

갑상선 미세유두선암에서 Cathepsin B의 발현

양재홍 · 최영식 · 박요한 · 김우미¹⁾ · 김정훈²⁾ · 김영옥³⁾

고신대학교 의과대학 내과학교실, 약리학교실¹⁾, 일반외과학교실²⁾, 병리학교실³⁾

Expression of Cathepsin B in the Papillary Thyroid Microcarcinoma

Jae-Hong Yang · Young-Sik Choi · Yo-Han Park · Woo-Mi Kim¹⁾
Jeong-Hun Kim²⁾ · Young-Ok Kim³⁾

Department of Internal Medicine, Department of Pharmacology,
Department of General Surgery, Department of Pathology Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background: It is estimated that papillary microcarcinoma of the thyroid (PTMC) account for up to 30% of all papillary thyroid cancers. Recently, it was reported that the cases of lateral lymph node metastasis showed significantly higher growth based on proliferating activity, apoptosis, and expression of metastatic suppressor than demonstrating no or occult metastasis. Cathepsin B has been implicated in processes important for tumor development and progression. The purpose of this study was to determine the relationship between cathepsin B expression and clinicopathologic characteristics of PTMCs.

Methods: Forty six PTMC patients who underwent thyroidectomy at Kosin University, Gospel Hospital from November, 2004 to March, 2006, were included in the study. The author examined the expression of cathepsin B in these PTMCs by immunohistochemistry.

Results: The expression of cathepsin B was not related with age, sex, and number of nodule, but was significantly related with size ($p=0.035$). According to the expression patterns of cathepsin B, lateral lymph node metastasis was higher in diffuse group than peripheral group. ($p=0.001$) According to the expression intensity of cathepsin B, there was no difference between intense group and weak group. Conclusion: These results suggested that the expression of cathepsin B was highly related with unfavorable prognostic markers of PTMC, such as size, and lateral lymph node metastasis. Further study is needed for clinical application of cathepsin B in the PTMCs.

Key words : Papillary microcarcinoma of the thyroid (PTMC), Cathepsin B, Lymph node metastasis

서 론

갑상선암은 모든 내분비계 악성종양 중 가장 흔하며, 전체 악성종양으로 인한 사망의 약 0.5%를 차지한다. 분화 갑상선암은 다른 조직에서 발생한 암에 비해 비교적 천천히 자라며, 예후가 양호한 것으로 알려져 있으나, 유두암의 30-50%는 진단 당시에 경부 및 림프절의 전이가 있으며, 5%에서는 원격전이가 동반된다고 한다.^{1,2)} 고해상도 초음파 기술의 발달로 갑상선종양에 대한 진단의 정확성이 높아져 갑상선암 환자가 늘어났으며 과거에 비해 1cm 이하의 미세유두암의 진단이 높아져 보고자에 따

라 차이가 있으나 전체 유두선암의 약 30%를 차지한다고 한다.^{3,4)} 미세유두선암은 예후가 양호한 것으로 알려져 있으나,⁵⁾ 보고자에 따라 16-44%의 높은 림프절 전이를 보이고 있어, 치료에는 수술이 최선책으로 추천되고 있다.

Ito등⁶⁾은 미세유두선암 환자 중 종양이 기관에 인접해 있거나, 후두반회신경을 침범한 경우, 세침검사 소견에서 악성도가 높거나, 초음파 검사상 경부 외측부(lateral compartment) 림프절 전이가 관찰되는 경우를 제외한 환자에 대해 수술을 시행치 않고, 평균 4.5년간 추적한 결과 대부분의 미세유두선암은 수술 없이 경과 관찰만으로도 관리가 가능하다고 하였다.

