

## 소아의 간모세포종에서 종양관련단백의 발현 양상과 병리학적 특성과의 연관성

서울대학교 의과대학 병리학교실, 소아과학교실<sup>1</sup> 및 외과학교실<sup>2</sup>

김한성 · 안효섭<sup>1</sup> · 박귀원<sup>2</sup> · 장자준

### Expressions of the Tumor Associated Proteins and Their Correlation with the Pathologic Features in Childhood Hepatoblastoma

Han Seong Kim, M.D., Hyo Seop Ahn, M.D.<sup>1</sup>, Kwi Won Park, M.D.<sup>2</sup>  
and Ja-June Jang, M.D.

Department of Pathology, Pediatrics<sup>1</sup> and Surgery<sup>2</sup>,  
Seoul National University College of Medicine

Hepatoblastoma is a rare malignant liver tumor found in children. Its biological characteristics and prognostic factors have not been well known. We investigated 29 cases of hepatoblastoma, registered in university hospitals in Seoul from 1984 to 1996. By the immunohistochemical method, p53, Waf-1 (p21), bcl-2, heat shock protein 70 (hsp70), c-jun, transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) expressions were studied. Those data were compared with clinico-pathologic features; age, sex, tumor size, tumor stage and histologic subtypes. Expression of p53 and bcl-2 were each observed separately in single cases. Expression of c-jun was more frequently noted in patients at higher stages. Expression of TGF- $\alpha$  decreased in the order of pure fetal, mixed, embryonal and small cell anaplastic subtypes. Cumulative survival rate was lower in females than in males and in patients with a higher tumor stage. According to histologic subtypes, survival rates decreased in the order of pure fetal, mixed, embryonal and small cell anaplastic subtypes. Survival rate was lower in patients with c-jun expression. Group of TGF- $\alpha$  labelling index under 19 showed a lower survival rate than that over 19. In conclusion, we found that tumor associated proteins, c-jun and TGF- $\alpha$ , are closely related to the prognosis of hepatoblastoma but p53 and bcl-2 may not be related to it. (*Korean J Pathol* 1997; 31: 538 ~ 545)

**Key Words:** Hepatoblastoma, c-jun, TGF- $\alpha$ , Survival

접 수: 1997년 1월 16일, 게재승인: 1997년 3월 25일

주 소: 서울시 종로구 연건동 28, 우편번호 110-799

서울대학교 의과대학 병리학교실, 장자준

\*이 연구는 '95년도 교육부 학술연구조성비(기초의학) 및 '96년도 서울대학교병원 지정진료연구비(02-96-204)의 지원을 받았음.

## 서 론

간모세포종은 드문 종양이지만 소아에서 간에 발생하는 원발성 악성종양 중 가장 흔한 종양이다. 전 세계적으로는 한 해 발생율이 2.5%까지 보고 되었으며<sup>1</sup>, 우리나라에서는 2.9에서 5%까지 보고 되었다<sup>2</sup>. 간모세포종은 주로 2세 미만에서 발생하며, 남녀비는 1.5 : 1에서 1.75 : 1로 남아에서 약간 더 많고 특별한 인종에서 높은 발생빈도를 보이지는 않는다<sup>1,3</sup>. 임상소견으로는 복부의 종괴, 식욕부진, 체중감소, 빈혈, 발열, 황달등이 나타날 수 있지만 복부의 종괴를 주소로 내원하는 경우가 보통이다. 간모세포종은 다양한 선천성 기형과 동반하며 그 빈도는 약 5.5%이다<sup>4</sup>.

간모세포종은 진단시 종괴가 너무 커서 약 70%의 환자에서 수술이 불가능하여<sup>5</sup> 최근에는 항암치료후 수술을 하는 추세이다. 간모세포종의 예후는 수술후 병기와 비례하는 것으로 알려져 있고<sup>6,7</sup>, 예후가 나쁜 위험인자로는 나이가 1세 미만, 종괴가 큰 경우, 조직학적 아형이 소세포 미분화형 및 성인의 간세포암형등이 거론되고 있다<sup>8</sup>.

지금까지 알려진 간모세포종의 세포유전학적 특징은 11번염색체의 소실<sup>27</sup>, 특히 11p15에 위치한 윌름씨종양과 관련된 WT2 유전자의 이종접합성(heterozygosity)의 소실<sup>13</sup>과 1번 염색체의 이종접합성의 소실이 보고된 바있다<sup>28</sup>. 분자생물학적으로는 가족성 선종성 폴립종과 관련된 APC유전자의 체세포 돌연변이(somatic mutation)<sup>29</sup> 및 p53의 돌연변이<sup>30</sup>등이 보고되었다. 그러나, 간모세포종 발생과 관련된 종양 관련 단백질 발현과 예후와의 상관성에 대한 연구 결과들은 드문 실정이다.

