

갑상샘 종양에서 hTERT 발현의 임상적 의의

가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 외과학교실

김태원 · 안창혁 · 김기환 · 박우찬 · 배자성 · 김정수

hTERT Expression in Thyroid Nodule

Tae-Won Kim, M.D., Chang-Hyeok An, M.D., Ph.D., Kee-Hwan Kim, M.D., Ph.D.,
Woo-Chan Park, M.D., Ph.D., Ja-Seong Bae, M.D., Jeong-Soo Kim, M.D., Ph.D.

Department of Surgery, Uijeongbu St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, School of Medicine, Uijeongbu, Korea

Purpose: Telomerase is expressed by most malignancies including thyroid cancer. In this study, to evaluate the telomerase activity, we determine the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in benign and malignant thyroid tumors.

Methods: We examined the clinical data such as age, sex, and recurrence status of 100 patients that underwent thyroidectomy. Also, we reviewed the pathological data of the tissues (tumor size, lymph nodes, capsular invasion, perivascular invasion, perilymphatic invasion etc.). We checked hTERT expression by Allred scoring system using immunohistochemical staining.

Results: 21 patients had benign thyroid nodules and 79 patients had malignant nodules. The average size of benign tumors and malignant tumors were 3.1 ± 1.1 cm and 2.1 ± 1.7 cm, respectively. The hTERT expression was higher in malignant tumors (82.3%) than in benign tumors (9.5%) and that difference was statistically significant. In metastatic lymph nodes status of thyroid cancers, 45 of 65 patients (69.2%) had lymphatic metastases in hTERT positive group, which is much higher than hTERT negative group ($P=0.001$).

Conclusion: In our study, hTERT expression may be used as a prognostic biologic marker in thyroid cancer and also in the diagnosis of malignancy. (J Korean Surg Soc 2010;78:277-282)

Key Words: Telomerase, Human telomerase reverse transcriptase (hTERT), Thyroid cancer

중심 단어: 텔로메라아제(끝분절효소), 텔로메라아제 역전사효소, 갑상샘 암

서 론

갑상샘 결절은 미국에서 매해 10만 명이 새롭게 진단되며, 국내에서도 진단 방법의 발달과 건강 검진의 확대로 증가 추세에 있다. 그렇지만 갑상샘 결절이 의심되어 수술을 시행하면, 42~77%는 양성의 낭종성 결절, 15~40%는 선종

으로 진단 받으며, 단지 8~17% 정도만이 악성으로 진단 받는다.(1,2) 그러므로 필요치 않은 수술을 피하기 위해 악성이 의심되는 갑상샘 결절에 대하여 수술 전 미세침습 검사를 시행하여 악성을 확인하여야 한다. 하지만, 세침흡인 세포검사는 갑상샘 암을 진단하는데 높은 민감도(~83%)와 특이도(~92%)를 보이지만, 20~30%에서 intermediate 또는 suspicious 등의 결과가 나타나게 되어 진단에 어려움이 많다.(3,4) 따라서, 세침흡인세포검사에 추가하여 다른 수술 전 진단 방법이 연구되었으며, 최근에는 telomere, telomerase 등에 대한 분자 생물학적 연구가 활발히 이루어지고 있다.(5,6) Telomere는 인간의 염색체 말단에서 존재하며, TTAGGG의 반복된 DNA 염기 서열로 체세포 분열 시 염색

책임저자: 김정수, 경기도 의정부시 금오동 65-1
☎ 480-130, 가톨릭대학교 의정부성모병원 외과
Tel: 031-820-3048, Fax: 031-847-2717
E-mail: drbreast@catholic.ac.kr