그러나 진행된 암도 초기에는 미세암에서 시작하여 종국에는 생명을 위협하게 하는 암이 되므로, 수술 전 높은 성장능력(higher growth activity)을 가진 미세유두선암의

교신저자 : 최 영 식
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 내과학교실
TEL : (051) 990-6102, FAX : (051) 990-3049
E-mail : yschoi@Kosinmed.or.kr

임상적 특징을 아는 것은 매우 중요하다. 초음파검사상 경부 외측부 림프절 전이가 있는 군에서 림프절 전이가 없는 군 보다 수술 후 재발이 더 높다고 보고하여,⁷⁾ 초음파 검사상 외측 림프절 전이가 수술 전 미세유두선암의 높은 성장능력을 가진 임상적 특성을 알 수 있는 지표로 제시되고 있으며, 또한 미세유두선암에서 종양의 증식, 자연사멸(apoptosis), 침습 및 전이에 관여하는 cyclin D, p27, pRb, single strand DNA, Kangai-1 등의 표지자들을 이용한 면역조직화학검사 연구에서도 외측 림프절 전이가 있는 미세유두선암이 잠재 전이가 있는 미세유두선암보다 더 높은 성장능력을 보임을 보고하였다.⁸⁾

Cathepsin B는 단백질 분해 효소로 세포외기질(extracellular matrix)을 분해하여 종양의 침습과 전이에 관여할 뿐 아니라 종양의 성장, 자연사멸을 유발하며,⁹⁾ 간암, 유방암, 흑색종, 대장암, 전립선암 등에서 과발현된다.^{10,11)} Shuja 등¹²⁾은 분화갑상선암의 면역조직화학검사상 cathepsin B가 정상 조직 보다 더 발현되는 것을 보고하였으나 미세유두선암에 대한 cathepsin B의 연구는 드물다.

본 연구는 갑상선 미세유두선암의 크기, 개수, 및 림프절 전이 등의 임상적 병리학적 특성에 따라 cathepsin B의 발현의 차이가 있는가를 알아보고, 미세유두선암의 성장능력의 예측인자로 cathepsin B가 유용한가를 알아보고자 이 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대상

조직 표본은 2004년 11월부터 2006년 3월까지 본원에서 수술 후 종양의 크기가 1 cm 이하인 미세유두암 46예의 조직을 대상으로 하였다. 대상 환자 46명 중 남자는 10명, 여자는 36명(78%)이었으며, 평균연령은 46.2세였다(Table 1). 대상 환자는 면역조직화학검사서 cathepsin B의 발현 유무에 따라 cathepsin B 양성군과 음성군으로 구분하였다.

2. 방법

1) 림프절 전이 판정 및 분류

모든 예에 대하여 수술전 초음파검사를 시행하여 림프절 전이 유무를 판정하였다. 림프절 전이의 기준은 Antonelli 등¹³⁾이 제안한 (1) 림프절의 크기가 1 cm 이상

이며, (2) 저음영을 보이고, (3) 불규칙한 낭종성 병변, (4) 내부에 석회화, (5) 원형 또는 종단길이의 증가 등의 기준을 이용하였으며, 수술 전 초음파검사서 림프절 전이가 관찰되지 않았고, 수술 후 병리학적 검사서 림프절에 전이가 관찰되지 않은 경우를 전이가 없는 군으로, 수술 후 병리검사서 중앙부 림프절에 전이가 국한된 경우를 중앙림프절 전이군(central lymphnode metastasis)으로, 수술 후 병리검사서 외측부 림프절 전이가 확인된 경우를 외측 림프절 전이군(lateral lymphnode metastasis)으로 분류하였다.

