

## 유두상 갑상선암에서 nm23, Bcl2, Bax 발현도의 임상적 의의

연세대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실\*  
성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 일반외과학교실\*\*  
정용윤 · 이해경\*\* · 백소야\* · 박정수

= Abstract =

### Significance of nm23, Bcl2 and Bax Expression in Papillary Thyroid Carcinoma

Woung Youn Chung, M.D., Hae Kyung Lee, M.D.,\*\*  
So Ya Baik, M.D.,\* Cheong Soo Park, M.D.

Departments of Surgery and Pathology,\* Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea  
Departments of Surgery,\*\* Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine,  
Seoul, Korea

**Objective :** The nm23 gene has been identified as a potential metastasis suppressor gene in various human neoplasms. Both Bcl-2, which promotes cell survival, and Bax, which promotes cell death, have been considered as major factors in controlling the apoptotic pathway. This study was carried out to determine whether these markers are useful in distinguishing potential intrinsic differences in tumor virulence of papillary thyroid cancers.

**Material and Method :** The expressions of nm23, Bcl-2 and Bax have been evaluated using immunohistochemical techniques in 100 pure papillary thyroid cancers and 20 metastatic lymphnodes. The intensity of immunoreactivity was graded on arbitrary four point scale(grade 0 or 1 : negative reactivity, grade 2 or 3 positive reactivity). The immunoreactivities were analyzed in relation to TNM atage, AMES score, local recurrence and distant metastasis, and that of metastatic LNs was compared with the tumors.

**Results :** The expression of Bcl-2 and bax did not show any statistical differences by TNM stage, AMES score, recurrence, distant metastasis and also between the tumor and metastatic LN. However, the nm23 showed higher expression of Ki67 in distant metastasis than in control group and in metastatic LNs than in the tumors( $p < 0.05$ ).

**Conclusion :** Although the expression of Bcl-2 and Bax protein showed no correlation with clinical parameters representing tumor virulence, the nm23 expression could be an useful prognostic factor, especially in predicting nodal or distant metastasis in papillary thyroid cancer.

**KEY WORDS :** nm23 · Bcl-2 · Bax · Papillary thyroid cancer.

## 서 론

유두상 갑상선 암은 대부분 종양의 성장속도가 느리고 예후가 매우 좋아 장기생존을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 일부의 유두상 암에서는 동일한 병기 및 분화도에도 불

교신저자 : 박정수, 120-752 서울 서대문구 신촌동 134번지  
연세대학교 의과대학 외과학교실  
전화 : (02) 361-5540 · 전송 : (02) 313-8289  
E-mail : y Surg@yumc.yonsei.ac.kr

구하고 수술 후 국소재발 및 원격전이가 되어 예후가 불량한 경우를 상당수 관찰할 수 있는데, 이는 기존의 예후 인자로서는 알 수 없는 암종 고유의 악성 기전이 존재함을 알 수 있으며, 이를 표현하는 새로운 종양표식 인자에 대한 연구들이 계속되고 있다.

nm23는 종양의 전이 억제유전자로서 이미 여러 암종에서 연구된 바 있으며<sup>1-4)</sup>, 특히, 유방암종의 예후인자로서의 가능성이 이미 보고된 바 있다<sup>5-7)</sup>. 또한, Bcl-2는 원종양유전자(proto-oncogene)로서 apoptosis를 억제하여 세포수

명을 연장시킴으로써 다른 암유전자의 영향을 받을 수 있는 기회를 증가 시켜 암을 유발시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며<sup>89)</sup>, Bax 유전자는 bcl2 유전자와 구조적으로 비슷하며 bcl2 유전자와 상호 경쟁적으로 반응하여 과발현시 bcl2 유전자의 apoptosis 억제기능에 대하여 상반되는 작용을 하여 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되고 있다<sup>101)</sup>.

