

T1, T2, 액와림프절 음성인 유방암에서 S-phase fraction의 예후인자적 가치

김승일 · 박병우 · 김승기 · 이경식

연세대학교 의과대학 외과학교실, 포천중문의과대학교 외과학교실¹

Prognostic Value for the S-phase fraction in T1 T2, Node Negative Breast Cancer

Seung-Il Kim, Byeong-Woo Park, Seung Ki Kim¹
Kyong Sik Lee¹

Departments of Surgery, Yonsei University Seoul, Korea, Pochon CHA University¹ Pochon, Korea

Purpose: To evaluate the prognostic value of the S-phase fraction (SPF) and the correlation with other clinicopathologic factors in node negative breast cancer.

Methods: From 1995 to 1998, seventy one breast carcinoma tumors with T1-2N0M0 staging were prospectively sampled as fresh tumors for flow cytometric DNA analysis. We determined the nuclear DNA content, and the SPF was calculated from DNA histograms. We evaluated the relationship between the SPF and other clinicopathologic factors (age, tumor size, tumor grade and, steroid receptor status). The five year distant relapse free survival (DRFS) and overall survival (OS), according to the SPF, were determined.

Results: The SPF ranged from 0.1 to 50.9% (median: 13.4%). The SPF was dichotomized using the median value to divide patients into 38 patients (53.5%) having tumors with the low SPF and 33 patients (46.5%) having tumors with the high SPF. The

patient's age and the tumor size were not significantly associated with the SPF. High SPF was associated with high tumor grade, but this did not reach statistical significance. There was a significant correlation between high SPF and estrogen receptor negativity; 34.4% of ER positive tumor had high SPF, whereas 58.3% of ER negative tumor had high SPF ($p = 0.042$). The mean follow up duration was 65.0 months (median: 62.3). Among 71 patients, there were 4 (5.6%) cases of local recurrence, 7 (9.9%) cases of systemic recurrence and 10 (14.1%) cases of disease related death. The patients with high SPF showed a poorer 5 years DRFS and OS than did the patients with low SPF (87.9% vs. 91.2%; 80.4% vs. 94.5%, respectively), but the difference had no statistical significance.

Conclusion: The present data was insufficient to use SPF information for the selection of the type of adjuvant therapy, but SPF is a promising prognostic factor for node negative breast cancer. Further study with a sufficient number of patients is needed and this should lead to a better understanding of

책임저자 : 이경식

463-712 경기도 성남시 분당구 아탑동 36번지, 포천중문의과대학교 외과학교실

Tel: 031-780-5005, Fax: 031-780-4800 E-mail: kls@chamc.co.kr

접수일 : 2004년 11월 18일, 게재승인일 : 2005년 1월 13일

이 논문은 2004년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임.

SPF in node negative breast cancer.
(J Breast Cancer March 2005;8(1):27-33)

Key Words Breast cancer, Flow cytometry, S-phase fraction, prognosis

중심 단어 유방암 유세포 분석 S-phase fraction, 예후

서 론

유방암에 대한 사회적 관심증대 및 조기 검진 프로그램의 활성화로 전체 유방암 중 조기유방암이 차지하는 비율이 점차 증가하고 있다. 액와림프절 음성인 조기유방암은 비교적 양호한 치료 경과를 보이거나 조기유방암 환자의 약 10-20%는 재발하며, 궁극적으로 질병관변 사망에 이른다.(1-3) 이와 같이 동일 병기의 유방암도 서로 다른 치료 경과를 보이고, 기존의 TNM 병기 기준으로 질병의 상태를 모두 정의할 수 없다는 사실을 이해하기 시작하면서 유방암의 예후를 보다 정확히 예측할 수 있는 새로운 인자를 개발하고자 하는 노력이 계속되어 왔으며, 종양의 증식능력도 이 중 한 방법으로 제시되고 있다. 종양의 증식능력을 측정하는 방법은 분열지수 (mitotic index), thymidine labeling index (TLI), 유세포 분석을 이용한 S-phase fraction (SPF), BrdU index 등이 있으며, Ki-67이나 proliferating cell nuclear antigen (PCNA), mitosin 등 특정 항체에 대한 면역조직화학염색법을 통해서도 측정할 수 있다. 이 중 분열지수는 가장 고전적인 방법으로 유방암 조직의 분열능력을 평가하는 데 유용한 방법으로 알려져 있으며,(4) 그 밖에 TLI 측정도 유방암의 증식능력을 평가하는데 유용하다는 여러 보고가 있다.(5,6) SPF은 종양세포의 분열 및 성장과정에서 세포주기상 DNA 복제가 일어나는 세포의 비율을 측정하는 것으로, 이 시기의 세포는 G1 phase 이후 DNA 함량이 2n과 4n 사이인 세포이며, DNA에 결합하는 형광물질로 세포를 처리한 후 유세포 분석을 통해 측정할 수 있다.(7)