2) 면역조직화학검사

10% 중성 포르말린에 고정하고 파라핀에 포매한 조직을 4 μm 두께로 박절하여 슬라이드에 부착한 후 통상적인 avidin-biotin-complex (ABC)법을 이용하여 면역조직화학 염색을 시행하였다. Xylene으로 10분간 탈파라핀 과정을 거친 후 알코올로 함수 과정을 시행하고 Tris 완충 용액(10 X Immunoassay buffer: Biomed, CA, USA)에 10분간 세척하였다. Cathepsin B 일차항체(monoclonal, Abcam, Cambridge, UK)를 희석액(Research Genetics, USA)과 1: 30으로 희석한 후 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 Tris 완충용액으로 수세하고 biotin이 결합된 이차항체로 15분간 반응시킨 후 다시 Tris 완충용액으로 수세하였다. Avidin과 결합한 과산화효소 복합체에 15분간 반응시킨 후 Tris 완충용액으로 수세하였다. 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)로 발색시킨 후 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색하고 crystal mount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 양성 대조군으로 피부조직을 이용하였으며, 음성 대조군으로는 일차 항체 대신 PBS buffer를 사용하였다. 면역조직화학 염색의 판정은 종양세포의 세포질에 분명한 갈색의 과립으로 관찰되는 경우를 양성으로 판정하였고, 뚜렷하게 진한 갈색의 과립을 보이는 경우를 강양성, 희미하게 염색되는 경우를 약양성으로 판정하였다. 또한 종양의 50% 이상에서 양성 반응을 보이며, 종양의 중심부나 변연부 모두에서 양성을 보이는 경우를 미만성 양성, 종양의 중심에서는 음성을 보이나 변연부에서 양성을 보이는 경우 변연부 양성으로 나누어 판정하였다(Figs. 1, 2).

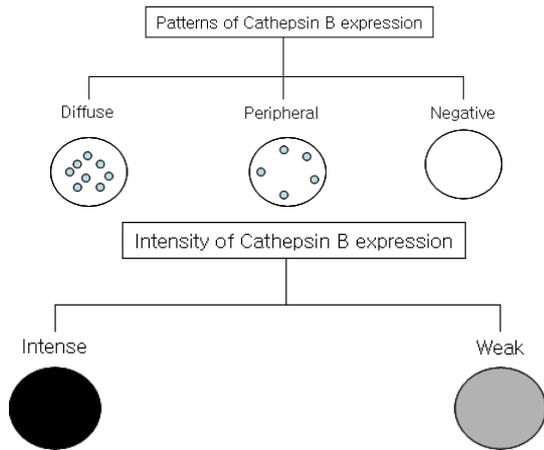


Fig. 1. Schematic illustration of patterns and intensity of cathepsin B expression.

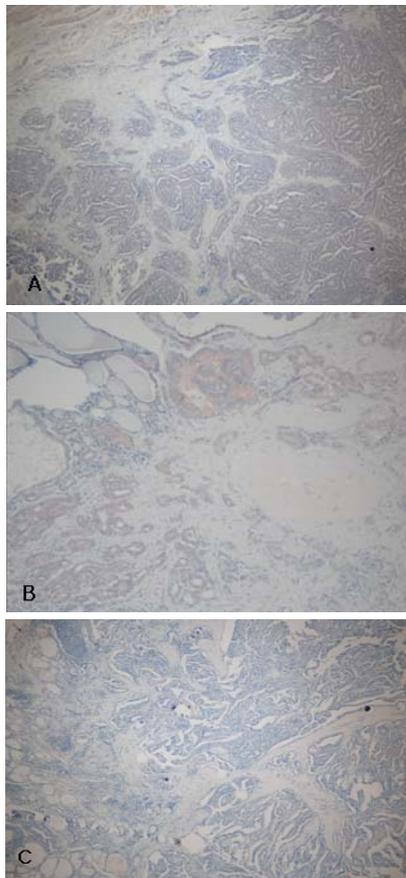


Fig. 2. Immunohistochemical staining for cathepsin B. (A), Diffusion pattern, (B), peripheral pattern, (C), negative (x200).