이에 저자들은 간모세포종의 종양생물학적 특성과 예후와의 관련성을 알아보고자 종양억제 유전자인 p53, 세포주기 조절인자로 알려진 waf-1(p21), apoptosis를 억제하는 bcl-2, heat shock protein인 hsp 70, 암유전자인 c-jun, 세포의 성장과 분화에 관여하는 것으로 알려진 TGF- $\alpha$ 등의 종양관련단백질에 대한 면역조직화학적 검색을 하였다. 그리고, 이 결과를 환자의 나이, 성별, 종양의 크기, 병기, 조직학적 아형, 생존율등의 임상-병리학적 특성과 비교하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

1984년부터 1996년까지 서울시내 주요 대학병원

에 내원했던 간모세포종 환자에서 수술로 절제된 조직 29예의 파라핀 포매표본을 대상으로 하였다(서울대 어린이 병원 19예, 고대 안암병원 1예, 삼성의료원 2예, 연세대 신촌세브란스병원 1예, 서울중앙병원 3예, 한강성심병원 1예, 부천세종병원 1예, 한양대병원 1예, 무순).

### 2. 방 법

병목검토와 전화방문을 통해서 환자의 병기, 전이, 생존유무와 생존기간등을 조사하였다. 병리 보고서를 검토하여 종양의 크기와 조직학적 특징등의 자료를 얻은 후, Hematoxyline-Eosin염색 슬라이드를 검토하여 대표적인 파라핀 블록을 선정하고 면역조직화학 검사를 시행하였다.

1) 면역조직화학검사: 연구에 사용된 단일클론 항체는 p53(CM1, Novocastra Lab. Ltd, UK), bcl-2(Santa Cruz, USA), waf-1(Anti-Cip1, Transduction Lab., Kentucky, USA), anti-hsp70(SPA-810, StressGen, USA), c-jun(Oncogene Science Inc. NY, USA), TGF- $\alpha$ (Oncogene Science Inc. NY, USA)항체들이다.

면역조직화학 검사를 위해서 파라핀 블록에서 절편을 취하여, 농도가 다른 xylene에 단계적으로 담가 파라핀을 빼고, 무수알코올(100%→70%)에서 탈수시켰다. microwave로 온도를 달리하여 2회 가열하여 항원 회복(retrieval)을 시도한 뒤 20분간 metanolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Autoblocker)에 반응시켜 내인성 peroxidase를 억제하였다. 정상단백질과의 비특이적 반응을 없애기 위해서 30분간 정상 단백질과 반응하는 Protein blocker와 반응시켰다. 일차단일 클론항체와 반응시킨 후 다음날까지 4°C 냉장고에 보관하였다. 다음날 2차 항체와 반응 후 Streptoavidin-biotin detection system (Zymed)을 사용한 후 3'3 Diaminobenzidine을 이용해서 발색하였으며, Hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다. 양성 대조표본으로는 각 항체에 반응하는 항원을 가진 것으로 알려진 조직을 사용하였고, 음성대조표본을 위해선 일차항체를 뺀 후 반응시켰다.

### 3. 계수방법

면역조직화학 검사 후 염색된 범위(0%, 5% 미만, 5 이상~50% 미만, 50% 이상)와 염색의 강도(0:없음, ±: 흐림, 1: 약함, 2: 중등도, 3: 강함)에 따라 등급을 나누었고, 5% 이상의 세포가 중등도 이상의 강도로 염색되면 양성으로 판독하였다. 양성율이 높았던 TGF- $\alpha$ 는 고배율( $\times 400$ 배) 4곳의 시야에서 1000개의 세포를 세어 표지지수(Labeling Index)를 구하

었다.

#### 4. 통계 분석방법

사용된 통계 패키지는 PC-SAS for DOS(version 6.04)였고, 자료의 통계적 유의성을 알아보기 위해서 Chi-Square(Fisher's exact test 포함) test, Kruskal-Wallis test, Kaplan-Meier test, Gehan's generalized Wilcoxon 법을 적용하였다.

## 결 과

### 1. 임상적 특징

총 29예의 간모세포종 환자의 남녀비는 1.6:1(남아 18, 여아 11예)로 남아에서 약간 많았으며, 평균연령은 약 2.7세(32개월)였고, 가장 어린환아는 생후 1개월, 가장 나이가 많은 환아는 16세였다. 그러나 만 2세를 넘는 경우는 10예였고, 19예(65.5%)가 생후 2세이전에 발생하였다. 한 증례에서 왼쪽 다리가 두꺼워진 편측비대(hemihypertrophy)가 관찰되었다.

### 2. 검사실 소견

모든 증례에서 진단당시 알파태아단백( $\alpha$ -fetoprotein)이 증가되어 있었으며, 15예에서 7만  $\mu$ g/L 이상 증가하였다. 혈색소의 평균값은 10.4 g/dl로 경한 빈혈이 있었으며, 혈청 콜레스테롤치가 평균 213.2 mg/dl로 약간 증가하였다.  $\beta$ -hCG값은 증가된 증례가 없었으며, B형간염 바이러스의 표지자인 HBs항원에 양성인 경우는 없었고, anti-HBs항체를 보유한 경우는 9예, anti-HCV항체를 보유한 경우는 1예 있었다.