유방암에서 SPF의 예후인자적 가치에 대해서는 아직 논란이 있다. SPF이 높은 종양이 낮은 종양에 비해 불량한 무병생존율 및 전체생존율을 보인다는 보고가 있으나,(8-12) 반대로 예후인자로서 독립적 가치가 없다는 보고가 대립하고 있다.(13,14) 국내의 경우 Koo 등(15)이 유방암에서 SPF의 예후인자적 가치에 대한 연구 결과를 발표한 바 있으나, 액와림프절 음성인 조기 유방암 환자만을 대상으로 한 연구는 미미한 실정이다. 저자들은 T2 이하, 액와림프절 음성인 조기유방암 환자를 대상으로 하여 SPF 정도와 기존에 알려진 임상병리학적 인자들과 관련성을 조사하고, SPF에 따른 무병생존율 및 전체생존율의 차이를 분석하여 조기유방암에서 SPF의 예후인자적 가치를 평가하고자 본

연구를 진행하였다.

방 법

(1) 대상 환자

1995년부터 1998년까지 연세대학교 의과대학 세브란스 병원에서 유방암 진단 하에 근치적 수술을 시행 받은 환자를 대상으로 전향적 연구를 시행하였다. 대상기간 중 신선 동결조직이 보관된 총 366예의 종양을 대상으로 DNA 유세포분석을 시행하였다. 이 중 액와림프절 전이가 있거나, T3 이상, 수술 전 항암요법을 시행 받은 환자 및 유세포분석에서 nondiploid 종양을 가진 예는 분석에서 제외하였다. 최종적으로 diploid tumor이면서 원발종양의 크기가 T2 이하, 액와림프절 음성인 조기유방암 환자 71예가 분석에 포함되었다.

(2) 유세포 분석법을 이용한 S-phase fraction 측정

수술실에서 종양의 적출과 동시에 얻은 신선조직 (fresh tissue)의 무게를 측정한 후 최소 0.2 g 이상인거를 확인하였다. 단일세포부유액을 획득하기 위하여 외과적 수술 칼로 종양부위만을 얇게 썰어 세포를 분리하고 100 μm nylon mesh (Spectrum, Houston, Texas, USA)로 여과하여 얻어진 세포부유액을 원심분리하여 cell pellet을 얻은 후, PBS 1 ml에 부유시킨 후 혈구계 (hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 계산하였다. DNA 염색은 Vindelov 법(16)을 이용하였다. 검체는 ribonuclease (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)로 처리한 후, 차광 조건에서 propidium iodide (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA)에 10분 동안 반응시켰다. DNA 함량분석을 위해 PI로 염색된 세포 부유액을 이용하여 각 세포의 형광도와 세포 수를 측정하여 히스토그램을 작성하였고, 이를 이용하여 DNA ploidy와 SPF를 계산하였다. 유세포 분석기는 Coulter Epic XL (Coulter Co, Miami, Florida, USA)을 사용하였고, 분석 프로그램은 System II software (Coulter Co. Miami, Florida, USA)를 사용하였다. Control을 위해 각 분석 때마다 정상인 말초혈액의 mononuclear cell을 동일한 조건에서 분석하였다.