이에, 본 연구자들은 유두상 갑상선암에 대한 nm23, bcl2, bax 유전자 단백에 대한 면역조직화학염색을 실시하여 기존의 병기(조직병리학적, 임상적) 및 위험군에 따른 발현도의 차이와 연관성을 분석함으로써 유두상 갑상선암의 악성도, 즉, 국소 재발 및 원격전이를 예측할 수 있는 새로운 위험인자로서 유용한가를 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

1989년 1월부터 1997년 12월까지 본원에서 유두상 갑상선암 수술 예 중에서 TNM 병기 및 AMES scoring system에 따른 위험군, 추적관찰기간중 국소재발, 원격전이한 경우를 고려하여 선택된 100예의 병소 및 인접 정상조직이 포함된 파라핀에 포매된 조직과 20예의 전이된 림프절 조직을 대상으로 하였다.

### 2. 광학현미경적 검색

10% 중성 포르말린에 고정 후 파라핀에 포매하여 보관된 블록을 연속 절편하여 hematoxylin-eosin 염색을 하여 세포밀도, 종양내 괴사여부 등을 관찰하여 면역조직화학염색에 적합한지를 알아보았으며, 종양이 많이 포함되고 파라핀 포매조직의 보관상태가 양호한 부위를 선택하였다. 또한, 본 연구의 단일성을 위해 현미경적 소견에서 유두상암 조직 내에 insular component 및 tall cell component 등이 존재한 경우를 배제한 순수한 유두상암 조직만을 선택하였다.

### 3. 면역조직화학염색법

파라핀에 포매된 조직을 3 $\mu$ m 두께로 절단한 후 탈파라핀과 합수과정을 거쳐 3% 과산화수소수(LSAB kit)로 세포 내에 존재하는 페록시다제 활성도를 제거하였다. 조직항원이 잘 노출될 수 있도록 Pepsin용액(Bimoda Corporation, Foster, CA, USA)을 조직 위에 4분간 부치하였다. 조직항원과 항체간의 반응에 있어서 비특이적 결합을 억제하기 위하여 Tissue conditioner용액(LSAB kit)을 4분간 부치한 후, citric acid buffer(pH 6.0)에 침수시킨체로 10분간 microwave에 처리한 후 rabbit anti-human nm23 protein, monoclonal mouse anti-human Bcl-2 oncoprotein

및 polyclonal rabbit anti-human bax protein를 PBS buffer에 각각 1 : 20, 1 : 10, 1 : 20 으로 각각 희석하여 각 절편에 실온에서 약 120분간 반응시킨 후 4°C에서 12시간 정도 부치하였다. Link antibody(LSAB kit)를 조직 위에 5분간 부치한 후 Streptavidine과 Tris/Hcl buffer(LSAB

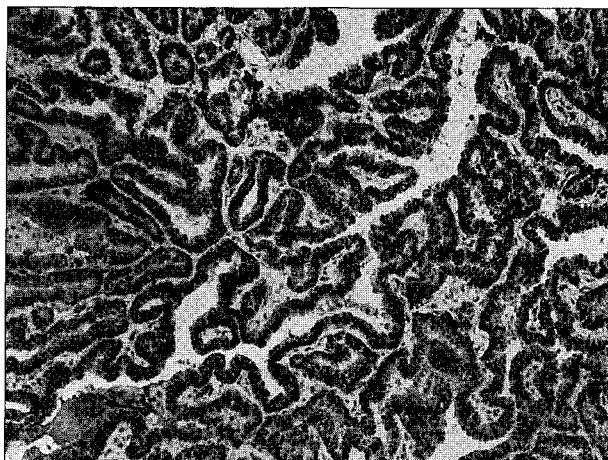


Fig. 1. Immunodetection of nm23 protein with grade 3(X40).