접수일 : 2009년 9월 15일, 게재승인일 : 2010년 1월 11일

체 말단에서 다양한 염색체 변형을 막아준다. 정상 체세포에서는 세포 분열 시 DNA의 3' 종단부에서의 불완전 복제로 인해 50~200 bp가 소실되는데, 반복된 세포 분열로 telomere가 짧아져 더 이상 분열이 불가능한 한계치에 도달하면 세포 내 신호에 의해 세포는 사멸된다.(7) Telomerase는 RNA 의존형 DNA 중합 효소로 세포 분열 시 역전사를 통하여 TTAGGG 염기 서열을 telomere에 붙임으로써 telomere의 소실을 방지하게 된다. Telomerase는 human telomerase reverse transcriptase (hTERT), telomerase RNA template (hTR)과 telomerase associated protein (TP1)의 세 부분으로 이루어진다. hTERT는 telomerase의 catalytic subunit이며, telomere와 상보적 역할을 하는 hTR을 이용하여, 단일의 RNA에 반복된 telomere를 붙여주게 된다.(8-10) Telomerase는 대부분의 정상 세포에서는 발현되지 않고, 줄기 세포나 생식 세포에서만 활성화되어 있다. 그러나, 특징적으로 암세포에서는 높은 활성을 나타내며 진행된 암일수록 그 활성도가 높다. 갑상샘 암에서도 29~100% 발견되며, 또한 여포선종, 허틀 세포 선종 등의 갑상샘 양성 종양에서도 40%까지 발견된다고 알려져 있다.(11-13) hTERT는 이와 비슷하게 갑상샘 암에서는 90%, 양성 종양에서는 35%까지 발견된다고 알려져 있다.(14,15) 최근에는 hTERT의 발현 정도를 통하여 악성과 양성 종양을 구분하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이에 본 연구의 목적은 갑상샘 종양에서 telomerase의 catalytic subunit인 hTERT의 발현 정도를 비교하여 telomerase의 활성도가 갑상샘 암의 진단에 효과적인 생물학적 지표로 이용될 수 있는가와 이러한 발현이 갑상샘의 진행과 연관이 있는지 알아보고자 하였다.

방 법

1) 대상

1993년부터 2009년까지 가톨릭대학교 의정부성모병원에서 갑상샘 종양으로 수술 받은 100명의 환자를 대상으로 하였다. 환자들을 대상으로 성별, 나이, 수술 방법 등의 일반적인 임상자료에 대하여 조사하였다. 수술 후 병리학적 소견은 종양의 크기, 수술 시 제거한 림프절 개수, 림프절 침윤, perivascular, perilymphatic, perineural 침윤 등을 조사하였으며, hTERT 면역 염색 후에 Allred scoring system을 이용하여 수치를 산출하였다. Proportion score는 0~5점, intensity score는 0~3점으로 총 8점으로 분류하였다. Proportion score는 immunostaining field에서 1/100 (1점), 1/10 (2점), 1/3 (3점), 1/2 (4점), 1/1 (5점)으로 평가하였으며, intensity score는 0=negative, 1=weak, 2=intermediate, 3=strong으로 평가하여 두 점수의 합을 산출하였다(Fig. 1).(16) 그 후 2점을 기준으로 negative, positive 두 그룹으로 구분하여 비교하였다. 수술은 갑상샘 절제술을 시행하였으며, 악성 갑상샘 종양에서는 갑상샘 절제술과 함께 경부 림프절廓청술을 시행하였다.

통계처리는 SPSS 12.0을 이용하여 Fisher's exact test를 시행하였고 유의 수준은 0.05 이하로 하였다.

2) 면역 염색

파라핀 포매 조직을 가지고 직경 3.5 um의 oligo chip을 만들어서 4 μm 두께로 박절한 다음 탈 파라핀과 함수과정을 xylene에 3분씩 3번 반복하여 파라핀을 제거한 후 100%, 90%, 70%, 50% ethanol로 함수과정을 거친 다음 10 mM cit-

