 제거한 medium에서 12시간 배양하였다. 여기서 세포 추출물을 제조하고 이를 ¹⁴C-chloramphenicol 및 acetyl CoA와 반응시켜 thin layer chromatography plate상에서 분리한 후 X-ray 필름에서 현상하여 일치하는 spot을 채취하고 방사능의 세기를 측정(scintillation count)하여 그 양으로써 상대적 CAT activity를 조사하였다.

결 과

1) HepG2 간암 세포내의 CMV-β galactosidase vector의 Transfection assay

HepG2 간암 세포내에서 plasmid가 효과적으로 transfection되는지 확인하기 위하여 CMV-β galactosidase vector를 liposome과의 복합체를 만들어 transfection한 후 염색한 결과 효과적으로 발현됨이 확인되었다 (Fig. 1).

2) HepG2 간암 세포 내에서의 CMV-Rb 혹은 CMV-Rb⁹⁴ 단백질의 생산

CMV-Rb/liposome 혹은 CMV-Rb⁹⁴/liposome 형태로

배양 HepG2 간암 세포 내로 transfection한 후 세포로부터 핵 단백질을 제조하여 polyacrylamide gel 전기영동과 nitrocellulose blotting을 거친 후 Rb antibody를 이용한 western blot을 시행하여 band의 형성 정도로 Rb 단백질과 Rb⁹⁴ 단백질의 발현을 확인하였다 (Fig. 2).

3) Rb 단백질의 HepG2 간암 세포 내 생산에 의한 세포변화의 관찰

(1) 배양 HepG2 간암 세포에서 Rb 단백질 생산에 의한 성장억제 작용의 관찰: Rb 단백질의 세포내 생산에 의한 세포 성장에 대한 작용을 관찰하기 위하여 CMV-Rb/liposome 혹은 CMV-Rb⁹⁴/liposome 형태로 배양 HepG2 간암 세포내로 transfection한 후 세포 성장을 세포수로서 관찰한 결과 Rb 및 Rb⁹⁴ 두 단백질 모두에서 5일째부터 성장 억제 작용이 관찰되었고 wild Rb의 경우 성장억제 작용은 6일째까지 계속되다가 7일째에는 억제작용이 나타나지 않았다. 한편 Rb⁹⁴의 경우에는 이러한 억제작용은 7일째까지 현저히 나타났다 (Fig. 3-A).

(2) Assay for inhibition [³H]-thymidine incorporation: Rb 단백질의 생산에 의한 HepG2 간암세포의 proliferation 변화를 세포내 [³H]-thymidine incorpora-

Fig. 1. Transfection assay of CMV-β galactosidase vector in HepG2 cells.

Fig. 2. CMV-Rb and CMVRb⁹⁴ protein expression in HepG2 cells. 1, 2: No transfection with Rb plasmid, 3, 4: Rb⁹⁴ protein expression, 5: Rb protein expression

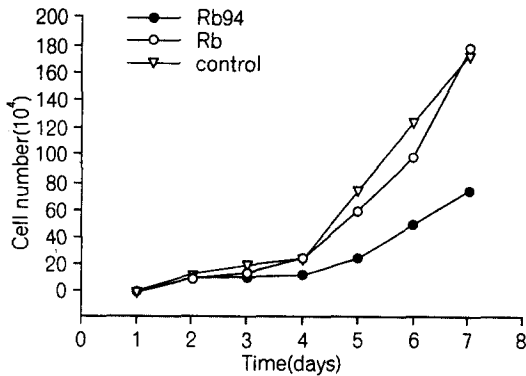


Fig. 3-A. Suppression of cell growth by Rb and Rb⁹⁴ protein in HepG2 cells.

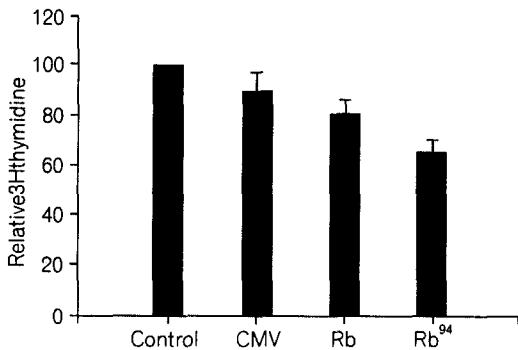


Fig. 3-B. Assay for Inhibition [³H] thymidine incorporation.

tion을 측정할 결과 wild Rb에 의한 성장 억제작용보다도 Rb⁹⁴에서 효과적인 성장 억제작용이 관찰되었다(Fig. 3-B).