(3) 임상자료 및 병리조직검사 자료 수집

수술 시 환자의 연령, 원발 종양의 크기 등 임상 자료가 수집되었다. 파라핀 포매조직을 이용하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행한 후 Blom and Richardson scoring system에 따른 조직학적 등급을 측정하였다. 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 상태는 면역조직화학검사상 종양의 10% 이상 발현 시 양성으로 판정하였다.

Table 1. Clinicopathologic characteristics of the study population.

Characteristics	No. of cases	%
Age (n=71)		
Less than 35	11	15.5
Over 35	60	84.5
Tumor size (n=71)		
T1	25	35.2
T2	46	64.8
SBR grade* (n=50)		
I	10	20.0
II, III	40	80.0
ER(n=71)		
Negative	36	50.7
Positive	35	49.3
PR(n=71)		
Negative	32	45.1
Positive	39	54.9

ER = estrogen receptor ; PR = progesterone receptor.
 * SBR grade = histologic grading according to Scarff-Bloom-Richardson.

Table 2. Correlation between S-phase fraction and clinicopathologic characteristics.

Characteristics	SPF		p value
	Low (%)	High (%)	
Age (n=71)			
Less than 35	6 (54.5)	5 (45.5)	NS
Over 35	32 (53.3)	28 (46.7)	
Tumor size (n=71)			
T1	15 (60.0)	10 (40.0)	NS
T2	23 (50.0)	23 (50.0)	
SBR grade (n=50)			
I	6 (60.0)	4 (40.0)	NS
II, III	15 (37.5)	25 (62.5)	
ER(n=71)			
Negative	15 (41.7)	21 (58.3)	0.042
Positive	23 (65.7)	12 (34.3)	
PR(n=71)			
Negative	14 (43.7)	18 (56.3)	NS
Positive	24 (61.5)	15 (38.5)	

SPF= S-phase fraction ; NS = not significant ;
 ER = estrogen receptor ; PR = progesterone receptor.

Table 3. Comparison of mean S-phase fraction according to treatment outcomes.

	Mean S-phase fraction (SD)	p value
Local recurrence		
No	15.4 (13.19)	NS
Yes	19.1 (7.97)	
Systemic recurrence		
No	15.0 (12.16)	NS
Yes	20.8 (19.13)	
Death		
No	14.9 (12.49)	NS
Yes	17.1 (13.39)	

SD = standard deviation ; NS = not significant.

국소재발, 전신재발, 질병관련사망률 등 생존 분석에 필요한 환자의 추적자료는 Yonsei University Breast Cancer Registry Data Base를 이용하였으며, 환자의 외래 내원 기록, 정기 추적 검사 결과 및 보건복지부 암등록 사업 자료가 참고되었다.

(4) 자료 분석

SPF은 중간값 (median) 을 기준으로 높은 군 (high SPF)과 낮은 군 (low SPF)으로 양분하였다. SPF에 따른 수술 시 환자의 연령, 원발 종양의 크기, 조직학적 등급, 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체 상태 등 임상병리조직학적 인자들과의 연관성을 분석하였다. SPF에 따른 생존율의 영향을 알아보기 위해 국소재발, 전신재발, 질병관련 사망이 있는 군과 없는 군 사이의 평균 SPF를 비교하였고, 생존곡선을 이용하여 양군 간의 무병생존율 및 전체생존율을 분석하였다.