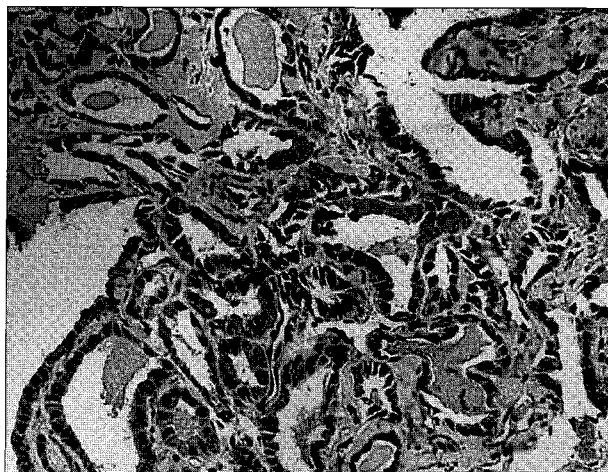


Fig. 2. Immunodetection of Bcl-2 protein with grade 3(X100).

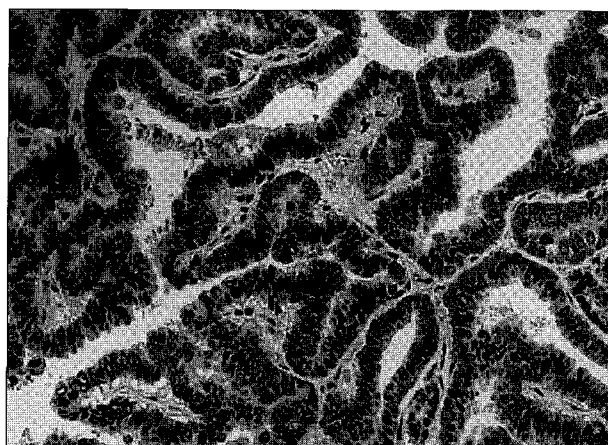


Fig. 3. Immunodetection of Bax protein with grade 2(X100).

Kit)를 60 : 1로 희석하여 4분간 부치하였다. 페록시다제의 역가를 증가시키기 위해 페록시다제 enhancer(Biomedica Corporation, Foster, CA, USA) 처리 후 발색제로 AEC Chromogen(3-Amino-9-ethylcarbazole)을 10분간 부치한 후 Hematoxylin으로 대조염색을 시행하였다. 염색의 전 과정에서 완충액은 10X immunoassay buffer(Biomedica Corporation Foster, CA, USA)을 사용하였다.

#### 4. 검사판독

각 조직의 항체에 대한 발현도는 저배율에서 염색된 세포가 많은 부위를 확인한 후 고배율( $\times 200$ )에서 염색강도에 따라 4등급으로 구분하여, 염색이 되지 않은 대상은 Grade 0, 미약한 염색반응은 Grade 1, 중등도 염색반응은 Grade 2, 강한 염색반응은 Grade 3로 분류하여 Grade 0와 Grade 1은 음성으로, Grade 2와 Grade 3은 양성으로 판정하였다 (Fig. 1, 2, 3). 외부 양성 대조(external positive control)는 이미 확인된 유방암과 위암의 조직을 사용하였으며, nm23, Bcl-2의 내부 양성 대조(internal positive control)는 갑상선 여포 세포(thyroid follicular cell)로, Bax의 내부 양성 대조는 조직내 림프조직 세포(lymphoid cell)로 하였다.

#### 5. 결과분석 및 통계처리

판정된 결과를 TNM 병기 및 AMES score에 의해 분류된 위험군에 따른 발현도의 차이와 연관성을 분석하고, 국소재발 및 원격전이에 따른 발현도의 차이를 알아보았다. 또한, 20예의 전이된 림프절과 중앙에서의 발현도의 차이를 알아보았다.

통계학적 검증은 Chi-square test 및 Mann-Whitney법으로 분석하였으며, 통계학적 유의수준은 95% 이상( $p < 0.05$ )으로 정하였다

## 결 과

nm23의 발현도는 암 조직에서는 79.0%의 양성 발현도를 보였으며, 총 20예의 전이림프절 중 45.0%에서 양성 발현도를 나타내었다. Bcl-2의 발현도는 암 조직과 전이 림프절에서 각각 12.0%, 25.0%의 양성 발현도를 보였고, bax의 양성 발현도는 각각 85.0%, 95.0% 이었다(Table 1).