3. 통계

자료분석은 SPSS(ver 12.0) 통계프로그램을 사용하였고, χ^2 test를 이용하여 측정하였으며 p value가 0.05이하인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. Cathepsin B 발현 유무에 따른 대상군의 임상적 특성

미세유두선암의 임상적 특징을 cathepsin B의 발현 유무에 따라 구분하여 비교하였을 때 성별, 나이, 종양의 수는 양군 간에 차이가 없었으나 종양의 크기가 큰 군에서 cathepsin B의 발현이 양성으로 나왔다($p=0.035$)(Table 1).

Table 1. Characteristics of patients with micropapillary thyroid carcinoma according to cathepsin B status

Characteristics	Cathepsin B (+) (N=21)	Cathepsin B (-) (N=25)	p-value
Sex			
Male	7	3	0.081
Female	14	22	
Age (year)	48.6±12.8	44.2±12.2	0.243
Mass size (cm)	0.75±0.17	0.68±0.19	0.035
Mass number			
n=1	11	18	0.231
n≥2	10	7	0.172

Values are mean ± SD

2. 림프절 전이 양상과 cathepsin B의 발현

전이가 없었던 21예 중 8예에서 cathepsin B가 양성으로 나왔고, 13예에서 음성이었다. 반면, 외측 림프절 전이가 있었던 9예 중 7예에서 cathepsin B가 양성이었고, 2예에서 음성이었다($p=0.098$)(Table 2).

Table 2. Evaluation of cathepsin B expression on lymph node metastasis

Expression	No metastasis	Central LN metastasis	Lateral LN metastasis	Total	p value
Cathepsin B (+)	8 (38.1%)	6 (37.5%)	7 (77.8%)	21	0.098
Cathepsin B (-)	13 (61.9%)	10 (62.5%)	2 (22.2%)	25	
Total	21	16	9	46	

LN: lymph node

3. Cathepsin B 양성군에서 cathepsin B 발현 양상과 림프절 전이

면역조직화학 검사에서 cathepsin B 발현이 양성이었던 21예를 cathepsin B 발현 양상에 따라 분류하였을 때 미만성(diffuse)이 9예, 변연부성(peripheral)이 12예였다. Cathepsin B는 양성이나 전이가 없었던 8예 중 미만성을 보인 예는 2예, 변연부성 소견을 보인 예는 6예였으나, 외측 림프절 전이를 보인 7예 모두 미만성을 보여 유의한 차이를 보였다($p=0.001$)(Table 3). 반면 중앙 림프절

전이군은 6예 모두 변연부성을 보였다.

Table 3. Expression patterns of cathepsin B in relation to lymph node metastasis

Expression pattern	Lymph node metastasis			Total	p value
	No metastasis	Central LN	Lateral LN		
Diffuse	2 (22.2%)	0 (0%)	7 (77.8%)	9	0.001
Peripheral	6 (50.0%)	6 (50%)	0 (0%)	12	
Total	8	6	7	21	

LN: lymph node

4. Cathepsin B 양성군에서 cathepsin B 발현정도와 림프절 전이

Cathepsin B 발현이 양성이었던 21예 중 면역조직화학 검사에서 강하게 발현된 경우는 5예, 약하게 발현된 경우는 16예였으며, 발현정도와 림프절 전이와는 서로 유의한 연관이 없었다. Cathepsin B가 강하게 염색된 5예 중 3예서 외측 림프절 전이를 보여 전이가 없는군 1예 보다 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다 (Table 4).

Table 4. Intensity of cathepsin B expression in relation to lymph node metastasis

Intensity	No metastasis	Lymph node metastasis		Total	p value
		Central LN	Lateral LN		
Intense	1(20%)	1(20%)	3(60%)	5(100%)	0.344
Weak	7(43.8%)	5(31.3%)	4(25%)	16(100%)	
Total	8(38.1%)	6(28.6%)	7(33.3%)	21(100%)	