4) 간암 세포주 HepG2 세포에서 HIV promoter의 전사를 조절하는 hepatitis B virus(HBV)-X 단백질의 작용

HepG2 간암세포에 HBV-X expression vector와 HIV-CAT plasmid를 co-transfection하여 시행한 CAT assay 결과 HIV-CAT 혹은 HIV(-κB site)-CAT vector의 단독에서는 낮은 CAT activity가 관찰되었으나 HIV-CAT, CMV-X 병용에서는 3배 이상의 증가를 보여 HBV-X 단백질에 의한 HIV promoter의 전사작용의 증가를 관찰할 수 있었다. 하지만 NF κB site를 제거한 HIV(-κB site)-CAT에서는 이러한 작용을 볼 수

Fig. 4-A. HIV-CAT plasmid.

HIV(-κB site)-CAT plasmid: deletion of κB site (DNA fragment from position -104 to-80)
CMV-X plasmid: Control of HBV-X gene of 600 base pair by Cytomegalo virus promoter of 2.6 kilo base

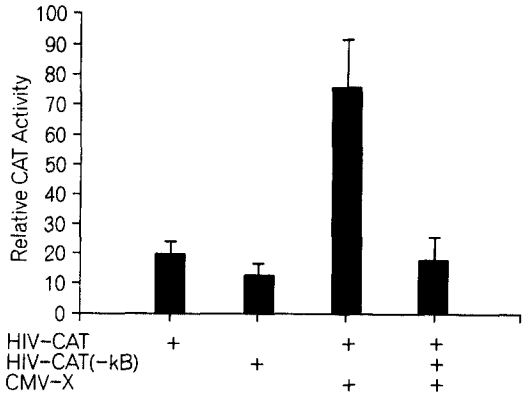


Fig. 4-B. HBV-X gene on regulating transcriptional activity in HepG2 cells under control of κB-like sequence of HIV-i enhancer.

없었다(Fig. 4-A, 4-B).

5) HIV promoter의 전사에 관계하는 HBV-X 단백질에 대한 Rb 단백질의 작용

HBV-X 단백질에 의한 HIV promoter의 전사 증강 작용에 Rb 단백질의 생산이 어떠한 작용을 하는지 알아보기 위하여 wild Rb 단백질 및 Rb⁹⁴ 단백질을 각각 HIV-CAT, CMV-X와 co-transfection 한 결과 Rb 단백질에 의한 전사억제작용이 관찰되었다. 한편 Rb⁹⁴ 단백질의 생산은 wild Rb 단백질보다도 더욱 효과적으로 HBV-X 단백질에 의한 HIV promoter의 전사작용을 억제하였다(Fig. 5-A, 5-B).

Fig. 5-A. CMV-Rb and CMV-Rb⁹⁴ vector, lacking N-terminal 112 amino acids.

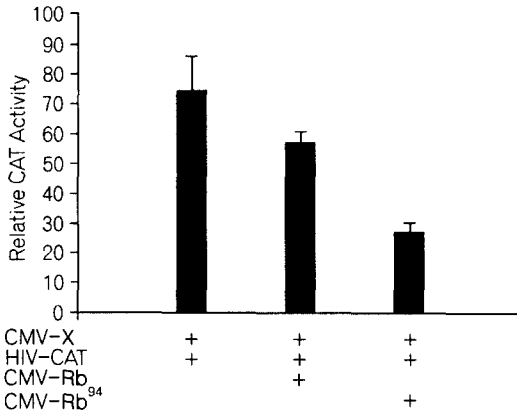


Fig. 5-B. Suppression of HBV-X gene activity by pRb and pRb⁹⁴.

고 찰

원발성 간암은 외과적 절제술, 경동맥 색전술 및 화학요법 또는 경피적 에탄올 주입 등의 치료술의 개발에도 예후가 불량한 암으로 진단 후 평균 수명이 6개월 이내이며, 근치적 절제술 후에도 5년 생존율이 20% 내외로 매우 치명적인 악성 종양이다. 원발성 간암에는 병리학적으로 간 세포암 이외에도 담관세포 암, 혈관 육종, 간 모세포 암(Hepatoblastoma) 및 여러 종류의 육종 등이 포함 되지만 흔히 '간 암'이라 함은 성인의 원발성 간암의 85% 이상을 차지하는 간 세포암을 의미한다. 간암의 발생률은 지역에 따라 크게 차이가 나서, 사하라 남쪽 아프리카, 대만, 중국 남부, 태평양 지역 등지에서는 인구 10만명 당 20명 이상의 높은 발병률을 보이는 반면에 북미, 남미, 영국, 호주, 인도 등지에서는 인구 10만명 당 5명 이하의 낮은 발병률을 보인다.^{10,13)}

