

한국인의 간암에서 형광-PCR법을 이용한 Microsatellite Instability의 분석

¹서울의과학연구소 · 서울임상병리검사센터
²아주대학교 의과대학 외과학교실,
³한양대학교 이과대학 생화학 및 분자생물학과

박영석^{1,3} · 왕희정² · 오문주¹ · 김은하¹
이경옥¹ · 김명옥² · 채영규³

Microsatellite Instability in Korean Hepatocellular Carcinoma using Fluorescent-PCR

Young-Suk Park, Ph.D.^{1,3}, Hee-Jung Wang, M.D.², Moon-Ju Oh,¹
Eun-Ha Kim,¹ Kyung-Ok Lee, Ph.D.¹, Myung-Wook Kim, M.D.²
and Young-Gyu Chai, Ph.D.³

¹Department of Genetic Analysis, Seoul Clinical Laboratories,
Seoul Medical Science Institute;

²Department of Surgery, Ajou University School of Medicine;

³Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Sciences,
Hanyang University

Purpose: Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common cancers in many parts of the world, however the molecular mechanisms underlying liver cell transformation remain obscure. The instability of microsatellite sequences dispersed in the genome has been linked to a deficiency in cellular mismatch repair. This phenotype has been frequently observed in various human neoplasms and is regarded as a major factor in tumorigenesis. To investigate cumulative genetic changes related with apoptosis during development and progression of HCC, we examined DNAs isolated from 12 Korean HCCs and their adjacent non-tumorous parts to look for evidence of microsatellite instability (MSI). **Materials and Methods:** Twelve microsatellite loci (D6S271, D6S426, D13S153, D13S263, D17S849, D17S938, D17S945, D18S474, D18S64, D19S420, D19S418 and D19S210) were amplified by PCR from 12 Korean HCCs, and analyzed using an automated DNA analyzer.

Results: The high percentages of the MSI were found for the loci of D6S426 (33.3%) and D17S945 (25.0%). The related genes with high frequency of MSI were noted in the waf1 (41.7%) and p53 (25.0%). From this study, fifty eight percent of HCCs (7/12) showed MSI with at least one marker.

Conclusion: This results suggest that the analysis of MSI in HCC might be useful for

identifying genes whose loss of function contributes to the development of liver cancer. Furthermore, this method may give a more rapid and accurate sizing of the PCR products of microsatellite, making the routine assessment of MSI possible in many clinical fields.

Key Words: Hepatocellular carcinoma (HCC), Microsatellite instability (MSI), fluorescent-PCR

서 론

원발성 간암 (primary hepatocellular carcinoma) 은 아시아와 아프리카에서 가장 많이 나타나는 암으로(1), 한국인에 있어서 남성의 경우 위암 다음으로 높게 나타나고 있으며, 여성의 경우는 부인암을 제외하면 위암, 대장암 다음으로 발병한다 (보건복지부 1995년 통계; 1997년 발표). 일반적으로 간암 발생의 중요 위험인자로써 B형 간염 바이러스 (HBV), C형 간염 바이러스 (HCV) 등과 같이 간염 바이러스에 의한 원인이 가장 높으며 (2), 이밖에 aflatoxin B1에 감염된 음식물의 섭취 (3), alcohol의 남용, 유전적 요인 등의 경우가 있다. 주로 암 발생에 대한 분자생물학적 변화는 암 유전자와 암억제 유전자 사이의 단계적 유전자 변화에 의한 것으로 알려져 있다(4). 즉 암유전자가 활성화되거나 암억제 유전자가 불활성화되면 이들간의 균형을 상실하게 되어 비정상적인 세포의 성장을 촉진하는 것이다. 또한 암형성은 정상 세포의 유사분열과 apoptosis (programmed cell death) 사이의 불균형에 의한 것임을 나타내는 연구가 되고 있으나(5,6), 아직까지 간암 형성에 있어 간염 바이러스의 역할과 분자생물학적 단계에서의 기전은 완전히 알려지지 않고 있다.