### 3. 병리학적 특징

종괴의 위치는 우엽이 16예로 가장 많았고, 좌엽이 7예, 좌우엽에 걸쳐 위치한 경우가 6예의 순이었다. 장경으로 종괴의 크기를 나타낼 때 평균 장경은 10.5 cm(1~25 cm)이었다. 종괴의 갯수는 대부분 1개였지만(18예), 2개 이상 다발성으로 발생한 경우도 11예나 되었다.

간모세포종 29예를 조직학적 유형에 따라 나누어 보았을 때<sup>9,10</sup>, 상피형이 20예, 미분화 소세포형이 2예, 유골(osteoid)과 원시간질(primitive mesenchyme)성분이 있는 혼합형이 7예였다. 상피형 중에서는 배아형(Embryonal) 세포와 태아형(Fetal) 세포가 혼합된 배아-태아형이 13예, 태아형 세포성분만으로 구성된 순수태아형 증례가 7예였다.

### 4. 조직학적 유형과 병기와의 관계

병기를 알 수 있었던 28예를 병기별로 분류하였을 때<sup>11</sup>, 병기 I이 19예, 병기 III이 2예, 병기IV가 7예였다. 병기가 IV인 7 증례 중 4예는 폐에, 3예는 복강을 침범하였으며, 폐에 전이된 1예는 신장에도 전이가 있었다.

조직학적 아형에 따라 병기를 나누어 보았을 때 순수태아형은 6/7(85.7%)예, 혼합형 5/6(83.3%)예, 배아-태아형은 8/13(61.5%)가 병기 I이었지만 미분화 소세포형 증례는 2증례 모두 발견 당시부터 병기 IV였다(Table 1).

### 5. 면역조직화학검사

간모세포종의 조직학적 유형에 따른 종양관련단백질의 발현빈도는 Fig. 3에서 표시한 바와 같다. 면역조직화학적 염색이 가능했던 총 28예 중에서 p53와 bcl-2는 각각 한 증례에서만 양성반응을 보였다. waf-1은 8예(28.6%)에서 양성을 보였고, 염색된 곳은 핵내였다(Fig. 1). Heat shock protein 70(hsp70)은 세포질에 염색이 되었고 6예(21.4%)에서 양성을 보였다. c-jun은 8예(28%)에서 양성을 보였고 핵 혹은 세포질에 염색되었으며, 염색이 된 세포들은 주로 분화가 나쁜 배아형 또는 소세포형 세포들이었다. TGF- $\alpha$ 은 배아형 또는 소세포미분화형 세포들에서는 주로 세포질에 염색되었고, 태아형 세포들은 주로 핵내염색이 되었다(Fig. 2).

