

갑상선 종양에서 아포프토시스(Apoptosis)와 세포증식 표지자(Ki-67)의 상관관계 분석

연세대학교 의과대학 병리학교실¹, 동국대학교 생명과학과², 을지대학교 임상병리학과³

한 경 희¹ · 양 우 익¹ · 김 선 정² · 김 태 전³

Correlation Analysis of Apoptosis and Cell Proliferating Marker (Ki-67) in Thyroid Tumors

Kyung-Hee Han¹, Woo-Ick Yang¹, Sun-Jung Kim², and Tai-Jeon Kim³

Department of Pathology, Yonsei University Collage of Medicine, Seoul, 120-752, Korea¹

Department of Life Science, Dongguk University, Seoul, 100-715, Korea²

*Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Eulji
University, Gyeonggi-do, 461-713, Korea³*

To clarify the growth mechanisms of thyroid tumors, we investigated apoptotic cells in 88 thyroid tumors, consisting of 24 adenomas, 58 papillary thyroid carcinomas, and 6 undifferentiated carcinoma, using terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate digoxigenin-nick end labeling (TUNEL). The cell proliferating marker was also evaluated immunohistochemically using the monoclonal antibody to Ki-67 antigen (MIB-1) in the same tumors. The apoptosis was expressed as a percentage of the TUNEL-positive cells in the tumor cells, and a proliferating marker, being the percentage of Ki-67 positive cells, was counted up each tumor. The statistical analysis were used analysis of variance (ANOVA) and student's t-test that were analyze the differences in the rate of each histological types of the thyroid tumors. The overall level of apoptosis was extremely low in all histological types of the thyroid tumors analyzed, the mean apoptosis being 0.31 ± 0.40 in adenoma, 0.55 ± 0.48 in papillary thyroid carcinoma, and 4.60 ± 3.27 in undifferentiated carcinoma. The Ki-67 protein in the thyroid tumor subtypes was significantly lower in adenoma and papillary carcinoma, at 2.45 ± 2.99 and 6.27 ± 4.42 , respectively, than that in undifferentiated carcinoma at 26.47 ± 23.88 ($p < 0.0001$). There was no correlation between clinicopathological factors and apoptosis or Ki-67 in papillary thyroid carcinoma. In conclusion, our findings suggest that apoptosis occurs infrequently in thyroid tumor, and that cell proliferating maker Ki-67 markedly differs according to the thyroid tumor subtypes. Moreover, the ratio between proliferating cells and apoptotic cells may reflect thyroid tumor progression.

Keywords : Apoptosis, Ki-67, TUNEL, Papillary thyroid carcinoma

I. 서 론

인체의 정상조직은 세포증식과 세포사멸 사이의 균형으로 항상성을 유지하고 있으며(Kerr 등, 1972), 다양한 원인에 의하여 세포증식이 활성화되거나 세포사가 감소하면 세포의 수가 증가하여 종양을 형성하게 된다(Birchall 등, 1996; Bertram, 2000). 따라서 종양의 전체 성장은 세포생산과 세포죽음 사이의 불균형으로 인하여 초래된 결과라고 생각된다. 아포프토시스는 세포사의 한 형태로 외부인자의 자극이나 내적인 변화에 의하여 세포사의 경로가 활성화되어 세포를 제거하는 선택적인 과정이며(Wylli, 1981; Umansky, 1982; Bursch 등, 1990; Ucker, 1991), 배아의 발생동안 세포집단의 중요한 조절자라고 생각되고(Garcia-Martine 등, 1993), 면역체계에서 뿐만 아니라(Cohen, 1991) 정상과 신생물 조직에서도(Wylli, 1992) 내인성 endonuclease의 활성화 결과로 핵내 DNA 분절 조각이 되어지는 생화학적 특징을 가지고 있다(Gavrieli 등, 1992). 아포프토시스 세포는 핵 DNA 조각과 세포질 소기관으로 구성되어 막으로 싸여 있으며 단지 수분동안 출현하고(Russell 등, 1972; Sanderson, 1976; Mater, 1979; Kerr 등, 1987), 아포프토시스체는 여러 가지 형태로 탐식되기 전에 수 시간 동안 보여지고 주위의 실질세포나 대식세포에 의해 탐식되어 리소솜에 의해 분해된다(Wyllie, 1980; Bursch 등, 1990). 아포프토시스는 TUNEL방법에 의하여 파라핀 포매 절편에서 DNA 분절 조각을 가진 세포를 증명할 수 있다(Gavrieli 등, 1992). Ki-67은 세포주기 중에서 G1기를 제외한 모든 주기에서 세포의 핵에 발현하는 단백질로 세포의 증식상태를 나타내주는 표지자로서 면역조직화학적 염색을 통하여 양성으로 염색된 핵에서 관찰된다(Cattoretto 등, 1992). 따라서 갑상선 종양의 선종, 유두상 암종, 그리고 미분화 암종에서 종양 진행이 매우 다르다는 것을 고려하였고, 종양의 성장기전을 명백하게 하기 위하여 in situ DNA 분절 조각을 증명하는 TUNEL 방법으로 아포프토시스를 검출하고, 세포의 증식표지자인 Ki-67 단백질을 면역조직화학적 방법에 의하여 발현율을 조사하였다. 이들의 결과를 통계학적으로 분석하여 종양의 진행에 따른 상호관계를 평가해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