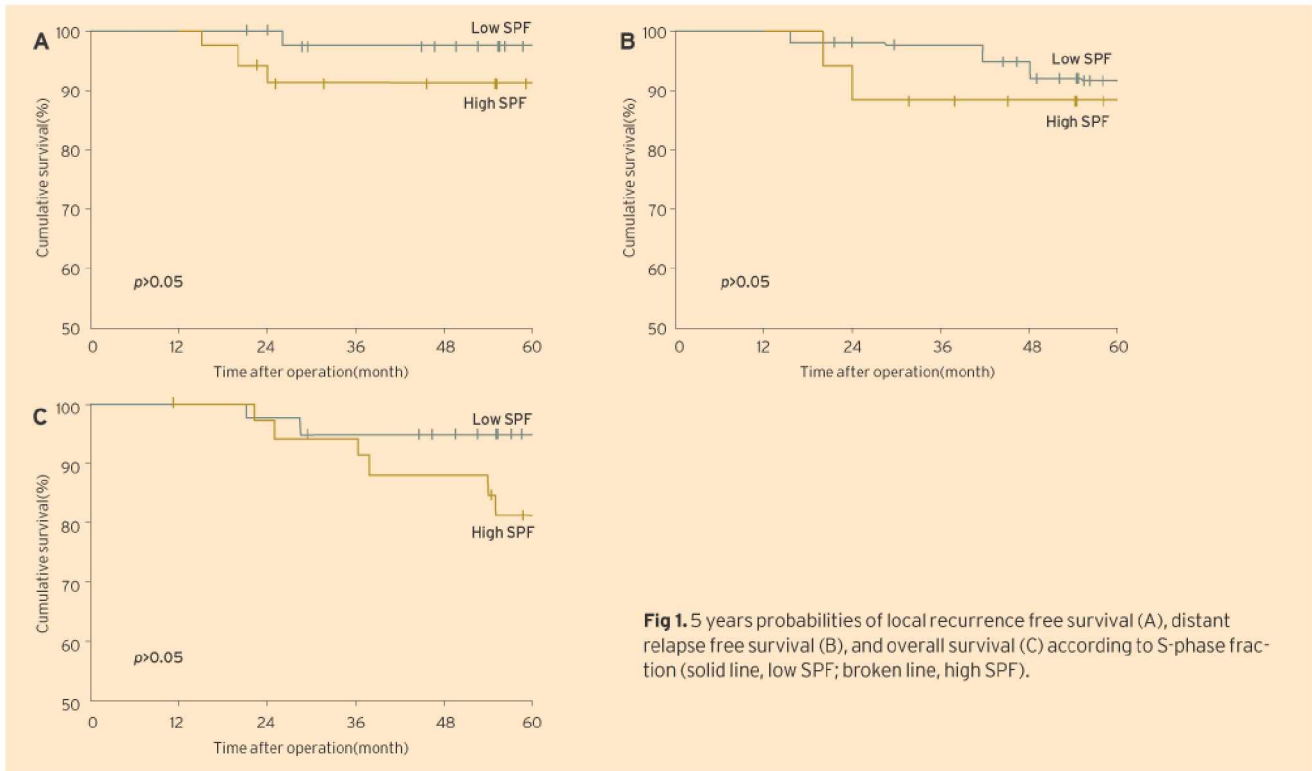
(5) 통계

SPF과 임상병리학적 인자와의 상관관계는 chi-square 방법을 이용하였고, SPF 평균발현에 따른 재발률은 independent t-test를 이용하였다. 생존 분석은 Kaplan Meier 분석법을 이용하였고, log-rank test를 이용하여 양군 간의 차이를 비교하였다.

결 과

(1) 대상환자의 임상병리학적 특징 (Table 1)

전체 71예 중 35세 이하가 11예 (15.5%), 35세 이상이 60예 (84.5%) 의 연령분포를 보였다. 원발종양의 크기는 T1 병변이 25예 (35.2%), T2 병변이 46예 (64.8%) 의 분포를 보였



다. 조직학적 등급은 총 50예에서 시행되었고 이 중 등급 I 이 10예 (20.0%), 등급 II 및 II가 40예 (80.0%) 였다. 에스트로젠 수용체 상태는 음성 36예 (50.7%), 양성 35예 (49.3예), 프로게스테론 수용체는 음성 32예 (45.1%), 양성 39예 (54.9%) 의 분포를 보였다.