TNM 병기에 따른 bcl2 및 bax의 양성 발현도는 각 병기간 통계학적으로 유의한 차이가 없었으나, nm23 양성 발현도는 다른 병기에 비해 4기에서 월등히 낮은 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ) (Table 2).

AMES scoring system에 의한 저위험군과 고위험군( $n = 37$ ) 간의 nm23, bcl2, bax의 양성 발현도는 모두 유의한 차이를 발견할 수 없었으며( $p < 0.05$ ) (Table 3), 평균 추적

기간은 81개월(35~152개월)로서 추적관찰 기간 중 국소재발한 예( $n = 23$ )와 대조군과의 nm23, bcl2, bax의 양성 발현도도 모두 유의한 차이가 없었다( $p < 0.05$ ) (Table 4).

**Table 1.** Immunoreactivity of nm23, Bcl-2 and Bax in papillary thyroid cancers

Grade		0	1	2	3
nm23	Tumor*	2	19	54	25
	Metastatic LN**	4	7	8	1
Bcl-2	Tumor*	36	52	11	1
	Metastatic LN**	3	12	3	2
Bax	Tumor*	4	11	53	32
	Metastatic LN**	0	1	12	7

\* :  $n = 100$

\*\* :  $n = 20$

**Table 2.** Distribution of immunoreactivity by TNM stage

	Number of positive reactivity		
	nm23( $n = 79$ )	Bcl-2( $n = 12$ )	Bax( $n = 85$ )
Stage 1( $n = 32$ )	29(90.6%)	2( 6.3%)	29(90.6%)
Stage 2( $n = 21$ )	15(71.4%)	3(14.3%)	17(80.9%)
Stage 3( $n = 34$ )	29(85.3%)	4(11.8%)	29(85.3%)
Stage 4( $n = 13$ )	6(46.1%)	3(23.1%)	10(76.9%)
p-value	<0.05*	>0.05	>0.05

\* : Stage 4 disease versus other stages disease

**Table 3.** Distribution of immunoreactivity by AMES score

	Number of positive reactivity		
	nm23( $n = 79$ )	Bcl-2( $n = 12$ )	Bax( $n = 85$ )
Low risk( $n = 63$ )	52(82.5%)	7(11.1%)	54(85.7%)
High risk( $n = 37$ )	27(73.0%)	5(13.5%)	31(83.8%)
p-value	>0.05	>0.05	>0.05

**Table 4.** Distribution of immunoreactivity by distant metastasis

	Number of positive reactivity		
	nm23( $n = 79$ )	Bcl-2( $n = 12$ )	Bax( $n = 85$ )
Metastasis( $n = 16$ )	7(43.7%)	4(25.0%)	13(81.3%)
Non-metastasis( $n = 84$ )	72(85.7%)	8( 9.5%)	31(85.7%)
p-value	<0.05	>0.05	>0.05

**Table 5.** Distribution of immunoreactivity by local recurrence

	Number of positive reactivity		
	nm23( $n = 79$ )	Bcl-2( $n = 12$ )	Bax( $n = 85$ )
Recurrence( $n = 23$ )	16(69.6%)	3(13.0%)	17(73.9%)
Non-recurrence( $n = 77$ )	63(81.8%)	9(11.7%)	68(88.3%)
p-value	>0.05	>0.05	>0.05

**Table 6.** Immunoreactivity of metastatic LN and tumor

	Number of positive reactivity		
	nm23	Bcl-2	Bax
Metastatic LN( $n = 20$ )	9(45.0%)	5(25.0%)	19(95.0%)
Tumor( $n = 20$ )	16(80.0%)	3(15.0%)	16(80.0%)
p-value	<0.05	>0.05	>0.05

원격전이가 있었던 예(n=16)에서의 bcl2 및 bax의 양성 발현도는 대조군과 유의한 차이가 없었으나, 원격전이가 있었던 예의 nm23 양성 발현도는 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 낮았다(p<0.05)(Table 5).