조직검체는 갑상선종양을 수술 또는 생검한 88명 환자로 부터 얻었다. 이들 종양의 조직학적 양상은 World Health Organization(WHO)에 의해 제안된 기준에 따라서 병리학적으로 진단된 것을 분류하였다. 갑상선 종양은 24예 선종, 58예 유두상 암종, 그리고 6예 미분화 암종이며, 정상조직은 선종과 유두상 암종의 주위조직으로 정상세포로 구성된 여포(follicle)가 있는 부분으로 하였다.

2. 방 법

1) *In situ* DNA 분절 조각 apoptosis 염색(ApopTag in situ kit)

Apoptosis에 대한 염색은 ApopTag[®] in situ apoptosis detection kit(Chemicon, International, Inc, USA)를 이용하여 TUNEL 과정에 의해서 검출하였고, 파라핀 포매 절편에서 분절된 DNA를 가진 세포를 동정함으로써 in situ DNA 분절 조각이 표지된다. 아포프토시스체에 존재하는 DNA의 말단 3'-OH에 digoxigenin nucleotide를 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)의 특이적 결합에 의해 부착시킨 후 antidigoxigenin-peroxidase를 반응시킨다. 요약하면, TUNEL 염색과정은 탈파라핀 후에 PBS(pH 7.4)에 5분간 담그고, proteinase K(Sigma, St. Louis, MO, USA) 20 µg/mL 로 37°C에서 15분 전처리하였다. 내인성 과산화효소는 PBS에 3% H₂O₂로 인큐베이션하였고, PBS에 수세한 다음, equilibration buffer를 커버글라스로 덮고 실온에 10초 인큐베이션하고 4°C에 1시간 동안 최적의 stopping points를 한다. Reaction buffer를 커버글라스로 덮은 다음 습윤 상태 37°C에 1시간 인큐베이션 시키고, working strength stop/wash buffer에 실온에서 15초 혼든 후 10분간 두어 반응을 정지시켰고, PBS에 5분 담그고, antidigoxigenin conjugate를 실온에서 30분간 인큐베이션 하였다. PBS에 10분간 담근 후에 DAB(diaminobenzidine)에 발색하고 Mayer's hematoxylin에 대조염색하였다. 양성대조군은 림프절을 동일한 과정으로 염색하였다.