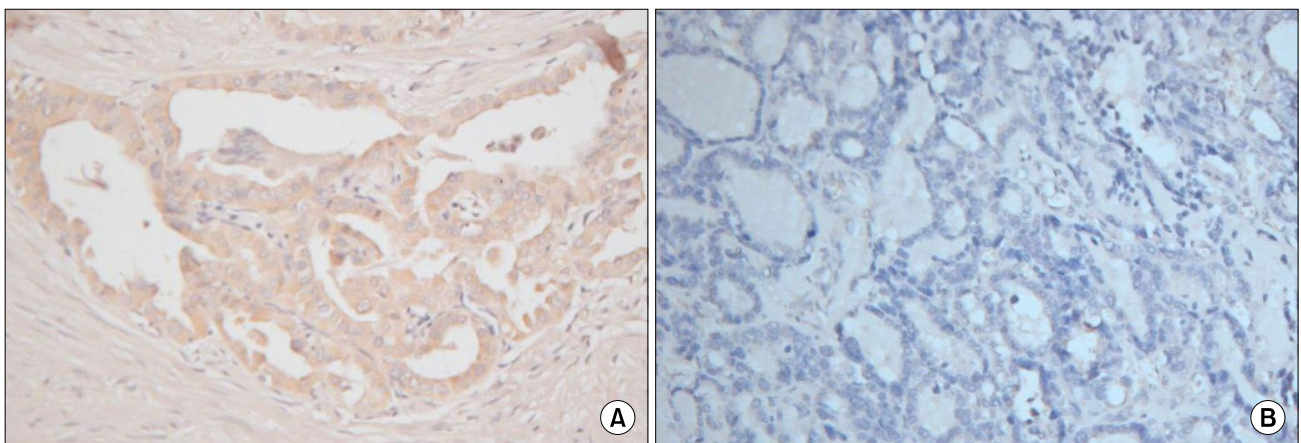


Fig. 1. Positive (A) and Negative (B) results of immunochemical stainings of hTERT in thyroid cancer tissues (×200).

rate buffer (pH 6.0)에 15분간 끓인 후에 3% 과산화수소수를 처리하여 내인성 peroxidase 활성을 저지시킨 후 TBST buffer로 씻어냈다. 비특이 단백질의 결합을 제거하기 위하여 blocking solution (Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)을 사용하여 실온에서 10분간 반응시키고 primary antibody는 hTERT (Epitomics, Inc., Burlingame, CA, USA) 1 : 100으로 희석하여 4°C에서 overnight으로 반응시킨 후 TBST buffer로 씻어내고 biotin이 부착된 이차항체(second antibody, Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)를 10분간 반응시킨 후 세척 완충액으로 3분씩 3회 수세하고 HRP-streptavidin (Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 실온에서 10분간 방치하여 biotin-avidin 특이 결합을 유도하고 다시 수세 후 DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride solution, Histo-Plus kit, Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 5분간 발색한 후 증류수로 세척한 다음 Mayer's hematoxylin (Zymed, San Francisco, CA, USA)으로 20초간 대조염색하고 알코올과 xylene으로 탈수시켜 Canada balsam으로 봉입하여 현미경으로 검경하였다. 음성대조 군으로는 일차항체를 사용하지 않고 같은 방법으로 실험하고 현미경으로 관찰하여 음성 기준으로 하였다.

갑상샘 암과 양성 결절에 대한 염색 방법은 모두 동일하였으며, Allred score 2점을 기준으로 TERT 양성군과 음성군으로 분류하였다. Allred score는 proportion score (0~5점), intensity score (0~3)의 합을 산출하였다. Allred score의 객관적 산출을 위하여 100배율과 40배율의 현미경으로 computer monitor를 통해 검경하였으며, 2번의 결과를 합쳐 평균값으로 정하였다.

결 과

환자 중 악성 종양이 79명, 양성 종양이 21명이었으며, 남

Table 1. Clinicopathologic features of patients

	Malignancy (n=79)	Benign (n=21)	P-value
Age	47.8±13.0	40.8±12.2	0.791
45 yrs below	34	11	0.58
45 yrs over	45	10	
Male	14	2	0.052
Female	65	19	
Size	2.1±1.7	3.1±1.1	0.114
Allred 2 below	14 (17.7%)	19 (90.5%)	0.001
Allred 2 above	65 (82.3%)	2 (9.5%)	

자가 16명, 여자가 84명이었다. 악성 종양은 유두 암이 77명, 수질 암이 1명, 미분화 암이 1명이었다. 45세를 초과하는 환자는 55명, 45세 이하의 45명이었다. 갑상샘 암에서 Allred score 2점을 초과하는 hTERT 양성군은 악성 종양에서 65명, 양성 종양에서는 2명이었다. 2점 이하의 hTERT 양성군은 악성 종양에서 14명이며, 양성 종양에서는 19명으로 악성 종양에서 크게 발현도가 높았으며 양군 간에 통계학적 유의성을 보였다(P=0.001)(Table 1).