② SPF 과 임상병리학적 인자들과의 상관관계 (Table 2)

SPF은 0.1-50.9% 의 범위로 측정되었고, 중간값 (median) 은 13.4% 였다. SPF은 중간값 (median) 을 기준으로 하여 양분하였고, 분율이 낮은 군 (low SPF) 이 38예 (53.5%), 높은 군 (high SPF) 이 33예 (46.5%) 의 분포를 보였다.

SPF과 환자의 연령 및 종양의 크기와는 상관관계가 관찰되지 않았다. 조직학적 등급의 경우 등급 I 에서 high SPF 군이 40.0% 였으나 등급 II 이상에서는 high SPF 군이 62.5% 로 조직학적 등급이 높을수록 SPF이 높은 경향을 보였으나 유의성은 없었다. SPF과 에스트로젠 수용체와의 연관성 분석 결과 high SPF 군에서는 수용체 음성이 58.3%, 수용체 양성이 34.3% 였으나, low SPF 군에서는 수용체 음성이 41.7%, 수용체 양성이 65.7% 로 SPF 비율과 에스트로젠 수용체 발현과는 역상관관계를 보였고 통계적 유의성이 있었다 ($p = 0.042$). 프로게스테론 수용체도 SPF 분율이 높을수록 수용체 음성이 높게 나타나는 경향을 보

였으나 통계적 유의성은 없었다.

③ 평균 SPF에 따른 재발률 및 생존 분석

대상 환자의 평균추적기간은 65.0개월이었다 (중간추적기간, 62.3개월; 범위, 11.5-115.2 개월). 전체 71예 중 국소 재발은 4예 (5.6%), 전신재발은 7예 (9.9%), 질병관련사망은 10예 (14.1%) 였다. 평균 SPF 비율에 따른 재발 및 사망률의 차이는 Table 3에 요약하였다. 국소재발의 경우 재발군의 평균 SPF이 19.1% 로 재발이 없는 군의 평균 15.4% 보다 높았으나 유의성은 없었다. 전신재발의 경우 재발군의 평균 SPF이 20.8% 로 재발이 없는 군의 15.0% 보다 높았으나 역시 유의성은 없었다. 사망률의 경우도 사망군에서 평균 SPF이 높았으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다.

Kaplan-Meier 생존분석법을 이용하여 SPF 발현에 따른 5년 무병생존율 및 전체생존율을 비교하였다 (Fig 1). 국소재발의 경우 5년 무병생존율이 low SPF 군에서 97.1%, high SPF 군에서 90.7% 이고 (Fig 1A), 전신재발의 경우 5년 무병생존율이 low SPF 군에서 91.2%, high SPF 군에서 87.9% 로 분석되어 (Fig 1B) SPF이 높을수록 낮은 무병 생존율을 보였으나 유의성은 없었다. 5년 전체생존율도 low SPF 군에서 94.5%, high SPF 군에서 80.4% 로 SPF이 높을수록 전체 생존율이 낮았으나 역시 유의성은 없었다 (Fig 1C).

고찰

액와림프절 음성 조기유방암은 비교적 양호한 예후를 보이지만 약 10~20%의 환자에서 재발한다.(1-3) 현재까지 유방암 환자의 재발가능성을 예측하고 치료방침 등을 결정하는 데 가장 중요한 판단 기준은 TNM 병기이다. 그러나 TNM 병기 기준상 조기유방암으로 정의된 환자에서도 치료에 대한 반응 및 성적이 상이하며, 이는 서로 다른 종양 생물학적 (tumor biology) 차이에 의한 것으로 생각되고 있다. 지금까지 많은 연구자에 의해 종양의 특성을 이해하기 위한 여러 생물학적 인자들이 제시되었고, 그 중 종양의 증식 능력도 한 지표로 연구되고 있다. 1987년 Dressler 등(17)은 신전 조직에서 flow cytometry 를 이용한 DNA 함량 분석 및 SPF 측정법을 발표하였고, 그 밖의 여러 연구에서 유세포 분석을 통한 SPF이 종양세포의 증식도를 예측할 수 있는 유용한 방법으로 보고되면서 유방암 조직에서 SPF를 이용한 연구가 활발히 진행되었다.(18)