2) Ki-67의 면역조직화학 검사

Ki-67 항원에 대한 단클론 항체(MIB-1; DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 사용하여 면역조직화학 염색으로 평가하였다. 이 항원은 성장분획에 존재한다(Gerdes 등, 1992; Cattoretti 등, 1992). 면역조직화학 염색은 EnVision 시스템을 사용하였고, 염색과정은 조직표본 파라핀블록을 박절기를 이용하여 3 μ m 두께로 박절한 다음, 3-aminopropyltriethoxy silane(Sigma Chemical, Germany)으로 처리된 코팅 슬라이드에 박절된 리본을 부착시켰다. 탈파라핀과 함수과정을 거친후, 3% H₂O₂에 담그고, 수세한 후, 10 mM citrate buffer(pH 6.0)를 microwave에 10분간 예열한 후, 슬라이드를 담그고 다시 15분 끓인다. 실온에서 30분간 방치한 후, PBS(pH 7.5)에 10분간 담그고, 1차 항체로 Ki-67(MIB-1)를 1:100으로 희석하여 슬라이드에 반응시키고, 냉장고에 18시간 넣어둔다. 슬라이드를 PBS(pH 7.5)에 수세한 후, EnVision™ Detection System (DAKO, Carpinteria, CA, USA)을 30분간 반응을 시키고, PBS(pH 7.5)에 수세한 후에 DAB(diaminobenzidine) 발색제에 5분간 발색시키고, PBS(pH 7.5)에 3분간 담근 후, 수세한다. Mayer's hematoxylin에 5분간 대조염색하고, 수세한 다음, 단계적 알코올에 탈수시키고, xylene에 투명하여 봉입한다. 양성 대조군은 자궁외경부로 동일한 염색과정으로 염색하였다.

3) 아포프토시스의 TUNEL 염색과정

농축된 핵 또는 핵막부분에 적갈색으로 분명하게 염색된 핵들을 양성세포로 규정하였으며, 각 샘플의 무작위 3부분을 세어 평균을 내었고, 종양세포 1000개 이상의 양성세포를 세어 양성세포의 백분율(%)을 구하였다.

4) Ki-67 면역조직화학 염색과정

핵이 뚜렷한 적갈색으로 염색된 세포를 양성세포로 판정하였으며, 각 샘플의 무작위 3부분을 세어 평균을 내었고, 종양세포 1000개 이상의 양성세포를 세어 양성세포의 백분율(%)을 구하였다.

5) 통계 분석

갑상선 종양의 유형에 따라 다양한 비율의 차이를 분석하였고, 통계학적 검증은 1요인 분산분석(one way ANOVA,

Analysis of variance)과 Student's t-test를 사용하였으며, 값은 평균±표준편차(mean±SD)를 백분율(%)로 표시하였다. 통계분석에 사용된 프로그램은 SAS(Statistical Analysis System) v9.1(SAS Institute Inc. Cary, NC)을 이용하였으며 p 값은 0.05이하를 통계학적으로 의미가 있는 것으로 하였다.

III. 결 과

1. TUNEL 방법에 의한 아포프토시스의 검출

림프절을 대조조직으로 사용하였으며, TUNEL 방법에 의해 염색된 많은 세포는 Fig. 1a에서 보이는 것과 같이 림프절의 피질과 수질에서 보였다. 그러나 갑상선의 선종(Fig. 1b)과 유두상 암종(Fig. 1c)에서는 단지 몇 개의 염색된 세포가 보이며, 미분화 암종의 세포들은 염색된 세포의 수가 훨씬 많았다(Fig. 1d). 갑상선 종양의 조직학적 유형에 따라 아포프토시스의 검출률은 Table 1과 같다. 정상, 선종, 유두상 암종, 그리고 미분화 암종의 네 그룹간의 분산분석(ANOVA)을 하여 나타난 결과를 보면 그 값은 정상 0.25±0.42, 선종 0.31±0.40, 유두상 암종 0.55±0.48, 그리고 미분화 암종 4.60±3.27 로 나타났다(p<0.0001). 분산분석 후에 Tukey's 방법으로 종양 그룹간의 비교 검정한 결과는 정상, 선종, 그리고 유두상 암종의 세 그룹간에 평균값의 유의한 차이는 없었으나, 유두상 암종과 미분화 암종사이에는 평균값의 유의한 차이를 나타내었다(p<0.05).