LN: lymph node

고찰

갑상선 미세유두선암은 부검시 3-35% 정도로 흔히 발견되며, 최근에는 초음파 검사와 초음파 유도하 세침흡인세포 검사의 증가로 더 흔히 발견되고 있다. 미세유두선암은 생물학적 특성이 비교적 양성(benign)이며, 성장 속도도 느리나, 예후가 불량한 경우도 있다고 한다. 미세유두선암에서 예후가 불량함을 시사하는 인자로는 나이가 45세 이상, 원격 전이, 피막 침습, 다발성, 림프절 전이, 혈관 침범 등이 있다.¹⁴⁾ 종양 크기의 경우 미세유두선암 중 크기가 5mm 이하인 경우와 5-10mm인 경우 림프절 전이가 각각 13%, 59%로 크기가 큰 경우 더 불량한 것으로 보고하고 있다.¹⁵⁾ Ito 등⁶⁾ 의 연구에서는 7 mm 이상인 경우가 7 mm 이하 보다 예후가 불량하다고 한다.

본 연구에서도 cathepsin B의 발현이 양성으로 나온 군에서 종양의 크기가 유의하게 큰 것으로 나왔다. 나이의 경우 45세 이상인 경우 예후가 불량하며, 본 연구에서 통계적으로 유의하지는 않았으나 cathepsin B 발현군의 평균 연령이 더 높았다.

일본에서 부검시 미세유두선암의 4.3%에서 림프절 전이를 발견하였고,¹⁶⁾ 독일의 경우 14.3%를 보고하였으나,¹⁷⁾ 다른 연구에서는 40%의 높은 림프절 전이를 보고하고 있다.¹⁸⁾ 미세유두선암 환자에 있어 림프절 전이와 예후에 관해서는 논란이 많다. Hay 등¹⁹⁾은 장기추적결과 경부 림프절 전이가 없는 경우 재발율이 1%였으나 전이가 있는 경우 18%에서 재발하여 림프절 전이가 예후에 중요한 인자로 간주하였으나, 생존율에는 영향을 미치지 않는다고 하였다. 다른 연구에서는 림프절 전이가 있는 경우 치명적이라는 보고도 있으며,^{20,21)} 또한 후두신경을 침범하여 애성을 유발하기도 한다고 한다.²²⁾ 본 연구에서 증례수가 적어 통계적으로 유의하지 않았으나 전이가 없는 군에서 cathepsin B의 발현이 낮았고, 특히 외측 림프절 전이가 있었던 9예 중 7예에서 cathepsin B가 양성으로 나와 외측 림프절 전이와 cathepsin B 양성 사이에 연관이 있는 것을 시사해 주었다. 경부의 외측부는 해부학적 구조상 level II-IV 부위를 칭하며, 여기에 위치하는 림프절로는 상, 중, 하 경정맥 림프절(upper jugular LN, midjugular LN, lower jugular LN) 등이 있다. 외측 림프절 전이는 갑상선 암 수술시 육안적으로 알 수 있으며, 수술 전 컴퓨터 단층촬영상 및 초음파 검사로도 알 수 있다. 외측 림프절 전이시에는 재발 및 전이의 예방을 위하여 광범위 절제술을 시행해야 하므로 MRND(modified radical neck dissection)의 적응증이 된다.

Cathepsin B는 aspartyl proteinase인 cathepsin D 등에 의해 procathepsin B에서 cathepsin B로 되며, 활성화된 cathepsin B는 urokinase type plasminogen을 활성화하여, plasminogen을 plasmin으로 변화시킬 뿐 아니라 promatrix metalloproteinases(MMPs)를 MMPs로 변화시켜 세포외기질단백질을 분해하는 역할을 한다.²³⁻²⁴⁾ Cathepsin B는 여러 악성종양에 과발현되는 것으로 알려져 있고, 갑상선 질환에서도 그레이브씨 병과 다발성결절종에 비해 갑상선암에서 cathepsin B의 활성도가 높다. 또한 면역조직화학 연구에 의하면 정상 갑상선 조직에서 cathepsin B는 리소좀 부위에 약하게 불규칙하게 염색되나, 갑상선암 조직에서는 강하고, 미만성으로 염색되며, 특징적으로 기저막 부위를 따라 과립이 발현된다고 한다.²⁵⁾ 본 연구에