갑상샘 암으로 수술 받은 79명의 환자 중 Allred score 2점을 초과하는 양성군의 평균 나이는 47.1±13.3세(26~78)였다. Allred score 2점 이하의 음성군에서는 51.2±11.3세(29~69)였다. 또한 양군 간에 성별, 종양의 위치, 병리학적 결과 등을 조사하였으나 통계학적 유의성은 보이지 않았다(Table 2~4).

갑상샘 암으로 수술 받은 79명의 환자에서, 림프절 광철술을 시행하여 얻은 림프절을 조사하였다. 전체 환자 중 hTERT 양성군에서는 8.5±9.8개의 림프절이 적출되었고 음성군에서는 5.0±3.7개의 림프절이 적출되었으며 양군 간에 통계적 차이는 없었다(P=0.709). Allred score 2점을 초과하는 65명의 양성군에서 림프절 전이를 보이는 경우는 45명(69.2%)이었으며, Allred score 2점 이하의 음성군 14명에서는 3명(21.4%)으로서 hTERT 양성군에서 림프절 전이가 많음을 알 수 있었으며 이는 통계학적 유의성을 보여주었다(P=0.001)(Table 3). 연령을 기준으로 45세 이상의 환자 45명에서 림프절 전이 상태와 hTERT 발현의 연관성을 보았으나 양성군(24/36; 66.7%)에서 음성군(3/12; 25%)보다 전이를

Table 2. hTERT expression according to clinical features

	Negative (n=14)	Positive (n=65)	P-value
Age	51.2±11.3 (29~69)	47.1±13.3 (26~78)	0.134
45 yrs below	5	29	0.434
45 yrs over	9	36	
Sex (M/F)	1/13	13/52	0.253
Site			0.174
Right	10	32	
Left	3	13	
Both	1	20	
Tg* 2 ml/dl over	1	9	0.594
Tg 2 ml/dl below	9	45	
Recurrence	0	5	0.284
No recurrence	14	60	

*Tg = thyroglobulin.

Table 3. hTERT expression according to pathologic features

	Negative (n=14)	Positive (n=65)	P-value
Size	1.8±1.8 (0.5~6.5)	2.2±1.7 (0.3~8.0)	0.347
1 cm over/below	9/5	40/25	0.077
Harvested LN*	5.0±3.7 (1~14)	8.5±9.8 (1~60)	0.709
LN meta	3/14 (21.4%)	45/65 (69.2%)	0.001
Capsule invasion	1/9 (11.1%)	17/40 (42.5%)	0.078
Multiplicity	1/9 (11.1%)	20/35 (57.1%)	0.014
Lymphatic invasion	3/14 (21.4%)	29/51 (56.9%)	0.019
Vascular invasion	0/13	12/56 (21.4%)	0.066
Perineural invasion	0/13	2/39 (5.1%)	0.405
Type of cancer			
Papillary ca.	14	63	
Medullary ca.	0	1	
Anaplastic ca.	0	1	

*LN = lymph node.

이 많았으나, 통계적인 유의성은 보이지 않았다(P=0.07).

환자들의 평균 추적 기간은 55.3±49.3개월이었으며, 재발을 보인 환자들은 5명이었으며, 갑상샘 암으로 인한 사망은 없었으며, 갑상샘 이외의 질병으로 인한 사망이 3명이었다.

환자들의 재발을 알아보기 위해 Thyroglobulin (Tg) level을 측정하였으며, 한 명의 수질암 환자는 calcitonin level은 3.0 pg/ml이었고, 2000년 이전에 수술하여 수술 후 Tg level이 없는 환자가 3명이었고, 수술 후 타 병원으로 전원되어 자료가 없는 환자는 11명이었다. 따라서 15명을 제외한 64명의 환자를 대상으로 Tg level 2 mg/dl 이상인 환자들과 Allred score 2 이상인 환자의 상관 관계를 비교하였으나 상관 관계는 없었다(P=0.594) (Table 2).