2. 면역조직화학 염색에 의한 Ki-67의 발현

Ki-67의 발현율을 조사하기 위해 면역조직화학 염색을 하여 관찰한 결과 정상(Fig. 2a), 선종(Fig. 2b), 유두상 암종(Fig. 2c), 그리고 미분화 암종(Fig. 2d)에서 핵에 적갈색으로 염색된 것을 양성으로 하였다. 갑상선의 각 조직학적 유형에 따른 Ki-67의 발현율은 Table 1에서 나타내었다. 정상, 선종, 유두상 암종, 그리고 미분화 암종의 네 그룹간의 분산분석(ANOVA)한 결과를 보면 그 값은 정상 0.56±0.85, 선종 2.45±2.99, 유두상 암종 6.27±4.42, 그

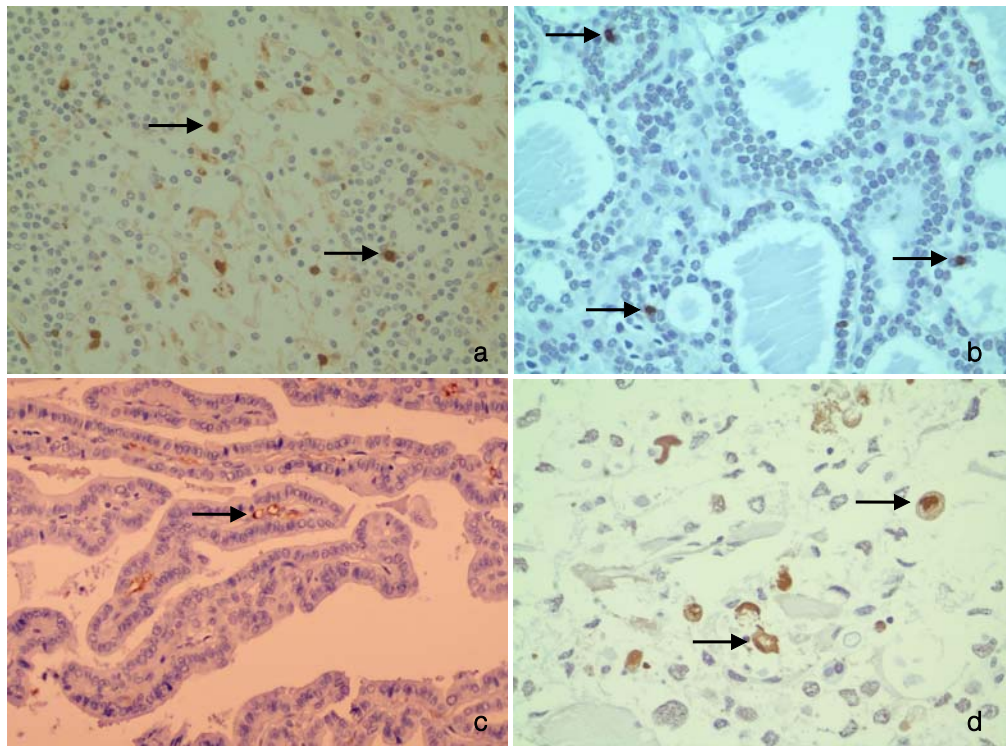


Fig. 1. TUNEL staining of the microdissected tissues of the thyroid tumors-positive cells (arrows). (a) Lymphnode used as a control. ($\times 200$) (b) Adenoma ($\times 400$). (c) Papillary carcinoma ($\times 400$). (d) Undifferentiated carcinoma ($\times 400$).