서 cathepsin B 발현이 양성이었다던 21예 중 미만성이 9예, 변연부성이 12예였고, 외측 림프절 전이를 보인 7예 모두 미만성을 보여 유의한 차이를 보였다. 또한 림프절 전이를 보인 1예에서 기저막을 따라 cathepsin B가 염색된 것을 관찰하였다. 본 연구에서 cathepsin B가 강하게 발현된 경우는 5예, 약하게 발현된 경우는 16예로 발현정도와 림프절 전이와는 서로 유의한 연관이 없었다.

최근 분자생물학의 발달로 종양의 발생, 자연사멸, 침윤 및 전이에 관여하는 단백질이 발견됨에 따라 갑상선 미세유두선암에 대해서도 연구가 있었고, cyclin D의 과발현, p27의 저발현, 면역조조직화학 검사상 transforming growth factor β 와 Ki-67의 발현 및 p21, p53의 발현등이 미세유두선암의 불량한 인자로 알려져 있다.^{26,27)} 본 연구 결과 단백질 분해 효소로 세포외기질을 분해하여 종양의 침윤과 전이에 관여할 뿐 아니라 종양의 성장, 자연사멸을 유발하는 cathepsin B의 발현도 미세갑상선유두선암의 예후와 관련이 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통하여 미세유두선암이라도 크기가 클 경우 cathepsin B의 발현이 높음을 알 수 있었고, 또한 경부 외측 림프절 전이는 cathepsin B가 미만성으로 발현되거나, cathepsin B가 양성되면서 피막을 침습한 경우에 더 높음을 알 수 있었다.

결 론

세포외기질을 분해하여 종양의 성장, 자연사멸, 침습 및 전이에 관여하는 것으로 알려진 cathepsin B의 발현과 미세유두선암의 임상적 병리학적 특성과 연관이 있는가를 알아보고 연구를 시행한 결과 미세유두선암에서 종양의 크기가 큰 군, 외측 림프절 전이가 있었던 예, 피막 침습이 있는 군에서 높게 발현되었다.

결론적으로 본 연구를 통하여 미세유두선암에서 cathepsin B의 발현과 불량한 예후를 시사하는 크기, 피막 침습, 외측 림프절 전이와 연관이 높음을 알 수 있었다.

참고문헌

- 1) Donohue JH, Goldfien SD, Miller TR, Clark OH: Do the prognosis of papillary and follicular thyroid cancer differ? *Am J Surg* 148: 168-173, 1984
- 2) Ruegemer JJ, Hay ID, Bergstrahl EJ, Ryan JJ, Offord KP,