Microsatellite는 짧고 (2-5 base pairs) 반복적인 (보통 15~30번) DNA 염기서열로 전 염색체에 고루 분포되어 있으며, 이것을 이용하여 유전자 연관관계 분석이나 대립유전자 손실 등을 분석하는데 사용을 하고 있다(7,8). 일반적으로 2 bp (CA repeats)의 반복에 의한 microsatellite는 100,000 bp 마다 한번씩 일어나며, 이들의 반복단위는 개인

에 따라 유전자 다형성을 나타낸다. 이 microsatellite를 분석할 때 정상조직과 비정상조직에서 다른 형태의 유전자 다형성을 나타내는 것을 microsatellite instability (MSI)라고 한다(9,10). MSI의 원인은 DNA mismatch repair 유전자에 이상이 발생하여 DNA 복제시 발생하는 단순한 오류를 수정하지 못하기 때문에 일어나는 것으로, 현재 사람에게 있어 hMSH2, hMLH1, hPMS1과 hPMS2 등의 mismatch repair 유전자가 알려져 있다(11~13). 이 MSI와 암과의 상관관계에 대한 연구가 1993년 Aaltonen등(14)에 의해 hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)에서 보고된 이후에 대장암, 위암, 전립선암, 간암, 자궁내막암, 결장직장암, 난소암, 백혈병 등 많은 암에서 연구되고 있다(15~21).

일반적으로 PCR을 이용한 MSI의 분석은 방사선 동위원소와 urea-polyacrylamide gel을 이용하고 있으나 이 방법은 시간 소요가 많고 방사능 사용 등의 문제점이 있어, 최근에는 형광으로 표식된 primer를 이용한 형광-PCR법이 이용되고 있다(22~24). 이에 저자들은 형광-PCR (fluorescent-PCR) 법과 자동 DNA 분석기를 사용하여, 한국인의 간암으로부터 apoptosis와 관련된 5개의 유전자 waf1 (cip1; p21), Rb1, p53, bcl-2 및 bax 등에서 microsatellite를 증폭하고 이들과 MSI의 상관관계를 분석하여 보았다.

재료 및 방법

1) 실험 재료

임상 검체는 한국인 원발성 간암 환자의 간암 조직과 같은 환자의 정상 간조직 각각 12예를 사

용하였다. Microsatellite 분석을 위해 사용된 marker 는 D6S271, D6S426, D13S153, D13S263, D17S849, D17S938, D17S945, D18S474, D18S64, D19S420, D19S418 및 D19S210이며, 이를 분석하기 위한 형광 primer는 PE Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA)로부터 구입하였다.

2) 실험 방법

(1) DNA의 추출: Genomic DNA의 추출은 동결된 검체를 pellet pestle (Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 이용하여 분쇄한 후 proteinase K와 phenol/chloroform 방법을 사용하여 추출하였다. 추출한 DNA는 spectrophotometer로 260 nm에서 정량하여 50 ng/μl으로 적정하였으며 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

(2) 형광-PCR: PCR 반응액 조성은 GeneAmp 10 × PCR buffer II와 25 mM MgCl₂를 각각 1.5 μl, 2.5 mM dNTP를 1.5 μl, 5 unit의 AmpliTaqGold DNA polymerase를 0.12 μl, [FAM], [TET] 또는 [HEX]로 형광 표식된 5 μM primer를 1.0 μl와 50 ng/μl의 주형 DNA를 1.2 μl 넣어 총부피를 15 μl로 만들었다. PCR 반응은 먼저 95°C에서 12분간 열을 가하여 AmpliTaqGold DNA polymerase를 활성화시킨 후 94°C에서 15초간 변성 반응, 55°C에서 15초간 결합 반응, 72°C에서 30초간 중합 반응을 1 주기로 하여 10회를 반복하고, 84°C에서 15초간 변성 반응, 55°C에서 15초간 결합 반응, 72°C에서 30초간 중합 반응을 1 주기로 하여 20회를 반복한 후 72°C에서 10분간을 자동 thermal cycler (GeneAmp PCR system 9600; Perkin Elmer Cetus Inc., Norwalk, CT, USA)에서 DNA의 증폭을 시도하였다.