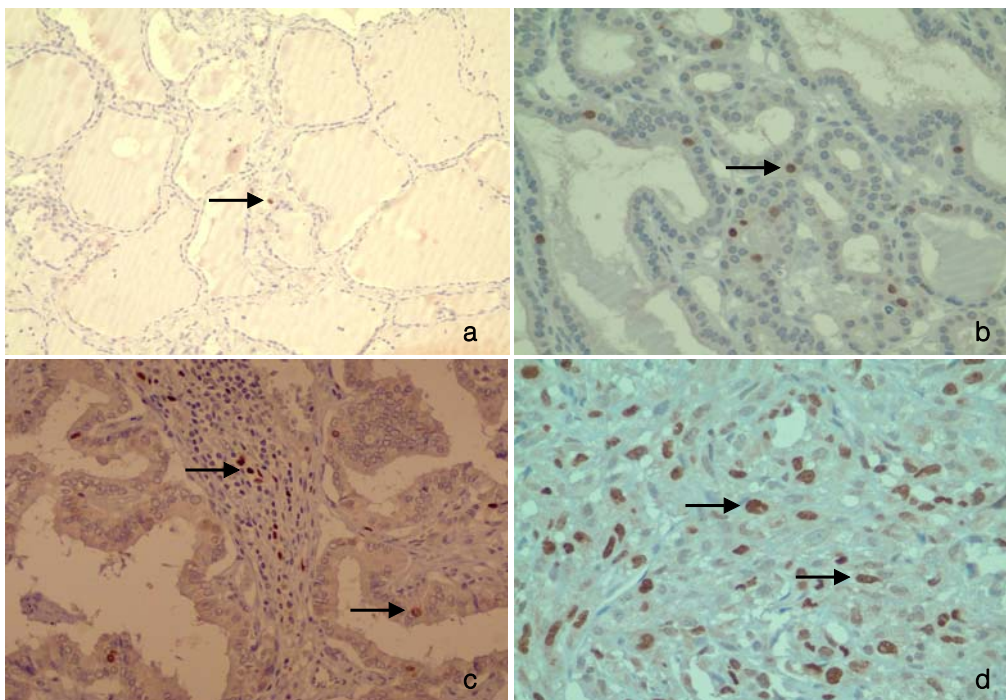


Fig. 2. Immunohistochemical staining for Ki-67 in thyroid tumors (EnVision detection system). (a) Normal ($\times 200$). (b) Adenoma ($\times 400$). (c) Papillary carcinoma ($\times 400$). (d) Undifferentiated carcinoma ($\times 400$).

Table 1. The apoptosis and Ki-67 protein in thyroid tumors

Histological type	No. of cases	Apoptosis		Ki-67		Ki-67/Apoptosis
		mean±SD	Range	mean±SD	Range	mean±SD
Normal ^a	82	0.25±0.42	0-2.4	0.56±0.85	0-3.73	2.34±3.57
Adenoma ^b	24	0.31±0.40	0-1.29	2.45±2.99	0.12-13.53	8.82±11.18
Papillary Ca. ^c	58	0.55±0.48	0.02-2.12	6.27±4.42	0.35-20.29	25.08±36.77
Undifferentiated Ca. ^d	6	4.60±3.27	1.44-10.63	26.47±23.88	10.96-74.22	11.60±19.51
P-value		<0.0001		<0.0001		0.0004
Post-hoc test*		d>c=b=a		d>c>b=a		c=d=b>a

Ca. : Carcinoma

* : Post-hoc test using Tukey's method

Table 2. Relationship between the apoptosis or Ki-67 and clinicopathological factors in papillary thyroid carcinoma

Factor	No. of cases	Apoptosis		Ki-67		Ratio Ki-67/Apoptosis		
		mean±SD	t-Test	mean±SD	t-Test	mean±SD	t-Test	
Age	<40	23	0.60±0.55	n.s	5.87±3.57	n.s	26.20±31.65	n.s
	≥40	35	0.51±0.43		6.53±4.94		24.34±40.21	
Gender	Male	8	0.59±0.51	n.s	7.64±5.74	n.s	30.77±35.38	n.s
	Femal	50	0.54±0.48		6.05±4.21		24.17±37.25	
Tumor size	<2.5 cm	37	0.56±0.50	n.s	5.98±4.15	n.s	21.02±25.36	n.s
	≥2.5 cm	21	0.52±0.46		6.78±4.93		32.23±51.10	

n.s : not significant

리고 미분화 암종 26.47±23.88을 나타냈다(p<0.0001). 분산분석 후의 조직학적 유형 따라 그룹간의 비교는 Tukey's 방법으로 검정하였고, 그 결과는 정상과 선종사이의 평균값은 통계학적으로 유의한 차이는 없었으나, 선종 보다는 유두상 암종의 평균값이 통계학적으로 유의하게 높았으며, 유두상 암종 보다는 미분화 암종의 평균값이 통계학적으로 유의하게 높았다(p<0.05).