고 찰

갑상샘 암은 매해 증가 추세에 있으며, 내분비 악성 종양 중 가장 많은 빈도를 나타낸다.(17) 국내 통계청 2005년 자료를 보면, 12,649건으로 전체 암 발생률에서 갑상샘 암의 발생률은 8.9%를 차지하여 5번째로 많은 빈도를 나타냈다. 갑상샘 종양은 악성과 양성의 조직학적 형태가 유사한 경우가 많아 세침흡인세포검사를 수술 전에 시행해도 갑상샘 암이 비정형 세포와 구분이 어려우며, 특히 여포 암에서는 선종과 구분하기가 쉽지 않아 암의 진단에 어려운 점이 있다. 갑상샘 결절 중에서 악성이 의심되어 수술을 시행하여도, 수술 후 조직학적 검사에서는 80%까지도 양성 종양으로 판명된 경우가 보고되었다.(18) 그래서, 이러한 불필요한

Table 4. hTERT expression according to stage

	Negative (n=14)	Positive (n=65)	P-value
Stage I	9	37	0.383
Stage II	2	4	
Stage III	3	24	
T1	8	25	0.601
T2	4	30	
T3	1	4	
T4	1	6	
N0	11	22	0.002
N1	3	43	
M0	N/A*	N/A	

*N/A = non-applicable.

수술을 줄이기 위하여 정확한 수술 전 진단이 중요한데 특히 수술 전 세포검사서 갑상샘 여포 암이 의심되는 경우 갑상샘 암을 정확하게 진단하기 위한 여러 가지 생물학적 지표들이 연구되어 왔다. 이러한 지표로는 TSH receptor, thyroid peroxidase 같은 갑상샘 특이적 지표에 대한 연구(19)와 EGF, c-myc gene 같은 proto-oncogene에 대한 연구(20,21)가 이루어져 왔으며, 이러한 지표 중 telomerase에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 인체의 정상 체세포는 약 50회의 세포 분열을 지나는 동안 telomere가 계속 소멸되다 일정 길이에 도달하게 되어 세포 분열이 불가능하게 되면 결국에는 세포사멸에 이르게 된다.(7) 그러나, 여러 악성 종양 세포에서 발견되는 telomerase의 재활성화로 악성 세포는 지속적으로 분열하게 된다. 이러한 telomerase가 유방암, 신장암, 방광암 등 여러 악성 종양에서 미치는 기능과 예후에 대한 연구는 많이 알려져 있다. Lin 등(22)이 telomerase와 방광암의 병기와 상관 정도에 대하여 연구하였으며, Chadeneau 등(23)은 telomerase와 대장암의 예후에 관한 연관성에 대하여 연구하였다. 또한 신장암 및 난소암에서 telomerase의 활성이 암조직과 연관이 있음을 밝혀내었고,(23,24) Miracco 등(25)은 피부 흑색종의 악성도와 telomerase의 활성도가 직접적인 연관이 있다고 발표하였다. 이러한 연구는 갑상샘 암에 대해서도 이루어졌으며, telomerase의 활성도와 갑상샘 암에서의 예후가 연관이 있음이 밝혀졌고,(26) 본 연구에서도 활성도가 높은 양성군에서 음성군보다 더 많은 림프절 전이를 보였다. Telomerase는 여포 암에서 약 80%까지 발견되며, 유두 암에서는 50%까지 발견된다. 이는 일반적으로 유두 암이 여포 암에 비해 좋은 예후를 보이는 결과와도 일치한다.(11) 또한 미분화 암, 수질 암, 허탈세포암 등에서는 50%, 43%, 13% 등으로 다양하게 보고되었으며, telomerase

는 다른 고형암 보다는 낮지만 갑상샘 암에서 일반적으로 68%까지 발견된다고 알려져 있다.(27)