(3) Capillary를 이용한 전기영동: 총 12개의 marker를 표식된 형광색과 증폭된 크기에 따라 각각 A군 (D6S271, D6S426, D17S849, D17S945, D19S420, D19S210)과 B군(D13S153, D13S263, D17S938, D18S474, D18S64, D19S418)으로 나누어 PCR 산물 혼합액으로 만들었다. [FAM]과 [TET]로 표식된 PCR 산물은 1μl, [HEX]로 표식된

PCR 산물은 2 μl를 섞은 후 (1 [FAM] : 2 [HEX] : 1 [TET]) 멸균수를 이용하여 전체부피를 20 μl로 만들었다. 이 PCR 산물 혼합액 2 μl와 injection mixture 12 μl (12 μl deionized formamide, 0.5 μl size standard GeneScan500 [TAMRA])를 95°C에서 5분간 가열한 후 4°C를 유지시켰다. 이를 ABI 310 Genetic analyzer (PE Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)의 capillary에 주입시켜 전기영동을 하였다.

(4) MSI의 분석: MSI의 분석을 위하여 GeneScan analysis와 Genotyper software를 이용하였다. 각각의 marker에 대해서 정상 조직과 암조직에서 나온 결과를 비교하여 새로운 대립 유전자가 나타났을 때 MSI 양성으로 판단하였다. 모든 검체는 결과의 정확성을 위하여 각 marker 당 2회 이상 분석하였다.

결 과

MSI의 분석에 사용한 12개의 간암 검체에서 먼저 HBV와 HCV 감염 여부를 PCR을 이용하여 확인하여 보았다. HBV는 preC, C-region에서 PCR을 시행하였고, HCV는 5'-noncoding region에서 RT-PCR을 시행하여 양성 여부를 확인하였다. 이 결과 HBV 양성이 5건, HCV 양성이 2건, HBV/HCV 동시 감염된 양성이 2건, 그리고 감염되지 않은 음성 검체가 3건이었다.

이들 12명의 간암과 동일 환자의 정상 간조직에서 DNA를 추출한 총 24개의 DNA를 정량하여 각각에 대해 12개의 microsatellite marker를 이용하여 MSI를 분석하였는데, 이들의 염색체내 위치와 증폭크기는 Table 1과 같다. 먼저 PCR을 시행한 후 PCR 크기가 서로 겹치지 않게 A, B 두군으로 나누어 혼합한 것을 ABI 310 capillary에 주입하여 나온 결과가 Fig. 1과 같다. 이 그림의 A와 B는 각각 A군과 B군에서 나온 결과를 GeneScan을 이용하여 분석한 top electropherogram으로, blue peak는 [FAM], green peak는 [TET]로 형광 표식된 산물이다. [HEX]는 본래 yellow로 형광 표식

Table 1. Microsatellite markers used in this study

| Marker | Chromosomal location | Related gene | Amplified size (bp) |
|---------|----------------------|--------------|---------------------|
| D6S271 | 6p21.2 | waf1 | 95 ~ 141 |
| D6S426 | 6p21.2 | waf1 | 203 ~ 223 |
| D13S153 | 13q14 | Rb1 | 87 ~ 117 |
| D13S263 | 13q14 | Rb1 | 143 ~ 169 |
| D17S849 | 17p13.1 | p53 | 250 ~ 262 |
| D17S938 | 17p13.1 | p53 | 234 ~ 254 |
| D17S945 | 17p13.1 | p53 | 295 ~ 321 |
| D18S474 | 18q21.3 | bcl-2 | 118 ~ 140 |
| D18S64 | 18q21.3 | bcl-2 | 311 ~ 337 |
| D19S210 | 19q13.3 | bax | 168 ~ 186 |
| D19S418 | 19q13.3 | bax | 84 ~ 102 |
| D19S420 | 19q13.3 | bax | 81 ~ 101 |