림프절 전이 20예의 전이 림프절과 종양 간의 양성 발현도는 nm23에서만 통계학적으로 유의한 차이를 보였으나(p<0.05), bcl2와 bax의 양성 발현도는 두 조직간의 유의한 차이가 없었다(Table 6).

## 고 찰

최근, 분자생물학 및 면역조직화학법의 발달로 다른 암종은 물론 갑상선 암에서도 종양의 악성도를 예측할 수 있는 새로운 위험인자를 찾기 위한 연구가 계속되고 있으며, 특히, 여러 악성 종양에서 암억제 유전자 및 암유전자 단백질의 발현양상을 측정하여 종양에 대한 악성도와 예후와의 관련지표를 얻으려는 분자생물학적 시도가 활발하게 진행되고 있다.

nm23 유전자는 종양의 전이 억제유전자로서 현재까지 2종류의 murine type과 2종류의 human type이 알려져 있다. Human type nm23 gene은 염색체 17q21에 위치하며 90% 정도의 유전자 순서의 동질성을 가지는 두 가지 형태의 유전자(nm23 H1과 nm23 H2 gene)로 존재하는데 이 중 nm23 H1이 종양의 전이를 억제하는데 관여한다고 한다<sup>1-4)</sup>. 이미 여러 암종에서 연구된 바 있는데, 악성 흑색종 세포주 중에서 전이능력이 강한 세포주와 전이능력이 낮은 세포주의 nm23 RNA를 측정된 결과 전이능력이 낮은 세포주에서 10배 정도 증가되어 있다고 보고되었고<sup>2)</sup>, 유방 암종에서는 주위 림프조직으로의 전이가 없는 경우가 있는 경우보다 nm23의 발현이 높으며 무병생존기간도 nm23의 발현이 높을수록 연장되는 등 유방 암종의 예후 인자로서 관련이 있을 것으로 보고되었다<sup>5-7)</sup>. 간세포 암종에서도 DNP kinase를 이용한 면역조직화학 검사상 원격전이가 동반된 경우 nm23 발현도가 낮았다고 하였으며<sup>12)</sup>, 위 암종에서는 주위 장막조직과 주변 림프절로의 전이가 있는 경우 nm23 발현이 적었으며, 예후가 좋지 않은 경우에 nm23의 발현이 적었다고 보고된 바 있다<sup>13)</sup>.

갑상선 암에 대한 nm23의 연구도 일부에서 이루어진 바 있는데, 1993년 Davis 등<sup>14)</sup>은 34예의 갑상선 종양과 갑상선 수질암 세포주에서 nm23의 발현도에 대한 정량 분석을 한 결과 서로 다른 종양간에는 발현도의 차이를 발견할 수 있었으나 같은 암종내에서는 림프절 전이 혹은 원격전이가 있는 경우에 대조군의 유의한 차이를 나타내지 못하여 유방암에서의 결과와 같은 전이억제인자로서의 역할을 확인할 수 없었다고 보고하였으며, Horm 등<sup>15)</sup>의 면역조직화학