우리나라에서 간암의 발생률은 남자 10만명 당

30.5명, 여자 10만명 당 7.6명으로 추정되며 특히 40세에서 60세까지의 중 장년기에서의 발생은 남자 74.8, 여자 15.6으로 세계에서 가장 높은 수준이다.²⁾ 간암의 발생 원인은 유전적 요인보다는 환경적 요인이 중요한 역할을 할 것으로 생각되어 왔는데 그 이유는 역학적으로 간암의 발생률이 한 국가 내에서 지역에 따라 차이가 나며, 간암의 발생률이 높은 곳에서 낮은 곳으로 이주한 사람들의 후손에서는 그 발병률이 낮아진다는 점들이다.

B형 간염 바이러스(HBV)의 감염은 간암의 가장 중요한 인자로서 간암 환자의 66~80%가 B형 간염 표면항원(HBsAg) 양성을 보이고²⁰⁾ HbsAg(-)인 남자의 경우보다 HbsAg(+)인 남자에게서 약 100배 이상의 높은 간암 발생률을 보인다고 보고되고 있으나⁶⁾ B형 간염이 정확히 어떠한 기전에 의해서 간암을 유발하는지에 대해서는 아직 알려지지 않고 있다. 하지만 약 83%의 HBV 양성 간암 환자에서 염색체에 삽입된 HBV-X 유전자들이 발견된다고 보고되고 있으며 HBV-X 유전자 산물에 의한 간암 발생 기전에 대해서는 명확하게 밝혀지지 않고 있으나 HBV-X 유전자 산물의 전사조절작용 기전에 관해서는 많은 보고가 있다.

HBV-X 유전자를 함유하는 vector와 HBV enhancer-core promoter에 연결된 CAT gene plasmid를 사람의 간암 세포주 PLC/PRF/5 세포에 co-transfection 하였을 때 HBV-X 단백질에 의한 CAT gene의 전사율의 증가를 보였다. HBV-X 단백질은 human immunodeficiency virus type 1(HIV-1) promoter의 전사작용을 증강시키는 것으로 알려져 있는데²²⁾ HBV 입자나 이에 감염된 사람의 간에서의 HBV-X 유전자 단백질의 존재 및 HBV-X 단백질의 간암발생에 대한 역할에 대해서는 논란의 여지가 남아 있다.¹⁶⁾ 이와 같은 HBV-X 단백질의 transactivation의 활성화는 simian virus 40(SV40) promoter, Rous sarcoma virus enhancer,¹⁸⁾ HSV-TK, HTLV-1,²⁶⁾ HIV-1,²²⁾ c-fos promoter⁴⁾ 등 대부분의 virus promoter에서는 확인되었으나 MMTV LTR이나 human methalothionein(MTIIA) promoter에서는 그와 같은 X 단백질에 의한 전사활성의 증강은 나타나지 않았다. 이밖에도 c-fos promoter내 여러 부위의 deletion mutation에 의한 CAT-assay에서 serum responsive element(SRE)-315, TPA-responsive element-296, AP-2 site들에 HBV X 단백질이 작용하는 것으로

로 알려졌으며 SRE site를 이용한 gel mobility shift assay에서 HBV-X DNA에 작용하는 단백질 결합양상의 변화는 확인되지 않았다.⁴⁾ HIV-1 promoter에서 HBV-X 단백질에 의한 전사활성의 증가는 NF kappa B site를 통하여 이루어진다고 알려지고 있으며,^{21,22)} Ap-1, AP-2, C/EBP-like sequence, CREB/ATF-2 site들이 HBV-X gene 반응 인자로서 알려지고 있다.¹⁹⁾

정상 Rb 유전자를 대치한 Rb(-) 종양세포를 면역결핍 mice에 주입하였을 때 종양 발생의 억제가 관찰되었다. 한편 Rb 유전자의 종양 세포내 주입으로 종양의 전이 억제,¹¹⁾ 항 angiogenesis,⁸⁾ 종양 세포의 immunogenicity 유발작용¹²⁾들이 보고되었다. 최근에 보고된 연구에 의하면 N-terminal 112 아미노산을 제거한 94 kd 단백질을 생산하는 pRb⁹⁴가 non-small cell lung carcinoma나 bladder carcinoma의 종양성장을 완전히 억제하였다고 했으며 이는 pRb⁹⁴가 종양 세포에서 비 인산화 혹은 저 인산화 형태로 오래 남아있어서 wild Rb 단백질에 비하여 배양 종양세포의 억제효과가 장시간 나타난다고 하였다.²⁴⁾