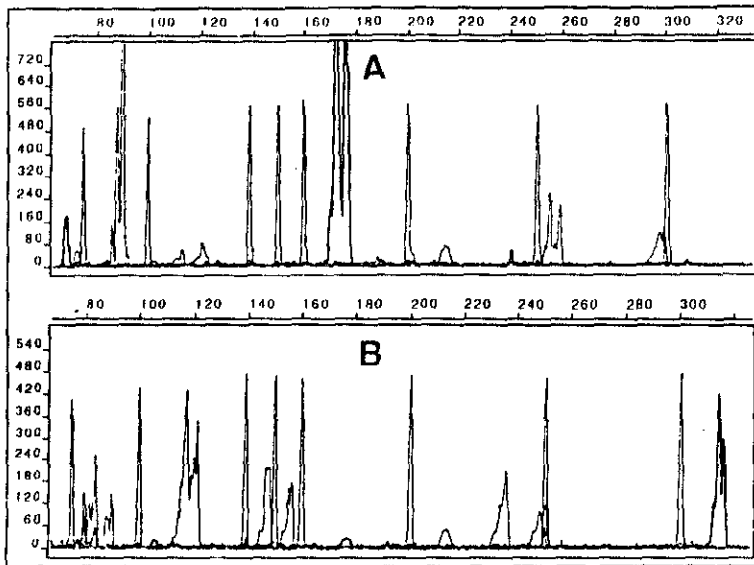


Fig. 1. Top electropherogram by the GenScan analysis program from 12 microsatellite markers. The mixture of PCR products and internal size standard were injected in capillary of the analyzer. The laser-excited fluorescent emission of the labelled PCR products was automatically analysed by the GenScan analysis program, used to construct an individual PCR products being displayed as an electropherogram. (A) Mixture of D19S420, D6S271, D19S210, D6S426, D17S849 and D17S945. (B) Mixture of D19S418, D13S153, D18S474, D13S263, D17S938 and D18S64. Blue peak; [FAM], Green peak; [TET], Yellow (Black) peak; [HEX], Red peak; [TAMRA] size standard.

된 것이나 출력상 black으로 나타나 있으며, internal size marker는 [TAMRA]로 red peak로 나타난다.

Fig. 2는 GeneScan 결과를 더욱 세밀하고 정확

하게 분석하기 위해 Genotyper를 이용한 것으로 A는 MSI가 발생하지 않은 경우이며 B는 MSI가 발생한 경우의 형광 PCR 결과를 electropherogram

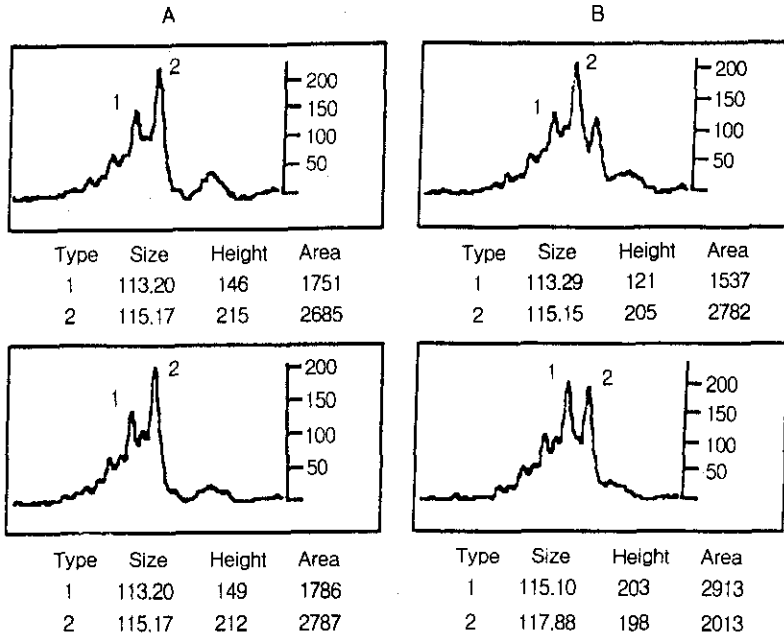


Fig. 2. Cross-sectional electropherogram of the amplified microsatellite showing no MSI (A) and MSI (B). In both cases, the dinucleotide repeat marker D6S271 has been used. Upper traces show normal DNA sample and lower traces show corresponding tumor DNA samples. The data of each peak below the electropherogram was automatically analysed by the Genotyper program.