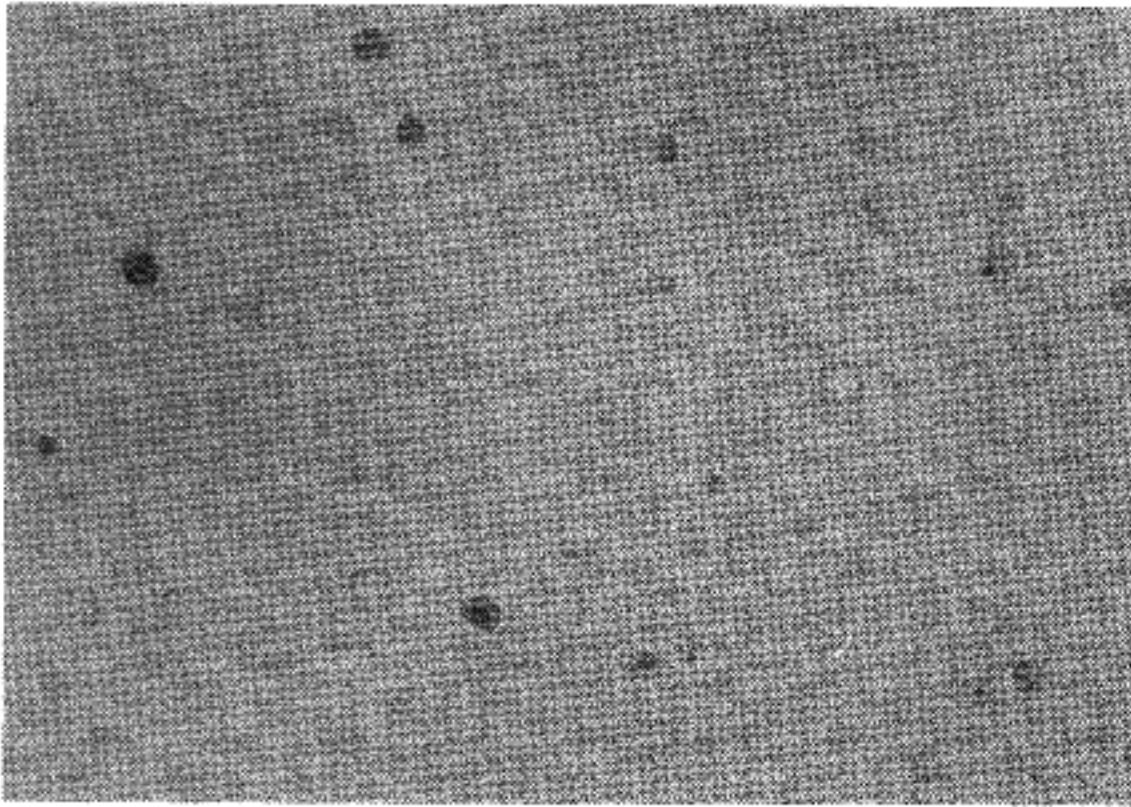
### 6. 종양관련단백질 발현과 임상-병리학적 특성과의 비교

종양관련단백질의 발현이 어떤 의미를 가지는가

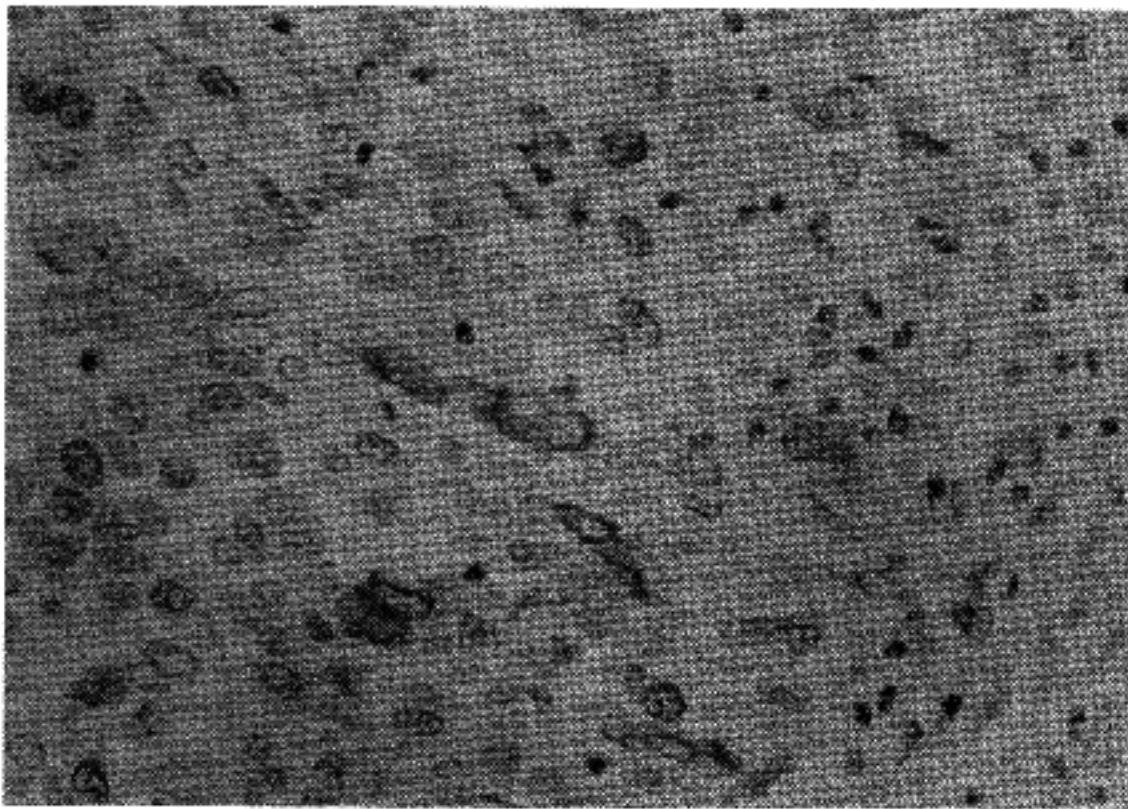
Table 1. Clinical stages according to histologic subtypes

	Epithelial			Mixed	Smal cell	Total
	F,	E+F	Subtotal			
Stage I	6	8	14	5	0	19( 68%)
Stage II	0	0	0	0	0	0( 0%)
Stage III	1	1	2	0	0	2( 7%)
Stage IV	0	4	4	1	2	7( 25%)
Total	7	13	20	6	2	28(100%)

\*Note: F: fetal, E+F: Embryonal and Fetal, M: mixed, S: small cell anaplastic



**Fig. 1.** Waf-1 expression: scattered intranuclear stainings are seen mainly in fetal cells.



**Fig. 2.** TGF- $\alpha$  expression: both nuclear and perimembranous expressions are seen.

알아보고자 임상-병리학적인 자료들과 비교하였다. 이를 위해서 waf-1, hsp70, c-jun은 양성-음성군으로 TGF- $\alpha$ 에 대해서는 표지지수 19%(평균)를 기준으로 두 군으로 나누었다. 종양관련단백질의 발현양상과 환아의 나이, 성비 및 조직학적 유형들은 군 간에 차이를 보이지 않았다. 그러나, TGF- $\alpha$ 는 표지지수가 19 미만인 군이 종양의 평균장경이  $12.25 \pm 1.47$  cm으로 표지지수가 19 이상인 군의  $8.3 \pm 0.68$  cm(평균