본 연구에서도 이들의 연구 결과와 일치하는 결과를 보여 주었는데 첫 단계로 HIV-CAT plasmid와 CMV-X plasmid를 co-transfection하였을 때 효과적인 전사율의 증강이 이루어졌으나 κ B site를 제거하였을 때 이러한 CMV-X 산물에 의한 전사 증강 작용이 사라지는 것을 확인 함으로써 HBV-X 단백질이 HIV의 특정 구역인 long terminal repeat(κ B site)를 통해 전사증강 효과를 유도하는 것을 관찰하였고 HIV promoter의 κ B site에 작용하는 CMV-X 산물의 증강작용은 종양 억제 단백질로서 알려진 full length Rb 혹은 N-terminal 112 아미노산이 제거된 Rb⁹⁴ 단백질에 의하여 억제되었고 이때 Rb⁹⁴ 단백질에 의한 억제작용은 Rb 단백질에 의한 억제 작용보다도 더욱 효과적으로 나타남을 관찰하였는데 이러한 작용이 κ B site를 통한 것인지에 대한 연구 뿐만 아니라 Rb 혹은 Rb⁹⁴ 단백질에 의한 억제 작용이 DNA와의 직접 결합에 의 함인지 혹은 간접적인 작용에 의한 인지는 매우 흥미로운 연구가 될 수 있을 것이다. 더구나 pRb⁹⁴는 Rb(-) 종양세포 뿐만 아니라 정상 Rb allele의 종양 세포에서도 성장 억제작용이 관찰되었다.²⁵⁾ 이러한 연구 결과는 mouse에게 hepatoma를 유발시켜 Rb⁹⁴를 이용한 stimulated cancer gene therapy 시도의 일련의 연구를 계속할 수 있을 것으

로 보인다.

결 론

Rb 단백질이 간 암의 중요한 원인인자의 하나로서 간주되고 있는 B 형 간염 바이러스(HBV)의 유전자의 하나인 X-단백질의 전사조절 기능에 대하여 어떠한 작용을 하는가에 대해 규명하기 위하여 HepG2 간암세포를 이용한 실험으로 다음과 같은 결과를 얻었다.

즉 HepG2 간암 세포내에서 plasmid가 효과적으로 transfection됨을 확인한 후 western blot을 통하여 Rb 단백질과 Rb⁹⁴단백질의 발현을 확인하였고 0.2% trypan blue 염색법 및 세포내 [³H]-thymidine incorporation을 측정하여 Rb 단백질과 Rb⁹⁴ 단백질에 의한 HBV-X 단백을 발현하는 HepG2 세포의 성장억제 작용을 관찰하였는데 이때 Rb⁹⁴ 단백질에 의한 작용은 더욱 효과적이고 지속적임을 알 수 있었다.

또한 HepG2 간암 세포내에서 HBV-X 단백질은 NF κ B site를 통한 HIV promoter의 전사작용을 증가시키는 사실을 이용하여 종양억제 단백질로서 알려진 Rb 유전자를 간암 세포내로 도입하여 Rb 단백질의 HBV-X 단백질에 대한 전사조절작용을 관찰한 결과 Rb 단백질이 HBV-X 단백질의 HIV promoter에 대한 작용을 억제하였으며 이때 wild Rb 단백질의 N-terminal 지역 322 bp가 제거된 Rb⁹⁴ 단백질은 wild Rb 단백질보다 더욱 효과적으로 HBV-X 단백질에 의한 HIV promoter의 전사작용을 억제하는 것을 증명하였다.

이러한 연구 결과는 Rb⁹⁴ 유전자를 이용한 유전자 요법이 간암의 치료에 새로운 분야가 될 수 있음을 시사한다.

REFERENCES

- 1) 김영식, 김정순, 허봉렬: 건강인의 B형 간염 바이러스 표지자 양성을 및 B형 간염 예방접종후 항체 형성에 관한 연구. 한국연학회지 7(1): 8, 1985
- 2) 안윤옥, 박병주, 유근영, 이효석, 김정용, Shingematsu T: 한국인 간암 발생률 추정에 관한 조사 연구. 대한암학회지 21(2): 241, 1989
- 3) 최홍재, 김영수, 박계숙 외: 한국인의 B형 간염 바이러스 표지자 양성률에 관한 연구. 대한소화기학회잡지 15: 163, 1983