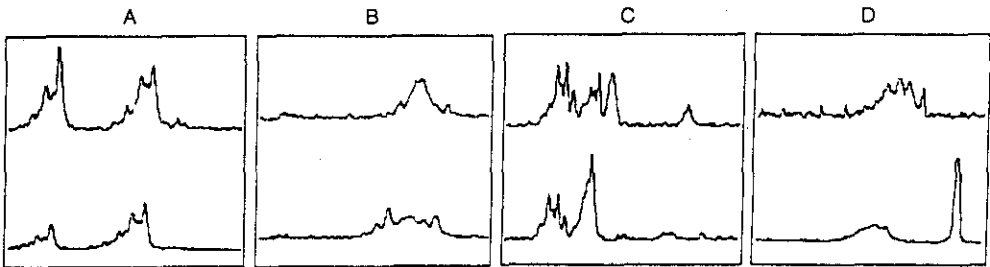


Fig. 3. Examples of cases that show MSI. The normal DNA samples shown in the upper trace case and the corresponding tumor DNA in the lower trace in each case. (A) MSI on D6S271, (B) MSI on D6S426, (C) MSI on D13S153, (D) MSI on D17S945.

으로 나타낸 예이다. 이들 각각의 결과는 internal size marker (size standard Genescan 500; [TAMRA])를 이용하여 증폭된 크기를 정확하게 알 수 있을 뿐만 아니라, 자동적으로 peak의 높이를 계산하므로 정량화할 수가 있었다.

여기서 총 12개의 marker를 선택하는데 있어 waf1, Rb1, p53, bcl-2, bax 등 5개의 apoptosis와 관

련된 유전자 부위에서 선택하였다. 이중 marker만으로 살펴볼 때, Table 2에서 나타난 결과와 같이 waf1과 관련된 D6S426의 MSI가 33% (4/12)로 가장 높게 나타났으며, 다음은 p53과 관련된 D17S945로 26% (3/12)를 보였다. 이와 같이 높은 MSI를 나타낸 4개의 marker, D6S271, D6S426, D13S153와 D17S945에 대한 대표적인 electro-

Table 2. Microsatellite instability by 12 microsatellite markers from 12 HCCs

| Sample no. | Viral infection | waf1 | | Rb1 | | p53 | | bcl-2 | | bax | | | |
|----------------------|-----------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|---------|
| | | D6S271 | D6S426 | D13S153 | D13S263 | D17S849 | D17S938 | D17S945 | D18S474 | D18S64 | D19S420 | D19S418 | D19S210 |
| HCC 1 | HBV | | MSI* | | | | | | | | | | |
| HCC 2 | HBV | | MSI | | | | MSI | | | | | | |
| HCC 3 | HBV | MSI | MSI | | | | | | | MSI | | | |
| HCC 4 | HBV | | | | | | | | | | | | |
| HCC 5 | HBV | | | | | | | | | | | | |
| HCC 6 | HBV/HCV | | MSI | | | | | | | | | | |
| HCC 7 | HBV/HCV | | | MSI | | | MSI | | | | | | |
| HCC 8 | HCV | MSI | | MSI | MSI | | | | | | | | |
| HCC 9 | HCV | | | | | | | | | | | | |
| HCC10 | | | | | | MSI | | MSI | | | | | |
| HCC11 | | | | | | | | | | | | | |
| HCC12 | | | | | | | | | | | | | |
| MSI% at marker | | 17% | 33% | 17% | 8% | 8% | 0% | 25% | 0% | 0% | 8% | 0% | 0% |
| MSI% on related gene | | 42% | | 17% | | 25% | | 0% | | 8% | | | |

*microsatellite instability

pherogram을 Fig. 3에 나타내었다.

또한 MSI를 관련된 유전자의 관점에서 살펴보면 waf1이 42% (5/21)로 가장 높게 나타났으며, p53과 Rb1이 각각 25%와 17%를 보인 반면 bax와 bcl-2는 8%와 0%의 낮은 MSI를 나타냈다 (Table 2). 종합적으로 저자들이 사용한 5개의 유전자 부위에서 12개의 marker를 사용한 결과, 한국인의 간암에서 하나 이상의 MSI가 발생한 것은 총 12건 중 7건으로 58%의 높은 수치를 나타내었다.