3. Ki-67/Apoptosis 의 비율

갑상선 종양의 조직학적 유형에 따라 Ki-67/Apoptosis의 비율을 평가하였다(Table 1). 이 비율의 값은 정상조직에서 매우 낮았으며, 그 값은 정상 2.34±3.57, 선종 8.82±11.18, 유두상 암종 25.08±36.77, 그리고 미분화 암종 11.60±19.51 로 나타났다. 선종, 유두상 암종, 그리고 미분화 암종 사이의 세 그룹간의 유의한 차이는 없었으나, 정상보다는 종양인 세 그룹이 유의하게 높았다

(p<0.05). 그룹간의 비교 검정에서는 정상 갑상선 조직 보다는 유두상 암종이 통계학적으로 유의하게 높았다(p=0.0004).

4. 유두상 암종에서 아포프토시스, Ki-67, 그리고 임상병리학적 요소들(Clinicopathological factors)

유두상 암종에서 아포프토시스, Ki-67, 그리고 Ki-67/Apoptosis 비율을 환자의 나이 40세 미만과 40세 이상, 성별, 종양의 크기 2.5 cm 미만과 2.5 cm 이상에 따라서 평가하였다. 각 그룹별 인자들 사이를 student's t-test 한 결과 의미있는 차이는 없었다. 다만 성별의 발생률에서 남자 8예(13.8%), 여자 50예(86.2%)로 여성의 발생률이 훨씬 높았다(Table 2).

IV. 고 찰

갑상선 분화 암종의 대부분은 통증이 없고 성장이 극히 느린 양호한 예후를 나타내는 종양이다. 이것과 대조적으로 미분화 암종은 인체에서 발생하는 가장 활동적인 신생물로 알려져 있고, 진단 후 평균 생존기간이 6개월 이하이다(Carcangiu 등, 1985). 미분화 암종과 분화 암종 모두 갑상선의 여포상피 세포로부터 유래되었다고 생각된다. 종양 성장기전의 이해는 임상적으로 유용하며 종양세포의 생물학적 활성을 설명하고 있을 뿐만 아니라, 최적의 치료일정을 계획할 수 있다. 본 연구는 동일한 검체에서 다양한 갑상선 종양의 아포프토시스와 세포증식 표지자로 Ki-67 단백질을 실험하였다. 이들의 결과는 통계 프로그램 중에서 1요인 분산분석(ANOVA)과 student's t-test를 사용하여 분석하였다. 분석된 아포프토시스의 총 수준은 모든 조직학적 유형에서 매우 낮았으나, 미분화 암종에서는 비교적 높은 수치를 나타내었다. Staunton과 Gaffney(1995)는 인체의 다양한 종양 유형에서 아포프토시스를 형태학적으로 연구하였으며, 유방, 대장, 그리고 비소세포 폐암종에서 1~7% 범위를 나타내었고, 갑상선 여포암종에서는 1% 이하였다고 보고하였다. Basolo 등(1997)은 아포프토시스를 TUNEL염색을 이용하여 결과를 얻었으며, 갑상선의 유두상 암종에서 평균 0.2%를 나타내었고, 미분화 암종에서는 평균 1.4%를 나타내었으며, 그 외에 모든 유형에서는 매우 낮은 것으로 보고하였다. 그들은 또한 갑상선 신생물의 진행은 아포프토시스가 증가하는데 직접적인 상관관계가 있었다고 보고하였다. 우리의 연구 결과는 선종과 분화가 양호한 유두상 암종에서 매우 낮았으며, 반면에 미분화 암종에서는 매우 높게 나타났고, 미분화 암종과 다른 유형의 종양들 사이에는 통계학적으로 평균값의 유의한 차이가 있는 것으로 나타나(Table 1) 이전에 연구한 것들과 일치하는 경향을 보였다.