염색법을 이용한 갑상선 수질암에 대한 nm23 발현도의 연구에서도 마찬가지로 갑상선 수질암에서 nm23의 발현도가 예후 인자로서의 가능성을 제시하지 못하였다고 보고하였다. 그러나, 1993년 Arai 등<sup>16)</sup>은 유두상 갑상선 암의 nm23 mRNA 발현에 대한 연구를 통해서 nm23 H1과 nm23 H2 gene, 두 가지 형태의 유전자 중에서 nm23 H1이 전이 림프절에서 낮게 측정됨으로써 전이 억제 유전자의 역할을 하는 것으로 밝혀내 갑상선 암에서도 예후 인자로서의 가능성을 제시한 바 있으며, 1995년 이들의 연구<sup>17)</sup>에서는 유두상 암 및 여포성 암의 전이조직에서 nm23-H1 유전자 단백질의 발현이 유의하게 감소하였으며, 악성도가 높은 수질암 혹은 미분화 암에서는 그 발현이 유두상 암과 여포성 암에 비해 현격하게 낮아 악성도에 반비례하는 결과를 확인함으로써 갑상선 암에서 예후 인자로서의 가능성을 제시하였다. 본 저자들의 유두상 암에 대한 연구에서도 전이 림프절에서 종양조직에 비해 혹은 원격 전이한 경우에서 대조군에 비해 nm23의 발현도가 유의하게 낮게 나타났으며, 원격전이가 있었던 TNM 병기 4기에서 다른 병기에 비해 유의한 차이를 확인함으로써 유방암에서와 마찬가지로 임상적으로 적용될 수 있는 새로운 예측인자로서의 가능성을 제시할 수 있었다.

한편, apoptosis와 직접적으로 연관되어 제 3의 암유전자로 분류되는 Bcl-2 유전자에 대한 연구가 최근 여러 암종에서 활발히 이루어지고 있는데, Bcl-2 유전자는 원종양유전자(proto-oncogene)로서 apoptosis를 억제하여 세포수명을 연장시켜 다른 암유전자의 영향을 받을 수 있는 기회를 증가시킴으로써 암을 유발시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>8)9)12)13)</sup>.

또한, Bcl-2 유전자와 직접적으로 작용하여 apoptosis를 촉진하는 유전자로 알려진 Bax 유전자는 Bcl-2 유전자와 구조적으로 비슷하며 Bcl-2 유전자와 상호 경쟁적으로 반응하여 이중 결합체나 동종결합체를 형성하는데 Bax 유전자 과발현시 Bcl-2 유전자의 apoptosis 억제기능에 대하여 상반되는 작용을 하여 apoptosis를 촉진하는 것으로 보고되고 있다<sup>10)11)</sup>.

이 같은 Bcl-2와 Bax 유전자는 여러 연구에서 상호 보완적으로 암의 발생과정과 밀접한 연관성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 특히 암세포의 분화도 및 악성도에 대한 보고들이 다수에서 있었다. 즉, 분화가 좋은 follicular type의 악성 림프종에서 Bcl-2의 발현도가 2배에서 3배 증가된 것으로 보고되었고<sup>18)</sup>, 폐암 중 편평상피암에서는 25%에서, 선암에서는 12%에서 발현되어 악성도가 낮은 아종에서 더욱 발현도가 높은 것으로 알려져 있으며<sup>19)</sup>, 특히 유방암에서는 estrogen 수용체의 존재와 밀접한 연관 관계가 있는 것으로 밝혀졌다<sup>20)</sup>.

갑상선 암에서도 특히 세포 분화도와 이 같은 유전자 단백질의 발현도가 매우 밀접한 연관성이 있는 것으로 보고되었는데, 1994년 Pilotti 등<sup>21)</sup>은 Bcl-2의 발현은 대부분의 고분화암에서 나타나는 반면 미분화암에서는 나타나지 않고 대신 Bax의 발현이 지배적이라는 결과를 보고한 바 있다. 또한, 1997년 Manetto 등의 연구<sup>22)</sup>에서는 Bcl-2와 Bax의 발현도가 갑상선암의 분화도에 따라 크게 3가지로 다르게 나타났는데, 즉, 양성 병변 및 고분화 암에서는 Bcl-2 발현이 월등히 우세하였고 tall-cell variant 및 저분화 암에서는 Bcl-2와 Bax의 발현이 비슷하였으며, 미분화 암에서는 Bax의 발현이 지배적이라는 비슷한 결과를 보고하였다. 따라서 본 저자들은 이 같이 유두상 암의 아종에 따라 발현도의 차이를 보일 수 있는 가능성을 배제하기 위해 광학현미경적 검색을 통해 유두상 암 조직 내에 insular component 및 tall cell component 등이 존재한 경우를 배제한 순수한 유두상 암 조직만을 선택하여 실험의 정확성을 기하였다. 또한, Bcl-2는 정상 갑상선 여포 세포에서 높은 발현도를 보이는 반면, Bax는 정상 갑상선 여포 세포에서는 발현되지 않고 림프조직 세포에서 발현도가 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서도 Bcl-2의 내부 양성 대조를 갑상선 여포 세포로 정하였고, Bax의 경우는 림프조직 세포로 정하였다.