많은 연구자들이 유방암 조직에서 SPF 정도와 기존에 알려진 임상병리학적 인자들과의 관련성을 규명하고자 하였다. 종양의 크기와의 연관성에 대해서 일부 연구결과들은 SPF와 원발 종양의 크기 사이에 상관관계가 있다고 보고하고 있지만,(19,20) 반대로 관련성이 없다는 주장도 보고되고 있다.(15,21) 조직학적 등급과 SPF의 상관관계에 대해서는 대부분의 연구자들이 SPF이 높은 종양 조직에서 조직학적 등급 II 혹은 III의 비율이 높다고 보고하고 있다.(19-23) 그러나 일부의 연구에서는 관련성이 없다는 주장도 있어 아직 논란이 되고 있다.(15,24) 한편 연령과 관련하여 SPF이 예후가 불량한 젊은 연령군에서 높게 나타난다는 보고가 있다.(2) SPF과 임상병리학적 인자들과의 연관성에 대한 본 연구의 분석 결과 연령이나 원발 종양의 크기와의 관련성이 없었고, 조직학적 등급의 경우 SPF이 높은 군에서 조직학적 등급이 높은 종양의 비율이 많게 나타났으나 유의성은 없었다.

SPF 정도와 종양의 호르몬 수용체와의 연관성에 대해 많은 연구에서 역상관 관계를 보고하고 있다.(19-21,25,26) 즉 SPF이 높은 종양에서 호르몬 수용체 음성이 많고, 반대로 SPF이 낮은 종양에서 호르몬 수용체 양성인 많은 경향을 보인다는 것이다. 그러나 SPF과 호르몬 수용체와의 관련성에 있어서도 유의한 상관관계가 없다는 일부 주장도 있다.(15,27) 본 연구에서는 에스트로겐 수용체 상태가 SPF과 역상관 관계를 보여 기존 연구의 주된 주장과 일치하는 결과를 보였다. SPF과 기타 임상병리학적 인자들과의 관련성에 대한 현재까지의 연구 결과를 보면 일부 이론이 제기되고 있으나, 일반적으로 높은 SPF은 기존에 알려진 조직학적 인자들 중 불량한 예후를 갖는 지표와 연

관되어 있는 것으로 보인다.

조기유방암에서 SPF이 무병생존율 및 전체생존율에 미치는 영향에 대해서도 보고자에 따라 아직 이론이 많다. 많은 연구에서 SPF은 종양 내에 증식하는 세포의 정도를 측정하는 지표로 액와림프절 음성인 환자에서 SPF 증가 시에 불량한 생존율을 보고하였지만,(8-12) 독립적 예후인자로서 가치가 없다는 주장이 대립하고 있으며,(13,14,27) 국내 연구결과도 SPF에 따른 생존율의 차이는 유의하지 않은 것으로 보고된 바 있다.(15) 본 분석에서는 SPF이 높은 경우 무병생존율 및 전신생존율 모두 불량한 5년 생존율을 보이지만 통계적 유의성은 없었다. 이러한 결과는 SPF이 조기유방암에서 실제로 예후인자적 가치가 미미하거나 독립적이지 않을 수도 있으나, 본 분석에 포함된 환자의 수가 71명으로 충분치 않기 때문일 수도 있다. 또한 본 분석의 추적기간이 수술 후 5년 내외로 비교적 짧은 것이 원인일 수도 있어 향후 10년 추적기간 후 재분석의 결과를 기다려 볼 수 있겠다.