세포 증식표지자인 Ki-67 단백질은 유사분열시기에 핵에 염색되는 것으로 자궁경부상피에서는 신생물의 정도가 높아질수록 증가한다고 보고하였고(Konishi 등, 1991), 유방암에서도 임상과 병리학적 특징에 따라 증가한다고 보고 하였다(Beronese와 Gambacorta, 1991). 갑상선 종양에서는 선종과 분화가 양호한 암종은 낮았으나 미분화

암종은 높게 나타났고, 이들 결과는 종양들 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타낸 것으로 보고하였다(Katoh 등, 1995 ; Yoshida 등, 1999). 본 연구에서는 이들 연구의 평균값 보다 높게 나타났으며, 선종보다 유두상 암종이 높았고 유두상 암종보다 미분화 암종이 높게 나타났으며 이들 종양들 사이에 통계학적으로 유의한 차이를 나타냄으로써 이들의 연구 결과와 경향이 일치하였다. 따라서 종양이 진행함에 따라 세포의 증식이 활발한 것을 알 수 있었고, 이것은 종양의 진행과정을 예측할 수 있을 뿐만 아니라 진단에도 많은 도움이 될 수 있을 것으로 생각된다.

Ki-67/Apoptosis의 비율은 증식세포와 아포프토시스 세포 사이에 균형을 나타내는 것으로 Konstaninos 등(2005)은 분화 암종인 여포상 암종과 유두상 암종에서 각각 9.4와 9.7을 나타내었으며, Yoshida 등(1999)은 분화 암종에서 4.4를 나타내었고 미분화 암종에서는 15.6으로 매우 높게 나타났다. 우리의 연구에서는 종양들 사이에 변화가 심하여 각 조직학적 유형에 따라 상당한 차이가 있음을 보여주고 있으며 미분화 암종보다 유두상 암종이 훨씬 높게 나타나 이들 연구와 차이를 보였다. 이 모순은 유두상 암종의 표준편차가 매우 큰 것으로 보아 동일한 종양이라도 개체에 따라 종양의 증식정도가 다른 것으로 생각된다.

유두상 암종에서 Ki-67/아포프토시스 비율은 임상병리학적 요소인 나이, 성별, 그리고 종양의 크기 등의 사이에 통계학적으로 유의한 상호관계가 없었으며, 이것은 종양의 크기가 2.5 cm 이상에서 가장 높게 나타났다. 다른 연구에서 분화 암종의 예후는 조직병리 양상(Laster 등, 1988), 종양 병기(Wanebo 등, 1992), 그리고 환자의 나이와 성별(Cady 등, 1979 ; Tubiana 등, 1985) 등에 상관관계가 있다고 보고되었다.

따라서 분화 암종에서 아포프토시스와 세포증식은 임상적 의의를 결정하는데 필요하며, 본 연구의 결과들은 아포프토시스가 갑상선 종양에서 드물게 발생되고, 세포 증식 정도는 선종 또는 분화 암종과 미분화 암종 사이에 현저하게 차이가 난다는 것을 증명하였다. 이 불균형한 차이는 다양한 갑상선 신생물들 사이에 종양 진행의 차이에 의하여 반영되어지는 것 같다.

감사의 글

본 연구는 2007년 (주)성곤무역과 한국임상병리학과 교수협의회·조직세포분과회의 지원금으로 수행되었음에 감사를 드립니다.