$\pm$ 표준오차,  $p=0.01$ , Wilcoxon rank sum test)보다 높았고, 조직학적 아형에서도 표지지수가 순수태아형( $25.24 \pm 8.17$ ), 혼합형( $20.02 \pm 10.49$ ), 배아-태아형( $17.32 \pm 10.49$ ), 소세포 미분화형( $4.15 \pm 5.72$ )으로 유의한 차이를 보였다( $p=0.04$ , Kruskal-Wallis test). c-jun 양성군은 병기 III 혹은 IV인 경우가 62.5%로 병기가 높은 군에서 더 많은 발현을 보였다( $p=0.014$ , Fisher's exact test, Fig. 4).

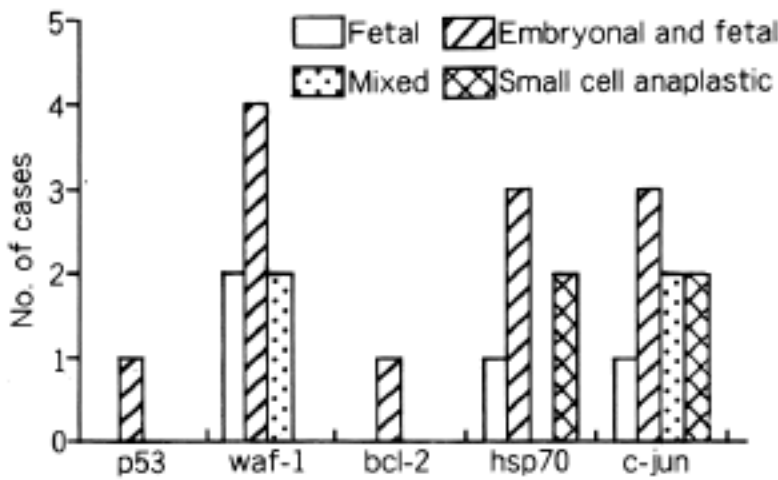


Fig. 3. Expression of tumor associated proteins according to histologic subtypes.

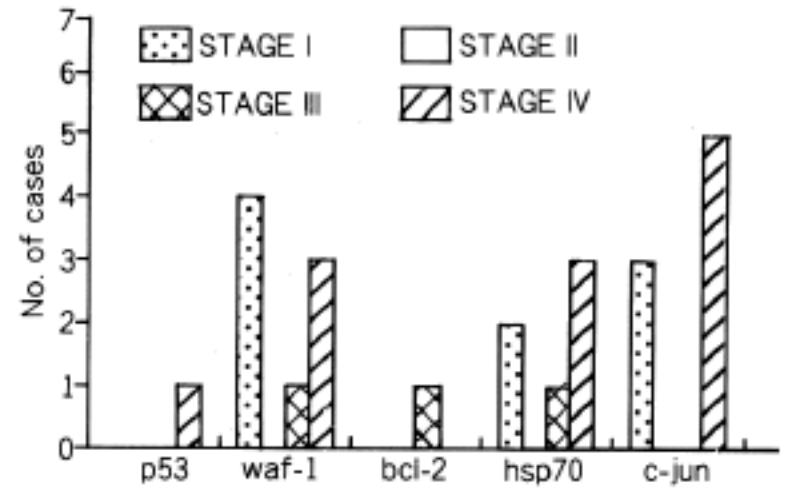


Fig. 4. Expression of tumor associated proteins according to clinical stages.

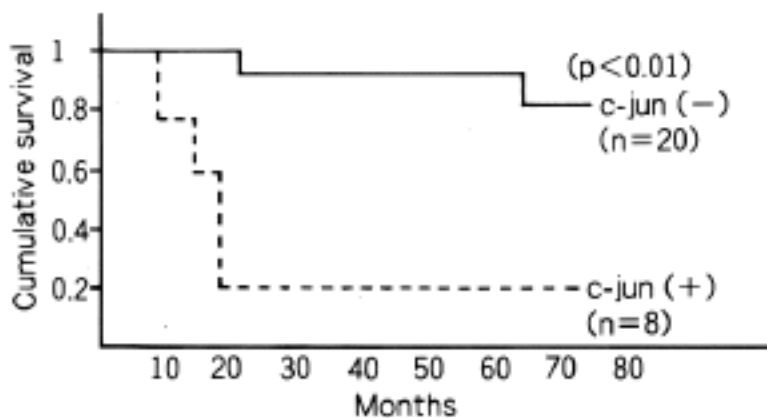


Fig. 5. Survival curves according to c-jun expression.