액와림프절 음성인 조기 유방암 환자에서 항암치료를 포함한 전신치료가 치료 성적을 향상시킨다는 임상 연구 결과들이 발표되면서, 현재 대부분의 조기 유방암 환자가 전신항암치료의 대상이 되고 있다. 전신항암치료의 광범위한 적용으로 일부 조기 유방암 환자의 생존율이 증가하는 이점이 있으나, 반면 상당수의 환자가 불필요한 치료를 받게 되는 것이 중요 문제로 대두하고 있다. 현재까지 조기 유방암에서 TNM 병기 이외에 치료선택의 기준으로 인정되고 있는 것은 호르몬 수용체 상태, 조직학적 등급, 환자의 나이 등이다.(29,30) SPF을 이용한 지금까지의 연구결과 조기 유방암에서 SPF이 현재까지 인정된 치료 선택 기준에 추가되기는 아직 자료가 부족한 것으로 판단되며, SPF 단독으로 치료선택을 결정하는 것도 적절치 않은 것으로 판단된다. 더욱이 SPF의 경우 측정방법이나 보고 체계의 표준화가 전제되지 않은 상태이다. 다만 향후 추가적인 연구 결과에 따라 SPF이 조직학적 등급, 호르몬수용체 상태 및 환자의 나이 등 기준에 인정된 예후인자에 보조적 역할로 치료 선택에 도움이 될 가능성은 있다고 판단된다.

결론

종양의 SPF이 높을수록 높은 조직학적 등급을 보이는 경향이 있으나 유의성은 없었고, 호르몬 수용체 상태와는 유의하게 역상관 관계를 보였다. 이러한 결과는 SPF이 높은 경우 기존의 병리학적 인자들 중 불량한 지표와 연관성이 있음을 시사한다. 생존분석 결과 액와림프절 음성인 조기 유방암에서 SPF이 높은 경우 무병생존율 및 전체생존율이 모두 불량한 결과를 보였으나 통계적 유의성은 없었