참고 문헌

- Basolo F, Pollina L, Fontanini G, Fiore L, Pacini F, Baldanzi A. Apoptosis and proliferation in thyroid carcinoma : correlation with *bcl-2* and p53 protein expression. *Br J Cancer* 75:537-541, 1997.
- Beronese SM, Gambacorta M. Detection of Ki-67 proliferation rate in breast cancer: Correlation with clinical and pathologic features. *Am J Clin Pathol* 95:30-34, 1991.
- Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 21:167-223, 2000.
- Birchall M, Winterford C, Tripconi L, Harmon B. Apoptosis and mitosis in oral and oropharyngeal epithelia : evidence for a topographical switch in pre-malignant lesion. *Cell Prolif* 9:447-456, 1996.
- Brusch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol* 88:1071-1074, 1990.
- Cady B, Sedgwick CE, Meissner WA, Wool MS, Salzman FA, Weber J. Risk factors analysis in differentiated thyroid cancer. *Cancer* 43:810-820, 1979.
- Carcangiu MI, Steeper T, Zampi G, Rosai. Anaplastic thyroid carcinoma : A study of 70 cases. *Am J Clin Pathol* 83:135-158, 1985.
- Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant part of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cell in microwave processed formalin fixed paraffin section. *J pathol* 168:357-363, 1992.
- Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv Immunol* 50:55-85, 1991.
- Garcia-Martine V, Macias D, Ganán Y, Garcia-Lobo JM, Francia MV, Fernandez-Teran MA, Hurle JM. Internucleosomal DNA fragmentation and programmed cell death (apoptosis) in the interdental tissue of the embryonic leg bud. *J Cell Sci* 106:201-208, 1993.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501, 1992.
- Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin fixed and routinely processed tissue. *J Pathol* 168:85-86, 1992.
- Katoh R, Bray CE, Suzuki K, Komiyama A, Hemmi A, Kawaoi A, Oyama T, Sugai T, Saso U. Growth activity in hyperplastic and neoplastic human thyroid determined by an immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody MIB-1. *Hum Pathol* 26:139-146, 1995.
- Kerr JFR. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to change in lysosome. *J Pathol Bacteriol* 90:419-435, 1965.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : Basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257, 1972.
- Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis : In perspective on mammalian cell death. p93-128, Oxford University Press, C.S. Potten, 1987.
- Konishi I, Fujii S, Nonogaki H. Immunohistochemical analysis of estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67 antigen and human papilloma virus DNA in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix. *Cancer* 68:1340-1350, 1991.
- Konstantinos PL, Maria FL, Angelos S, Agathocles T, Vasiliki MM. Transcription factor-mediated proliferation and apoptosis in benign and malignant thyroid

- lesions. *Path Int* 55:694-702, 2005.
19. Laster SM, Wood JG, Gooding LR. Tumor necrosis factor can induce both apoptotic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 141:2629-2634, 1988.
 20. Mater A. Microcinematographic and electron microscopic analysis of target cell lysis induced by cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 36:179-190, 1979.
 21. Russell SW, Rosenau W, Lee JC. Cytolysis induced by human lymphotoxin. *Ann J Pathol* 69:103-118, 1972.
 22. Sanderson CJ. The mechanism of T cell mediated cytotoxicity II : Morphological studies of cell death by time lapse microcinematography. *Pro Roy Soc Lond B* 192: 241-251, 1976.
 23. Staunton MJ, Gaffney EF. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am J Clin Pathol* 103:300-307, 1995.
 24. Tubiana M, Schlumber M, Rougier P, Laplanche A, Benhamou E, Gardet P, Caillou B, Travagli J, Parmentier C. Long term results and prognostic factors in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Cancer* 55:794-804, 1985.
 25. Ucker PS. Death by suicides : One way to go in mammalian cellular development? *N Biologist* 3:103-109, 1991.
 26. Umansky SR. The genetic program cell death : Hypothesis and some applications : transformation, carcinogenesis, ageing. *J Theor Biol* 97:591-602, 1982.
 27. Wanebo HJ, Andrews W, Kaiser DL. Thyroid cancer : some basic consideration. *Am J Surg* 142:474-479, 1992.
 28. Wyllie AH. Glucocorticoid induced thymocytes apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature (Lond)* 284:555-556, 1980.
 29. Wyllie AH. Cell death : A new classification separating apoptosis from necrosis. In cell death in biology and pathology. p9-34, Bowen ID, Lockshin RA, editors. Chapman and Hall, London, 1981.
 30. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues an overview. *Cancer Metast* 11:95-103, 1992.
 31. Yoshida A, Nakamura Y, Imada T, Asaga T, Shmizu A, Harada M. Apoptosis and proliferative activity in thyroid tumors. *Surg today* 29(3):204-208, 1999.