고 찰

간암도 다른 암과 같이 암유전자나 암억제 유전자의 유전자 변이에 의해 이들 유전자가 활성화 또는 불활성화되어, 세포 조절 능력을 상실하게 되고 apoptosis가 불균형을 이루어 발생할 것으로 추측되나 현재까지 구체적으로 밝혀지지는 않고 있다(6,25). 그러나 간암 발생의 몇 가지 위험 인자가 밝혀져 있는데 이들중 aflatoxin은 p53의

exon 7에 있는 codon 249번의 아미노산을 arginine에서 serine으로 치환하게 된다고 알려져 있으나 (3), 다행히 우리나라에서는 이 aflatoxin에 대한 오염이 매우 낮은 것으로 나타나 있다. 그러나 다른 주요인자인 HBV나 HCV와 같은 virus에 대한 감염율은 매우 높아 이들 감염 virus에 대한 연구가 국내외로 활발히 진행되고 있다(2,26,27).

Microsatellite는 모든 염색체에 분포하는데 이것의 양쪽에 위치하는 특이 부위를 primer 선택 부위로 하여 PCR 방법으로 증폭시키면 개인에 따라 유전자의 크기가 다르게 나타나며, 이를 이용하여 microsatellite 유전자의 다형성을 분석할 수가 있다. 여기에서 저자들은 간암에서 간염 virus와 apoptosis와 관련된 5개의 유전자에서 MSI와 암과의 상관관계를 보기 위해, 총 12개의 간암과 같은 환자의 정상 간조직에서 DNA를 추출하고 이것을 각각 12개의 microsatellite marker를 이용하여 이들의 MSI를 분석하였다. 분석한 12개의 검체중 9개의 검체는 간염 virus에 감염되어 있었

는데 이중 6개 (67%)에서 MSI가 발견되어 감염되지 않은 검체 3개중 1개 (33%)에서 발견된 것보다 2배 정도의 높은 수치를 나타내었다. 이는 간염 virus에 의해 MSI의 원인이 되는 DNA mismatch repair 유전자에 더 많은 돌연변이율이 발생되어졌을 확률이 있는 것으로 여겨지나, 검체 수가 적으므로 통계학적 유의성은 없는 것으로 생각되며 향후에 더 많은 분석이 이루어져야 할 것이다. 보통 정상 세포에서 microsatellite (CA)_n dinucleotide repeat의 돌연변이율은 0.04%이하로 매우 낮게 발생을 한다. 그러나 암으로 진행된 세포에서의 MSI의 빈도는 매우 높은 것으로 보고되고 있다. 이 MSI와 암과의 상관 관계에 대한 보고는 1993년에 Aaltonen등(14)과 Thibodeau등(20)에 의해 hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)와 대장암에서 처음 보고된 이후 많은 여러 암에서의 MSI가 연구되어져 왔다(3,28,29). Thibodeau등(20)은 이 보고에서 (CA)_n 반복단위의 MSI가 대장암에서 28%임을 보였고 최근에 Miozzo등(30)은 폐암환자의 객담에서 DNA를 추출하여 MSI를 분석한 결과 49%의 높은 수치가 나타남을 보고하였다.

현재 간암 유전자의 불안정에 대한 연구는 loss of heterozygosity (LOH)에 대한 분석(31)이 대부분으로 Kishimoto등(32)은 p53에서의 LOH가 57% (8/14)를 나타남을 보였는데 이는 저자들이 p53에서 분석한 25%와는 다소의 차이가 있으나, 이는 다른 부위에서의 marker를 사용하여 나타난 결과로 보여진다. 한편, Park등(33)은 한국인 간암에서의 p53 돌연변이를 분석하여 보았는데 총 35개의 검체에서 아미노산 치환이 7개, 염기소실이 4개가 일어나 31%의 돌연변이율이 나타남을 보고하였는데, 이것은 저자들이 분석한 25%와 유사한 확률을 보이고 있다. 그러나 Park등(33)이 분석한 것은 p53의 exon 부위이고 저자들이 분석한 것은 주로 intron 부위에서 발생하는 MSI이기 때문에 특정한 결론을 내리기에는 무리이나 한국인 간암에서의 확률이 유사성을 나타낸 것은 흥미로운 결과이다. 또한 Yeh등(34)과 Nagai등(35)이 보고