본 연구에서는 79명의 갑상샘 악성 종양 환자와 21명의 양성 종양 환자에 대하여 갑상샘 종양과 telomerase의 activity에 관하여 연구하였다. Telomerase의 catalytic subunit인 hTERT의 조직내의 염색 정도를 Allred scoring system을 이용하여 표기하였다. 지금까지의 다른 연구와 마찬가지로 본 연구에서도 hTERT의 염색 정도를 통한 telomerase의 발현 정도는 양성 종양보다 악성 종양에서 더 빈번하게 양성을 나타냈다. 갑상샘 암의 AGES, AMES score 등에서 남자나 고령에서는 좋지 않은 예후를 나타낸다고 알려져 있으나, 본 연구에서 hTERT의 발현은 환자의 연령과는 연관이 없었고, 성별에서는 남성에서 빈번하게 나타났으나, 통계적 유의성은 보이지 않았다(Table 2).

본 연구에서는 hTERT의 염색 정도는 종양의 크기와는 연관이 없는 것으로 나타났으며, Haugen 등(26)이 발표한 결과와는 다르게 피막의 침범이나, 혈관침범, 신경침범 등 과도 연관이 없는 것으로 나타났으나, 종양의 다발성, 림프관침범은 통계적 유의성을 보였다. 그러나, 본 연구에서는 증례수가 적어 결론을 내리기는 어렵다고 생각된다. 환자의 병기에 따른 분류에서는 stage I (9/46; 80.4%), stage II (2/6; 66.7%)보다는 stage III (24/27; 88.8%)에서는 다소 높은 양성률을 보여 진행성 암에서 양성률이 높았으나 통계적 유의성을 찾기는 어려웠다.

본 연구에서 림프절 침범과 telomerase 발현 정도는 Haugen 등(26)의 연구와 마찬가지로 통계적으로 유의하게 hTERT 양성 및 음성 두 군 간에 차이를 보였으며($P=0.001$), 환자의 병기에서는 T 병기와는 연관성이 없었지만, N 병기에서는 두 군 간에 차이를 보여, hTERT의 발현 정도와 림프절 전이에는 밀접한 연관이 있는 것으로 나타났다. 그렇지만, 병리 소견에서 보이는 총 림프절의 발견된 수와는 상관 관계가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로서 갑상샘 암의 예후를 결정하는 데에 중요한 림프절전이 정도와 hTERT의 발현 정도가 깊은 연관이 있다고 보여진다. 따라서, 수술 전 검사에서 hTERT의 발현이 높은 경우에는 갑상샘 주위 림프절 광청술을 더욱 철저히 하여야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 telomerase의 catalytic subunit인 hTERT에 대해서 연구하였으나, 다른 catalytic subunit인 hTR, TP1이 telomerase activity와 연관이 있는지에 대해서는 아직까지 연구가 필요한 상태이다. Topoisomerase II α , TGF β 1 등 telomerase 발현을 저해하는 약제가 갑상샘 암의 새로운 표

적치료제로서의 가능성이 있지만, 이에 대한 보다 많은 연구가 필요하다.(28,29)

결론

본 연구에서 hTERT의 발현 정도를 통하여 갑상샘 암과 양성 종양의 관계에 대하여 조사하였다. 앞으로 더 많은 연구가 필요하겠지만, telomerase의 활성도가 갑상샘 암의 발생 및 진행에 연관이 있다고 생각되며, 이를 표현하는 hTERT에 대한 검사는 갑상샘 양성 종양과 악성 종양의 감별에 도움이 될 뿐만 아니라 갑상샘 암의 예후를 결정하는데 중요한 림프절 전이 가능성을 예측할 수 있다고 보여진다. 그러므로 수술 전 검사를 시행할 때에 갑상샘 악성 종양에서 hTERT 발현이 높은 경우 림프절 절제술을 철저히 시행하여 전이 가능성이 있는 림프절을 절제함으로써 수술 후 림프절 재발을 감소시키는데 도움이 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Mazzaferri EL. Management of a solitary thyroid nodule. *N Engl J Med* 1993;328:553-9.
- 2) Ridgway EC. Clinical review 30: Clinician's evaluation of a solitary thyroid nodule. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74: 231-5.
- 3) Yoder BJ, Redman R, Massoll NA. Validation of a five-tier cytodiagnostic system for thyroid fine needle aspiration biopsies using cytohistologic correlation. *Thyroid* 2006;16:781-6.
- 4) Morgan JL, Serpell JW, Cheng MS. Fine-needle aspiration cytology of thyroid nodules: how useful is it? *ANZ J Surg* 2003;73:480-3.
- 5) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-5.
- 6) Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta J, Shay JW, Bacchetti S, Greider CW. Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res* 1996; 56:645-50.
- 7) Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992;225:951-60.
- 8) Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-91.
- 9) Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 2003;114:241-53.
- 10) Collins K, Mitchell JR. Telomerase in the human organism.