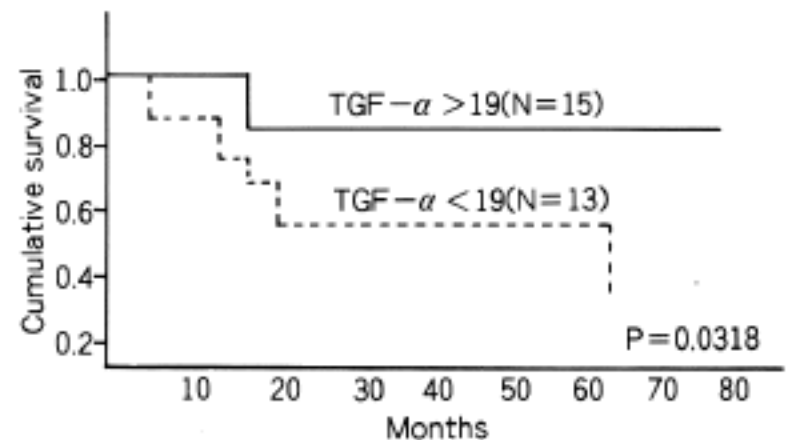


Fig. 6. Survival curves according to TGF-α expression.

7. 생존율: 임상-병리학적 예후인자, 종양관련 단백질과의 비교

총 29예의 간모세포종 환자의 2년 누적생존율은 72%, 5년 누적생존율은 57.9%였다. 나이(1세기준), 종양의 크기(10 cm기준)에 따라 두 군으로 나누어 비교했을 때 생존율에 통계학적 유의한 차이는 없었다. 그러나, 성별이 여아(p=0.047, Gehan's generalized Wilcoxon method)인 경우, 병기가 III 혹은 IV군(p=0.0044)에서 생존율이 낮았다. 조직학적 아형 별로는 순수태아형, 혼합형, 배아-태아형, 미분화 소세포형 순으로 생존율이 낮았다(p=0.047). 종양관련단백질 중에서는 c-jun이 양성인 군(p=0.008, Fig. 5), TGF-α 표지 지수가 19 미만인 군(p=0.0038, Fig. 6)에서 생존율이 통계학적으로 유의하게 낮았다.

고 찰

조사된 간모세포종의 임상적인 특징은 남녀비 1.6 : 1,

2세 이하에서 65.5%가 발생하여 이미 알려져 있는 보고들과 일치하였다<sup>13</sup>. 그러나, 조직학적인 분류에서 상피형과 혼합형이 약 1.3 : 1 정도인 외국의 보고<sup>12</sup>와 달리 본 연구에서는 상피형이 29예중 22예(약 3 : 1)로 혼합형보다 월등히 많았다. 또한, 외국의 경우 선천성 기형이 약 5.5%에서 보고되었고, 특히, 편측비대는 간모세포종 환자의 2%에서 발현된다고 보고<sup>13</sup>하였는데, 본 증례 29예중 1예(약 3%)에서 편측비대가 있었고, 기타 기형은 없었다.

Ruck등<sup>14</sup>은 배아형, 소세포 종양세포에서 p53의 발현이 높았고 예후도 나쁘다고 하였지만, 본 연구에서는 p53이 한 증례에서만 양성을 보였다. 이러한 현상이 Kennedy등<sup>26</sup>의 기술과 같이 간모세포종에서 돌연변이가 실제로 없어서 발현이 없는 것인지 면역조직화학검사로 발견안되는 돌연변이가 있는지는 분자생물학적 검증이 필요하다고 생각된다. 이에 반해서 p53의 하향 효과체(downstream effector)로 알려진 waf-1 단백질<sup>15</sup>은 28예중 8예에서 염색이 되었다(약 30%). waf-1은 p53에 의해서 전사수준(transcription level)에서 조절을 받고 그것의 매개자라고 보고한

저자들이 있다<sup>16</sup>. 그러나, p53에 독립적인 경로로 활성화 될 수 있다는 보고도 있다<sup>17</sup>. 본 연구에서는 p53유전자의 발현이 없이 waf-1 단백질의 발현이 있었던 증례가 7예나 되므로 간모세포종에 있어서는 후자의 기전이 주요하게 작용할 수 있다고 생각된다. bcl-2의 경우는 한 증례에서만 염색되었는데, 이는 Charlote등<sup>18</sup>이 보고와 같이 bcl-2가 간세포 기원의 종양에서는 거의 관련성을 보이지 않는 것으로 이해된다.

hsp70은 28예중 6예(21.4%)에서 발현이 되었고, c-jun은 28예 중 8예(28.6%)에서 양성을 보였다. 그런데, 이들 단백질이 염색된 세포들은 주로 분화가 나쁜 배아형, 소세포미분화형 세포들이었다. hsp70의 경우 저산소상태에서 세포의 단백질을 보호하는 기능을 가지고 있다고 알려져 있는데<sup>19</sup>, 분화가 좋지 않은 암세포들이 hsp단백을 만들어 항암치료시 암세포들을 보호할 가능성이 있을 것으로 생각된다. c-jun은 간에서 HBx항원과 관련되어 간세포암의 발암기전에 참여하는 것으로 보고 되었고<sup>20</sup>, 정상적인 간 발생 최종단계에서 c-fos혹은 그 관련단백질과 복합체를 이루어 간의 형성(organogenesis)에 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되었다<sup>31</sup>. c-jun이 본 연구에서 비록 적은 수(8예)에서 발현을 보였으나 생존율과 조직학적 유형등과 관련성을 보인 것은 유의할 만한 일인데, 간모세포종에서 그 역할을 알기 위해서는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