한편, Bcl-2와 Bax의 발현과 갑상선 암의 분화도 및 악성도와의 연관성은 일부 연구에서는 상반된 결과를 보이고 있어 연구재료 및 실험방법에 따른 차이가 존재함을 알 수 있다. 즉 1996년 Brante 등의 연구<sup>23)</sup>에서는 유두상 암에서 Bcl-2와 Bax의 발현이 모두 나타났으나 발현 강도가 오히려 Bax에서 우세하였고 미분화 암에서는 두 유전자 단백질의 발현도가 모두 낮게 나타났음을 보고하였다. 유두상 암 조직에서 본 연구의 결과는 Bcl-2의 발현도가 12.0%이었고 Bax의 양성 발현도가 85.0%로 Brante 등의 연구와 비슷한 결과를 보였는데, 비록 연구자간의 분석관점의 차이가 존재하겠지만 Brante 등의 연구결과를 본 연구와 같이 grade 2 이상을 양성 발현도로 판정한다면 각각 양성 발현도가 26.1%(6/23), 82.6%(19/23)로 더욱 비슷한 결과를 나타낼 수 있었다.

이 같은 연구결과의 상반성은 사용한 항체의 차이, 유전자 단백질간의 교차반응의 존재 가능성 및 각 유전자 단백질의 활성형태의 아종이 존재하여 연구결과의 오차를 초래한 것으로 생각되며, 결국 면역화학염색법을 이용한 연구의 한계점으로 생각할 수 있다. 따라서, 본 연구에서 Bcl-2와 Bax의 TNM 병기, AMES score, 국소재발, 원격전이에 따른 발현도의 차이 및 전이된 림프절과 종양에서의 발현도의 차이가 유의한 결과를 나타내지 못하였던 것은 Bcl-2 및 bax에 대한 연구의 문제점으로 생각되며 좀 더 객관적이고 정

확한 연구를 통해 유용한 결과를 얻어낼 수 있으리라고 생각된다.

이상의 결과로 유두상 갑상선 암에서 bcl2 및 bax의 위험인자로서의 유용성은 적을 것으로 생각되나, nm23의 발현도는 림프절 전이 및 원격전이를 예측할 수 있는 예측인자로서의 가능성이 있을 것으로 사료된다.

본 논문은 1998년도 연세대학교 연구위원회 학술연구비 보조로 이루어졌음.

본 논문의 요지는 2000년 춘계 대한외과학회 학술대회에서 발표되었음.