한 간암에서의 불안정에 대한 연구에서 50% 이상의 높은 수치를 보였는데 이는 저자들이 나타낸 58%의 수치와 매우 유사함을 알 수 있었다. 이 실험에서 사용한 marker 중에서 DNA repair에 관련된 waf1과 Rb-1에 대한 MSI가 apoptosis에 관련된 bcl-2나 bax에 대한 MSI 보다 상대적으로 높게 나타났다. 이는 아마도 간암 세포로서 살아 남기 위해, p53과 이들 DNA repair 유전자에서 더 많은 변이가 발생하였으리라 추측되어진다. 그러나 저자들이 사용한 검체수와 microsatellite marker의 수는 한정된 것이므로 더 많은 검체와 다양한 marker를 사용하여 분석하여 보아야 할 것이다.

MSI는 정상적인 조직에서 추출한 DNA로부터의 microsatellite와 같은 사람의 악성종양에서의 microsatellite의 대립 유전자의 크기가 변화하여 발생하는 것이다. 이 MSI를 분석하므로 어떤 암 유전자의 분석 전에 MSI를 분석하는 것은 악성종양을 선별하는 빠르고 간편한 방법일 것이다. 여기서 저자들은 MSI를 분석하는데 형광 PCR법을 사용하여 대립유전자 손실을 알아보았다. 이 방법은 기존의 MSI 분석법보다 매우 진보된 방법으로, 빠르고 정확한 대립유전자의 크기를 알 수 있었으며 여러 유전자 부위들을 한번에 분석하는데 용이하였다.

결 론

암조직에서 유전자 불안정 분석은 염색체 변이를 알아보는 유용한 방법으로 이를 이용하여 한국인의 간암에 대한 MSI를 분석하여 보았다. 최근에 개발된 형광 PCR과 자동 DNA 분석기를 사용하여 apoptosis와 관련된 12개의 marker를 이용하여 분석한 결과 58%의 높은 수치를 보였다. 이는 DNA mismatch repair 기능의 이상에 의해 나타난 현상으로 apoptosis와 암 발생 관련 유전자에 영향을 미쳐 암으로의 형성에 기여했을 것으로 판단된다. 이 방법을 이용한 MSI의 분석은 객관적으로 매우 빠르고 정확하게 암에서의 유전자 변이를 분석할 수 있어, 암 환자에서 간단히 유전

자의 변이를 검사하고 예측하므로써 암의 조기진단과 수술 전후의 예후 판정에 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Simonetti RG, Camma C, Fiorello F, Politti F, D'amico G, Pagliaro L. Hepatocellular carcinoma: a worldwide problem and the major risk factors. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 962-972.
2. Brechot C, Pourcel C, Louis A, Rain B, Tiollais P. Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 1980; 286: 533-535.
3. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutation of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 1991; 350: 429-431.
4. Murakami Y, Hayashi K, Hirohashi S, Sekiya T. Aberration of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1991; 51: 5520-5525.
5. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013-2026.
6. Feldmann G. Liver apoptosis. *J Hepatol* 1997; 26: 1-11.
7. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 388-396.
8. Weissenbach J, Gaypay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M. A second-generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992; 59: 794-801.
9. Jorde LB, Rogers AR, Bamshad M, Watkins WS, Krakowiak P, Sung S, Kere J, Harpending HC. Microsatellite diversity and the demographic history of modern humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3100-3103.
10. Lothe RA. Microsatellite instability in human solid tumors. *Mol Med Today* 1997; 3: 61-68.
11. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordenskjold M, Fishel R, Kolodner R, Liskay RM. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-261.
12. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-1038.
13. Thomas DC, Umar A, Kunkel TA. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer cell. *Mut Res* 1996; 350: 201-205.
14. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hemilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, de la Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-816.
15. Dahiya R, Lee C, McCarville J, Hu W, Kaur G, Geng G. High frequency of genetic instability of microsatellites in human prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1997; 72: 762-767.
16. Randerson J, Cawkwell L, Jack A, Child JA, Lewis F, Hall N, Johnson P, Evans P, Barrans S, Morgan GJ. Microsatellite instability in follicle centre cell lymphoma. *Br J Hematol* 1996; 93: 160-162.
17. Rhyu MG, Park WS, Meltzer SJ. Microsatellite instability occurs frequently in human gastric carcinoma. *Oncogene* 1994; 9: 29-32.
18. Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5100-5103.
19. Sood AK, Buller RE. Genomic instability in ovarian cancer: a reassessment using an arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oncogene* 1996; 13: 2499-2504.
20. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819.
21. Wada C, Shinoya S, Fujino Y, Tokuhino H, Akahoshi T, Uchida T, Ohtani H. Genomic instability of microsatellites repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994; 83: 3449-3456.
22. Cawkwell L, Li D, Lewis FA, Martin I, Dixon MF, Quirke P. Microsatellite instability in colorectal cancer: Improved assessment using fluorescent polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 1995; 109: 465-471.
23. Randerson J, Cawkwell L, Jack A, Lewis F, Johnson