- 4) Avantiaggiati ML, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, De Marzio E, Collepardo D, Levrero: The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting element. *Oncogene* 8: 1567, 1993
- 5) Balsano C, Billet O, Bennoun M, Cavard C, Zider A, Grimber G, Natoli G, Briand P, Levrero M: The hepatitis B virus X gene product transactivates the HIV-LTR in vivo. *Arch Virol Suppl* 8: 63, 1993
- 6) Beasley RP: Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. In: Fortner JC, Rhodes JE(eds) *Accomplishment in Cancer Research*. JP Lippincott, Philadelphia, 1987, p80
- 7) Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M: Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350: 429, 1991
- 8) Dawson DW, Tolsma SS, Volpert OV, Polverini PJ, Bouck NP: Retinoblastoma gene expression alters angiogenic phenotype. *Proc Am Assoc Cancer Res* 36: 88, 1995
- 9) Fujimoto Y, Hampton L, Wirth PJ, Wang NJ, Xie JP, Thorgeirsson SS: Alterations of tumor suppressor genes and allelic losses in human hepatocellular carcinoma in China. *Cancer Res* 54: 281, 1994
- 10) Lefkowitz JH: The etiology and morphology of primary malignant liver tumors. *Surg Clin North Am* 61: 169, 1981
- 11) Li J, Hu SX, Xu K, Perng GS, Zhang C, Benedict WF, Xu HJ: Effects of expression of the retinoblastoma(RB) and p53 tumor suppressor genes on tumor cell invasion in vitro. *Proc Am Assoc Cancer Res* 36: 78, 1995
- 12) Lu Y, Ussery GD, Muncaster MM, Gallie BL, Blank G: Evidence of retinoblastoma protein(RB) dependent and independent IFN gamma responses: RB coordinately rescues IFN-gamma induction of MHC class II gene transcription in noninducible breast carcinoma cells. *Oncogene* 9: 1025, 1994
- 13) Parkin DM, Stjernward J, Muir CS: Estimates of the Worldwide frequency of twelve major cancers. *Bulletin of the WHO* 62: 163, 1984
- 14) Pasquinelli C, Bhavani K, Chisari FV: Multiple oncogenes and tumor suppressor genes are structurally and functionally intact during hepato-carcinogenesis in hepatitis B virus transgenic mice. *Cancer Res* 52: 2823, 1992
- 15) Seto E, Yen TS, Peterlin BM, Ou JH: Trans-activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by the hepatitis B virus X protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8286, 1988
- 16) Siddiqui A, Jameel S, Mapoles J: Expression of the hepatitis B virus X gene in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci* 85: 2513, 1987
- 17) Smith ML, Chandar N, Lombardi B: Low frequency of retinoblastom gene alterations in rat hepatocellular carcinomas. *Mol Carcinog* 8(4): 228, 1993
- 18) Spandau DF, Lee CH: Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein. *J Virol* 62: 427, 1988
- 19) Takada S, Koike K: Mechanism of hepato-carcinogenesis by hepatitis B virus. *Nippon Rinsho* 51: 364, 1993
- 20) Tong MJ, Sun S, Schaefer BT, Chang N, Lo K, Peter RL: Hepatitis-associated antigen and hepatocellular carcinoma in Taiwan. *Ann Int Med* 75: 687, 1971
- 21) Twu JS, Chu K, Robinson WS: Hepatitis B virus X gene activates kappa B-like enhancer sequences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5166, 1989
- 22) Twu JS, Rosen CA, Haseltine WA, Robinson WS: Identification of a region within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat that is essential for transactivation by the hepatitis B virus gene X. *J Virol* 63: 2857, 1989
- 23) Twu JS, Robinson WS: Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2046, 1989
- 24) Xu HJ, Zhou Y, Seigne J, Perng GS, Mixon M, Zhang C, Li J, Benedict WF, Hu SX: Enhanced tumor suppressor gene therapy via replication-deficient adenovirus vectors expression an N-terminal truncated retinoblastoma protein. *Cancer Research* 56: 2245, 1996
- 25) Xu HJ, Xu K, Zhou Y, Li J, Benedict WF, Hu SX: Enhanced tumor cell growth suppression by an N-terminal truncated retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9837, 1994
- 26) Zahm P, Hofschneider PH, Koshy R: The HBV X-ORF encodes a transactivator: a potential factor in viral hepato-carcinogenesis. *Oncogene* 3: 169, 1988
- 27) Zhou YZ, Slangle BL, Donehower LA, van Tuinen P, Ledbetter DH, Butel JS: Structural analysis of a hepatitis B virus genome intergrated into chromosome 17p of a human hepatocellular carcinoma. *J Virol* 62(11): 4224, 1988