## References

- 1) Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L et al : Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst.* 1988 ; 80 : 200-204
- 2) Xerri L, Grob JJ, Battyani Z et al : nm23 expression in metastasis of malignant melanoma is a predictive prognostic parameter correlated with survival. *Br J Cancer.* 1994 ; 70 : 1224-1228
- 3) Yamaguchi A, Urano T, Fushida S et al : Inverse association of nm23/NDP kinase-h1 expression by colorectal cancer with liver metastasis. *Br J Cancer.* 1993 ; 68 : 1020-1024
- 4) Stahl MA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS : Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res.* 1991 ; 51 : 445-449
- 5) Tokunaga Y, Urano T, Furukawea K, Kondo H, Kanematsu T, Shiku H : Reduced expression of nm23/NDP kinase-h1, but not nm23/NDP kinase-h2, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer. *Int J Cancer.* 1993 ; 55 : 66-71
- 6) Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS : Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal carcinoma with lymph node involvement and other histological indicator of high metastatic potential. *Cancer Res.* 1989 ; 49 : 5185-5190
- 7) Hennessy C, Henry Ja, May FEB, Westely BR, Angus B, Lennard TWJ : Expression of antimetastatic gene nm23/NDP kinase in human breast cancer : an association with good prognosis. *J Natl Cancer Inst.* 1991 ; 83 : 281-285
- 8) Korsmeyer SJ : Bcl2 initiates a new category of oncogenes : regulators of cell death. *Blood.* 1992 ; 80 : 879-884
- 9) Reed JC, Cuddy M, Slabiak T et al : Oncogenic potential of bcl2 demonstrated by gene transfer. *Nature.* 1988 ; 336 : 259-267
- 10) Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ : Bcl2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993 ; 74 : 609-615
- 11) Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ : BH1 and BH2 domains of Bcl2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature.* 1994 ; 369 : 321-327
- 12) Nakayama T, Ohtsura A, Nakao K et al : Immunohistoche-

- mical analysis of nucleoside diphosphate kinase or nm23 gene product expression in human hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1992 ; 84 : 1349-1345
- 13) Koderá Y, Isobe K, Yamauchi M et al : *Expression of nm23-H1 RNA levels in human gastric cancer. A negative correlation with nodal metastasis.* *Cancer.* 1994 ; 73 : 259-265
  - 14) Davis RF, Norman LE, Clive SG et al : *Expression of a potential metastatic suppressor gene(nm23) in thyroid neoplasm.* *World J Surg.* 1993 ; 17 : 615-621
  - 15) Horm R, Hoie J, Kaalhus O, Nesland JM : *Immunohistochemical detection of nm23/NDP kinase and cathepsin D in medullary carcinoma of the thyroid gland.* *Virchows Arch.* 1995 ; 427 : 289-294
  - 16) Arai T, Watanabe M, Onodera M et al : *Reduced nm23-H1 messenger RNA expression in metastatic lymph nodes from patients with papillary carcinoma of the thyroid.* *Am J Pathol.* 1993 ; 142 : 1938-1944
  - 17) Arai T, Yamashita T, Urano T et al : *Preferential reduction of nm23-H1 gene production in metastatic tissue from papillary and follicular carcinoma of the thyroid.* *Modern Pathol.* 1995 ; 8 : 252-256
  - 18) Ngan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML : *Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the Bcl-2 protein associated with the t(14 ; 18) translocation.* *N Engl J Med.* 1988 ; 318 : 1638-1644
  - 19) Pezzella F, Turley H, Kuzu I et al : *Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma.* *N Engl J Med.* 1993 ; 329 : 690-694
  - 20) Doglioni C, Dei-Tos AP, Laurino L, Chiarelli C, Barbareschi M, Viale C : *The prevalence of Bcl-2 immunoreactivity in breast carcinoma and its clinicopathological correlates, with particular reference to estrogen receptor status.* *Virchows Arch.* 1994 ; 424 : 47-51
  - 21) Pilotti S, Collini P, Rilke F, Cattoretti G, Del Bo R, Pierotti MA : *Bcl-2 protein expression in carcinomas originating from follicular epithelium of the thyroid gland.* *J Pathol(lond).* 1994 ; 172 : 337-342
  - 22) Manetto V, Lorenzini V, Cordon-Cardo C et al : *Bcl-2 and Bax expression in thyroid tumors : An immunohistochemical and Western blot analysis.* *Virchows Arch.* 1997 ; 430 : 125-130
  - 23) Brante F, Brousset P, Krajewski S et al : *Expression of the cell death-inducing gene bax in carcinomas developed from the follicular cells of the thyroid gland.* *J Clin Endocrinol Metabol.* 1996 ; 81 : 2726-2730