다. 현재까지 연구 결과로 조기유방암 환자에서 SPF를 근거로 전신 항암요법 등 치료 방침을 정할 수는 없을 것으로 사료된다. 그러나 보다 많은 종양을 대상으로 10년 이상의 장기적인 추적 자료를 확보한 추가적인 연구를 통해 기존에 인정되고 있는 예후인자에 보조적인 역할의 가능성은 있는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1** Elledge RM, McGuire WL. Prognostic factors and therapeutic decisions in axillary node-negative breast cancer. *Annu Rev Med* 1993;44:201-20.
- 2** Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. A long-term follow-up study of survival in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1989;7:355-66.
- 3** Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7.
- 4** Page DL, Gray R, Allred DC, Dressler LG, Hatfield AK, Martino S, et al. Prediction of node negative breast cancer outcome by histologic grading and S-phase analysis by flow cytometry: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (2192). *Am J Clin Oncol* 2001;24:10-8.
- 5** Silvestini R, Daidone MG, Valagussa P, Fronzo G, Mezzanotte G, Bonadonna G. Cell kinetics as a prognostic indicator in node negative breast cancer. *Eur J Cancer* 1989;25:1165-71.
- 6** Tubiana M, Pejovic MH, Koscielny S, Chavaudra N, Malaise E. Growth rate, kinetics of tumor cell proliferation and long-term outcome in human breast cancer. *Int J Cancer* 1989;44:17-22.
- 7** Cooper GM, Hausman RE. The cell cycle. In: Sinauer AD, editor. *The cell: A molecular approach*. 3rd ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc; 2003. p.591-629.
- 8** Railo M, Lundin J, Haglund C, Smitten K, Boguslawsky K, Nordling S. Ki 67, p53, ER receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol* 1997;36:369-74.
- 9** Balslev I, Christensen IJ, Rasmussen BB, Larsen JK, Lykkesfeldt AE, Thorpe SM, et al. Flow cytometric DNA ploidy defines patients with poor prognosis in node negative breast cancer. *Int J Cancer* 1994;56:16-25.
- 10** Stal O, Dufmats M, Halschek T, Carstensen J, Klintonberg C, Rutqvist LE, et al. S-phase fraction is a prognostic factor in stage I breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1993;11:1717-22.
- 11** Bryant J, Fisher B, Gunduz N, Costantino JP, Emir B. S-phase fraction combined with patient and tumor characteristics for the prognosis of node-negative estrogen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:239-53.
- 12** Wingren S, Stal O, Sullivan S, Brisfors A, Nordenskjold B. S-phase fraction after gating on epithelial cells predicts recurrence in node-negative breast cancer. *Int J Cancer* 1994;59:7-10.
- 13** Peiro G, Lerma E, Climent MA, Segui MA, Alonso MC, Prat J. Prognostic value of S-phase fraction in lymph node negative breast cancer by image and flow cytometric analysis. *Mod Pathol* 1997;10:216-22.
- 14** Wyss-Desserich MT, Caduff-Joos R, Wyss P, Rageth C, Wight E, Unger C, et al. Premenopausal node-negative breast cancer: may adjuvant chemotherapy be indicated by the analysis of nuclear DNA dynamics? *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:253-63.
- 15** Koo JY, Lee HD, Jung WH. The significance of DNA flow cytometry in breast cancer. *J Korean Cancer Assoc* 1997;29:738-47.
- 16** Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI. A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* 1983;3:323-7.
- 17** Dressler LG, Seamer L, Owens MA, Clark GM, McGuire WL. Evaluation of a modeling system for S-phase estimation in breast cancer by flow cytometry. *Cancer Res* 1987;47:5294-302.
- 18** Wenger CR, Clark GM. S-phase fraction and breast cancer - a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat* 1998;51:255-65.
- 19** Prasad AR, Divine G, Zarbo RJ. Two-color, cytokeratin-labeled DNA flow cytometric analysis of 332 breast cancers. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:364-74.
- 20** Michels JJ, Duigou F, Marnay J. Flow cytometry in primary breast carcinomas. Prognostic impact of proliferative activity. *Breast Cancer Res Treat* 2000;62:117-26.
- 21** Chassevent A, Jourdan ML, Romain S, Descotes F, Colonna M, Martin PM, et al. S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1T2 breast cancers: A standardized flow cytometric study. *Clin Cancer Res* 2001;7:909-17.
- 22** O'Reilly SM, Camplejohn RS, Barnes DM, Millis RR, Allen D, Rubins RD, et al. DNA index, S-phase fraction, histological grade and prognosis in breast cancer. *Br J Cancer* 1990;61:671-4.
- 23** Chassevent A, Jourdan ML, Romain S, Descotes F, Colonna M, Martin PM, et al. S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1T2 breast cancers: a standardized flow cytometry study. *Clin Cancer Res* 2001;7:909-17.
- 24** Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P,

Fizi K, et al. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br J Cancer* 1997;75:1525-33.

25 Lipponen P, Eskelinen M, Papinaho S, Klemi PJ, Aaltomaas S, Kosma VM, et al. Sex steroid receptors, S-phase fraction and DNA ploidy as determinations of the risk of relapse and death of female breast cancer. *Anticancer Res* 1992;12: 677-82.

26 Wenger CR, Beardslee S, Owens MA, Pounds S, Oldaker T, Vendely P, et al. DNA ploidy, S-phase, and steroid receptors in more than 127,000 breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1993;28:9-20.

27 Rosanelli GPH, Steindorfer P, Wirnsberger GH, Klimpfinger M, Ratschek M, Puerstner P, et al. Mutant p53 expression and DNA analysis in human breast cancer:

comparison with conventional clinicopathological parameters. *Anticancer Res* 1995;15:581-6.

28 Reed DN, Johnson J, Richard P, McCormic S, Shannon N, Mikhail RA, et al. DNA flow cytometry does not predict 5-or 10-year recurrence rates for T1-2 node negative breast cancer. *Arch Surg* 2000;135:1422-6.

29 Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Senn HJ. Meeting highlight: International consensus panel on the treatment of primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:3817- 27.

30 National Institute of Health Consensus Development Panel. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:979-89.