- Gorman CA: Distant metastases in differentiated thyroid carcinoma: a multivariate analysis of prognostic variables. *J Clin Endocrinol Metab* 67:501-508, 1988
- 3) Bramley MD, Harrison BJ: Papillary microcarcinoma of the thyroid gland. *Br J Surg* 83(12):1674-83, 1996
- 4) Ito Y, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K: An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid* 13(4):381-7, 2003
- 5) Iida F, Sugeno A, Muramatsu A: Clinical and pathologic properties of small differentiated carcinomas of the thyroid gland. *World J Surg* 15:511-5, 1991
- 6) Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K: Preoperative ultrasonographic examination for lymph node metastasis: usefulness when designing lymph node dissection for papillary microcarcinoma of the thyroid. *World J Surg* 28:498-501, 2004
- 7) Ito Y, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K: Papillary microcarcinoma of the thyroid: how should it be treated? *World J Surg* 28(11):1115-21, 2004
- 8) Ito Y, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F: Papillary microcarcinomas of the thyroid with preoperatively detectable lymph node metastasis show significantly higher aggressive characteristics on immunohistochemical examination. *Oncology* 68:87-96, 2005
- 9) Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291:113-135, 2000
- 10) Warwas M, Haczynska H, Gerber J, Nowak M: Cathepsin B-like activity as a serum tumour marker in ovarian carcinoma. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35:301-4, 1997
- 11) Miyake H, Hara I, Eto H: Serum level of cathepsin B and its density in men with prostate cancer as novel markers of disease progression. *Anticancer Res* 24:2573-7, 2004
- 12) Shuja S, Cai J, Iacobuzio-Donahue C, Zacks J, Beazley RM, Kasznica JM: Cathepsin B activity and protein levels in thyroid carcinoma, Graves' disease, and multinodular goiters. *Thyroid* 9(6):569-77, 1999
- 13) Antonelli A, Miccoli P, Ferdeghini M, Di Coscio G, Alberti B, Iacconi P, Baldi V, Fallahi P, Baschieri L: Role of neck ultrasonography in the follow-up of patients operated on for thyroid cancer. *Thyroid* 5(1):25-8, 1995
- 14) Sakorafas GH, Giotakis J, Stafyla V: Papillary thyroid microcarcinoma: a surgical perspective. *Cancer Treat Rev* 31(6):423-38, 2005
- 15) Kasai N, Sakamoto A: New subgrouping of small thyroid carcinomas. *Cancer* 60(8):1767-70, 1987
- 16) Yamamoto Y, Maeda T, Izumi K, Otsuka H: Occult papillary carcinoma of the thyroid. A study of 408 autopsy cases. *Cancer* 65(5):1173-9, 1990
- 17) Lang W, Borrusch H, Bauer L: Occult carcinomas of the thyroid. Evaluation of 1,020 sequential autopsies. *Am J Clin Pathol* 90(1):72-6, 1988
- 18) Ito Y, Uruno T, Nakano K, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K: An observation trial without surgical treatment in patients with papillary microcarcinoma of the thyroid. *Thyroid* 13(4):381-7, 2003
- 19) Hay ID, Grant CS, van Heerden JA, Goellner JR, Ebersold

- JR, Bergstralh EJ: Papillary thyroid microcarcinoma. a study of 535 cases observed in a 50 year period. *Surgery* 112(6):1139-46, 1992
- 20) Harach HR, Franssila KO: Occult papillary carcinoma of the thyroid appearing as lung metastasis. *Arch Pathol Lab Med* 108(7):529-30, 1984
- 21) McConahey WM, Hay ID, Woolner LB, van Heerden JA, Taylor WF: Papillary thyroid cancer treated at the Mayo Clinic, 1946 through 1970: initial manifestations, pathologic findings, therapy, and outcome. *Mayo Clin Proc* 61(12):978-96, 1986
- 22) Sugitani I, Fujimoto Y: Symptomatic versus asymptomatic papillary thyroid microcarcinoma: a retrospective analysis of surgical outcome and prognostic factors. *Endocr J* 46(1):209-16, 1999
- 23) Schmitt M, Janicke F, Moniwa N, Chucholowski L, Pache H, Graeff H: Tumor-associated urokinase-type plasminogen activator: Biological and clinical significance. *Biol Chem Hoppe Seyler* 373(7):611-622, 1992
- 24) van der Stappen JW, Williams AC, Maciewicz RA, Paraskeva C: Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer* 67:547-554, 1996
- 25) Sloane BF. Cathepsin B and cystatins: Evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer Biol* 1(2):137-152, 1990
- 26) Brown DC, Gatter KC: Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17:489-93, 1990
- 27) Soda G, Antonaci A, Bosco D, Nardoni S, Melis M: Expression of bcl-2, c-erbB-2, p53, and p21 (waf1-cip1) protein in thyroid carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 18(3):363-7, 1999