- P, Evans P, Barrans S, Morgan GJ. Fluorescent polymerase chain reaction of a panel of CA repeats on chromosome 6 in the indolent phase of follicular centre cell lymphoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 942-946.
24. Toh Y, Oki E, Oda S, Tomoda M, Tomisaki S, Ichiyoshi Y, Ohno S, Sugimachi K. An integrated microsatellite length analysis using automated fluorescent DNA sequencer. *Cancer Res* 1996; 56: 2688-2691.
25. Kuroki T, Fujiwara Y, Nakamori S, Imaoka S, Kanematsu T, Nakamura Y. Evidence for the presence of two tumour-suppressor genes for hepatocellular carcinoma on chromosome 13q. *Br J Cancer* 1995; 72: 383-385.
26. Choi CS, Kim EA, Park YS, Lee KO, Lee KP, Lee YT. Detection of hepatitis C virus RNA in clinical sera by reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Kor Soc Virol* 1994; 24: 87-92.
27. Park YS, Lee KO, Oh MJ, Chai YG. Quantitation of hepatitis C viral RNA using direct CRT-PCR. *J Biochem Mol Biol* 1997; 30: 234-236.
28. Boige V, Laurent-Puig P, Fouchet P, Flejou JF, Monges G, Bedossa P, Bioulac-Sage P, Capron F, Schmitz A, Olschwang S, Thomas G. Concerted nonsynthetic allelic losses in hyperploid hepatocellular carcinoma as determined by a high-resolution allelotype. *Cancer Res* 1997; 57: 1986-1990.
29. Kishimoto Y, Shiota G, Wada K, Kitano M, Nakamoto K, Kamisaki Y, Suou T, Itoh T, Kawasaki H. Frequent loss in chromosome 8p loci in liver cirrhosis accompanying hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 585-589.
30. Miozzo M, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U, Pierotti MA. Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res* 1996; 56: 2285-2288.
31. Piao Z, Kim H, Jeon BK, Lee WJ, Park C. Relationship between loss of heterozygosity of tumor suppressor genes and histologic differentiation in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 865-872.
32. Kishimoto Y, Shiota G, Kamisaki Y, Wada K, Nakamoto K, Yamawaki M, Kotani M, Itoh T, Kawasaki H. Loss of the tumor suppressor p53 gene at the liver cirrhosis stage in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 1997; 54: 304-310.
33. Park YM, Yoo YD, Paik SY, Kim BS, Tabor E. Mutation of tumor suppressor gene p53 in hepatocellular carcinomas from Korea. *Exp Mol Med* 1996; 28: 173-179.
34. Yeh SH, Chen PJ, Chen HL, Lai MY, Wang CC, Chen DS. Frequent genetic alterations at the distal region of chromosome 1p in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4188-4192.
35. Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A. Comprehensive allelotyping of human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1997; 14: 2927-2933.