- Oncogene 2002;21:564-79.
- 11) Cheng AJ, Lin JD, Chang T, Wang TC. Telomerase activity in benign and malignant human thyroid tissues. *Br J Cancer* 1998;77:2177-80.
- 12) Umbricht CB, Saji M, Westra WH, Udelsman R, Zeiger MA, Sukumar S. Telomerase activity: a marker to distinguish follicular thyroid adenoma from carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:2144-7.
- 13) Saji M, Westra WH, Chen H, Umbricht CB, Tuttle RM, Box MF, et al. Telomerase activity in the differential diagnosis of papillary carcinoma of the thyroid. *Surgery* 1997;122:1137-40.
- 14) Saji M, Xydias S, Westra WH, Liang CK, Clark DP, Udelsman R, et al. Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in thyroid neoplasms. *Clin Cancer Res* 1999;5:1483-9.
- 15) Ito Y, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, et al. Telomerase activity in thyroid neoplasms evaluated by the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Anticancer Res* 2005;25:509-14.
- 16) Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 1998;11:155-68.
- 17) Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10-30.
- 18) Gharib H, Goellner JR. Fine-needle aspiration biopsy of the thyroid: an appraisal. *Ann Intern Med* 1993;118:282-9.
- 19) De Micco C, Ruf J, Chrestian MA, Gros N, Henry JF, Carayon P. Immunohistochemical study of thyroid peroxidase in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissues. *Cancer* 1991;67:3036-41.
- 20) Yamashita S, Ong J, Fagin JA, Melmed S. Expression of the myc cellular proto-oncogene in human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1170-3.
- 21) Mizukami Y, Nonomura A, Hashimoto T, Michigishi T, Noguchi M, Matsubara F, et al. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor and c-myc oncogene product in normal, benign and malignant thyroid tissues. *Histopathology* 1991;18:11-8.
- 22) Lin Y, Miyamoto H, Fujinami K, Uemura H, Hosaka M, Iwasaki Y, et al. Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin Cancer Res* 1996;2:929-32.
- 23) Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:2533-6.
- 24) Yoshida K, Sakamoto S, Sumi S, Higashi Y, Kitahara S. Telomerase activity in renal cell carcinoma. *Cancer* 1998;83:760-6.
- 25) Miracco C, Pacenti L, Santopietro R, Laurini L, Biagioli M, Luzi P. Evaluation of telomerase activity in cutaneous melanocytic proliferations. *Hum Pathol* 2000;31:1018-21.
- 26) Haugen BR, Nawaz S, Markham N, Hashizumi T, Shroyer AL, Werness B, et al. Telomerase activity in benign and malignant thyroid tumors. *Thyroid* 1997;7:337-42.
- 27) Orlando C, Gelmini S. Telomerase in endocrine and endocrine-dependent tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001;78:201-14.
- 28) Karayan-Tapon L, Menet E, Guilhot J, Levillain P, Larsen CJ, Kraimps JL. Topoisomerase II alpha and telomerase expression in papillary thyroid carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 2004;30:73-9.
- 29) Lindkvist A, Franzen A, Ren ZP, Heldin NE, Paulsson-Karlsson Y. Differential effects of TGF-beta1 on telomerase activity in thyroid carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338:1625-33.