TGF- $\alpha$ 는 간세포의 중요한 증식인자로서 간종양에서는 주로 간세포암의 발암기전에 관련된 단백질로<sup>21,22,23</sup> 알려져 있는데 간모세포종과의 관련성은 보고된 바가 없었다. TGF- $\alpha$ 는 Epidermal growth factor (EGF)의 수용체에 결합하므로 주로 세포막을 따라 세포질에 발현하는 것으로 알려져 있는데<sup>24,25</sup>, 정상적으로 흰쥐의 간세포<sup>32</sup>와 뇌교세포<sup>33</sup>, 사람 태반의 세포영양막<sup>34</sup>, 그리고 십이지장에서 발생한 선암종<sup>35</sup> 등에서 TGF- $\alpha$ 의 핵내발현이 보고되었다. 본 연구에서는 대부분의 증례에서 핵내에 발현을 보였으며, 일부(9증례)에서만 세포질 발현을 보였다. 세포질 발현을 한 것만을 양성으로 판정을 하였을 때는 양성군과 음성군 사이에 임상-병리학적 특성 및 생존율에 있어서 별다른 차이를 보이지 않았다. 그러나, 핵내에 발현한 것을 포함하여 표지지수를 구하고 19를 기준으로 하여 두 군으로 나누었을 때, TGF- $\alpha$  저발현군이 종양의 크기, 생존율 및 병기 분포에서 고발현군과 유의한 차이를 보였다. 조직학적 아형별로는 분화도가 좋은 태아형과 혼합형등에서 TGF- $\alpha$

표지지수의 평균이 높았다. 이상의 소견으로 TGF- $\alpha$ 는 간모세포종에서 종양의 발생 및 분화와 관련이 있고, 발현정도와 예후와의 관련성이 있는 것으로 보인다. 최근 대장, 직장암에서도 TGF- $\alpha$  저발현군에서 예후가 불량하다는 보고<sup>36</sup>가 있어, TGF- $\alpha$  발현과 종양의 분화 및 예후와의 관련성이 간모세포종의 다른 종양에서도 있을 것으로 추정된다.

## 결 론

29예의 간모세포종을 대상으로 병리학적 특성과 종양관련 단백질의 발현이 예후에 미치는 영향을 검색한 결과 다음의 결론을 얻었다.

첫째, 간모세포종 환자의 2년 누적생존율은 72%, 5년 누적생존율은 57.9%였다.

둘째, 생존율은 여아, 병기가 III 혹은 IV인 군, c-jun의 발현을 보이는 군, TGF- $\alpha$ 의 표지지수가 19 미만인 군에서 낮았다.

셋째, TGF- $\alpha$ 의 발현은 소세포 미분화형, 배아-태아형, 혼합형, 순수 태아형의 순으로 높았고, 표지자가 19 미만인 군에서 종양의 크기가 유의하게 컸다.

넷째, hsp70이나 c-jun은 분화가 나쁜 세포들에서 주로 발현되었다.

다섯째, 간모세포종에서 p53, bcl-2의 발현은 거의 관찰되지 않았다.

## 감사의 글

귀한 증례들을 넓은 아량으로 기증해주신 고려의대 염범우 교수님, 연세의대 박찬일 교수님, 울산의대 유은실 교수님, 삼성의료원 서연림 교수님, 한림의대 손진희 교수님, 한양의대 박문향 교수님, 부천세종병원 오미혜 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 또한, 논문을 위해서 수고해주신 명난경, 정영미 선생님들에게도 감사합니다.

## 참 고 문 헌

1. Carl Pochedly. Neoplastic disease of childhood. Harwood Academic Publishers, 1994; 973.
2. 박경덕, 성기웅, 안효섭. 소아의 간아세포종과 간세포암종의 항암치료에 대한 연구. 대한소아과학회지 1995; 38: 195-206.
3. Stocker JT. Hepatic tumors in children, Liver disease in children St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1994;

- 901-29.
4. Khosla A. Correspondence to the editor. *J Pediatr Surg* 1990; 25: 924.
  5. Pierro A, Langein AM, Riller RM. Preoperative chemotherapy in "unresectable" hepatoblastoma. *J Pediatr Surg* 1989; 24: 24-9.
  6. Conran RM, Hitchcock CL, Waclawiw MA. Hepatoblastoma: the prognostic significance of histologic type. *Pediatr Pathol* 1992; 12: 167-83.
  7. McSweeney WJ, Bove KE, McAdams AJ. Spontaneous regression of a putative childhood hepatoma: a reappraisal. *Am J Dis Child* 1973; 125: 596-8.
  9. Ishak KG, Glunz PR. Hepatoblastoma and hepatocarcinoma in infancy and childhood. *Cancer* 1967; 20: 396-422.
  10. Kasai M, Watanabe I. Histologic classification of liver-cell carcinoma in infancy and childhood and its clinical evaluation. *Cancer* 1970; 25: 551-63.
  11. King DR, Ortega J, Campbell J. The surgical management of children with incompletely resected hepatic cancer is facilitated by intensive chemotherapy. *J Pediatr Surg* 1991; 26: 1074-81.
  12. Suchy FJ. Liver disease in children. St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1994; 917.
  13. Koufos A, Hansen MF, Lampkin BC. Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilms' tumor. *Nature* 1984; 309: 170-4.
  14. Ruck P, Xiao JC, Kaiserling E. P53 protein expression in hepatoblastoma. *Ped Pathol* 1994; 14: 79-85.
  15. El-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM. Waf1/Cip1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994; 54: 1169-74.
  16. Sun Y, Hildesheim A, Li H. No point mutation but a codon 31ser-->arg polymorphism of the Waf-1/Cip-1/p21 tumor suppressor gene in nasopharyngeal carcinoma: the polymorphism distinguishes Caucasians from Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev* 1995; 4: 261-7.
  17. Steinman RA, Hoffman B, Iro A, Guillouf C, Liebermann DA, el Houseini ME. Induction of p21(WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* 1994; 9: 3389-96.
  18. Charlotte F, L'Hermine A, Martin N. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 460-5.
  19. Patel B, Khaliq A, Jarvis-Evans J, Boulton M, Arrol S. Hypoxia induces Hsp70 gene expression in human hepatoma(HepG2) cells. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36: 907-12.
  20. Twu JS, Lai MY, Chen DS, Robinson WS. Activation of protooncogene c-jun by the X protein of hepatitis B virus. *Virology* 1993; 192: 346-50.
  21. Jhappan C, Stahle C, et al. TGF- $\alpha$  Overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 1990; 61: 1137-46.
  22. Hsia CC, Axiotis CA, Di Bisceglie AM, Tabor E. TGF- $\alpha$  in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. *Cancer* 1992; 70: 1049-56.
  23. Kaufmann WK, Zhang Y, Kaufmann DG. Association between expression of TGF- $\alpha$  and progression of hepatocellular foci to neoplasms. *Carcinogenesis* 1992; 13: 1481-83.
  24. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor  $\alpha$  may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 1558-62.
  25. Massague J. Transforming growth factor-alpha. *J Biol Chem* 1990; 265: 21393-96.
  26. Kennedy SM, Macgeogh C, Jaffe R, Spurr NK. Overexpression of the oncoprotein p53 in primary hepatic tumors of childhood does not correlate with gene mutations. *Hum Pathol* 1994; 25: 438-42.
  27. Albrecht S, von Schweinitz D, Waha A, Kraus JA, von Deimling A, Pietsch T. Loss of maternal alleles on chromosome arm 11p in hepatoblastoma. *Cancer Res* 1994; 54: 5041-44.
  28. Kraus JA, Albrecht S, Wiestler OD, von Schweinitz D, Pietsch T. Loss of heterozygosity on chromosome 1 in human hepatoblastoma. *Int J Cancer* 1996; 67: 467-71.
  29. Oda H, Imai Y, Nakatsuru Y, Hata J, Ishikawa T. Somatic mutation of the APC gene in sporadic hepatoblastoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3320-3.
  30. Oda H, Nakatsuru Y, Imai Y, Sugimura H, Ishikawa T. A mutational hot spot in the p53 gene is associated with hepatoblastoma. *Int J Cancer* 1995; 60: 786-90.
  31. Zaret KS. Molecular genetics of early liver development. *Ann Rev Physiol* 1996; 58: 213-51.
  32. Burr AW, Toole K, Mathew J, Hines JE, Chapman C, Burt AD. Transforming growth factor- $\alpha$  expression is altered during experimental hepatocarcinogenesis. *J Pathol* 1996; 179: 276-82.
  33. Ruiz CD, Tomas RP, Domingo J, Ferrer I. Immunohistochemical localization of transforming growth factor- $\alpha$  in choroid plexus of the rat and chicken. *Neuroscience Letters* 1993; 164: 44-6.

34. Hofmann GE, Horowitz GM, Scott RT, JR., Navot D. Transforming growth factor- $\alpha$  in human implantation trophoblast: Immunohistochemical evidence for autocrine/paracrine function. *J Clin Endocrinol Meta* 1993; 76; 781-5.
  35. Zhu L, Kim K, Domenico DR, Appert HE, Howard JM. Adenocarcinoma of duodenum and ampulla of Vater: Clinicopathology study and expression of p53, c-neu, TGF- $\alpha$ , CEA, and EMA. *J Surg Oncol* 1996; 61; 100-5.
  36. Younes M, Fernandez L, Lechago J. Transforming growth factor alpha expression in biopsies of colorectal carcinoma is a significant prognostic indicator. *Anti-cancer Res* 1996; 16; 1999-2004.
-