

## ORIGINAL ARTICLE

침윤성 유방암에서 S-phase Fraction의 독립적인  
예후인자로서 의의 - 장기추적 연구배진혜 · 배정원 · 이상욱 · 김철환<sup>1</sup> · 이재복 · 손길수 · 구범환고려대학교 의과대학 외과학교실, <sup>1</sup>병리학교실S-phase Fraction as an Independent Prognostic Factor in Invasive Breast  
Carcinoma -A Study of Long-term Follow-upJin Hae Bae, Jeong Won Bae, Sang Uk Woo, Chul Whan Kim<sup>1</sup>, Jae Bok Lee, Gil Soo Son, Byum Whan KooDepartments of Sugery, and <sup>1</sup>Pathology, Korea University College of Medicine, Seoul, Korea**Purpose:** To evaluate the significance of the S-phase fraction (SPF) and DNA ploidy, determined by DNA flow cytometry, as prognostic markers in invasive breast cancer.**Methods:** Between October 1986 and June 1999, 143 breast carcinoma patients, treated by surgery, were analyzed. Flow cytometry was performed for the identification of the SPF and DNA ploidy, with immunohistochemistry performed on paraffin embedded material for the hormone receptor. Two SPF classes were defined on the basis of the median value (10) by using a log rank test (high SPF>10, low SPF<10). The correlation between SPF and the clinicopathological factors (tumor size, lymph node status, histological grade and steroid receptor status) and between the SPF and 5 yr disease-free survival (DFS) were investigated.**Results:** DNA ploidy was not associated with tumor size, lymph node status, histological grade, overall survival and

DFS. In a univariate analysis, high SPF values were associated with shorter 5 yr DFS in individual groups. In the node negative group, the 5 yr DFS of the low SPF group was higher than that of the high SPF group, but in the node positive group, the SPF values showed statistical significance with the 5 yr DFS. In a multivariate analysis, the SPF was independently associated with the 5 yr DFS in the node negative group.

**Conclusion:** These results suggested the SPF is an independent prognostic factor in lymph node negative, estrogen receptor positive and progesterone receptor negative breast cancers. (*J Breast Cancer 2007;10:36-42*)

Key Words : Invasive ductal carcinoma, Flowcytometry, S-phase fraction, Prognosis

중심단어 : 침윤성 유방암, 유세포 분석, S-phase fraction, 예후

## 서 론

유방암에 대한 관심의 증가와 활발한 조기 검진 사업의 결과로 작은 크기의 조기 유방암의 발견이 증가하고 있다. 작은 크기의 유방암은 액와 림프절로의 전이의 가능성이 상대적으로 적은 것

으로 알려져 있으며, 따라서 좋은 예후를 나타내는 병기를 보이고 있다. 조기검진과 수술 후 보조요법에 의해 유방암 환자의 생존은 증가하는 추세이나, 조기 발견에 의한 액와부 림프절 전이가 없는 낮은 병기의 환자에서도 10~20%에서 재발하며 사망할 수 있음을 보고하고 있다. (1, 2) 유방암 환자에서 재발에 대한 고위험군의 예후 예측 인자들로는 종양의 크기, 림프절 전이여부, 호르몬 수용체, 조직학적 분화도 등이 연구되어 현재 임상에서 활용하고 있으며, 그 외에도 세포 주기 조절인자(cell cycle regulator)나 세포 성장 인자와 같이 증식에 관여하는 인자들도 재발에 관여한 것으로 보고되고 있다. (3, 4) 여러 예후 예측 인자 중에서 종양 증식 지

책임저자 : 배정원

136-705 서울시 성북구 안암동 5가 126-1, 고려대학교 의과대학 외과  
Tel: 02-920-5305, Fax: 02-928-9231

E-mail : kujwbae@korea.ac.kr

접수일 : 2006년 11월 8일 게재승인일 : 2007년 2월 14일

\*본 논문은 2005년 한국유방암학회 추계학술대회 발표 논제입니다.

수(tumor proliferation index)는 외과적 치료를 받은 유방암환자 중에서 액외부 림프절 전이가 없었던 환자에게 고위험의 재발성 전이와의 연관성이 있으며, 또한, 고종양 증식 지수를 보이는 환자에서 항암제 반응에도 영향을 미친다고 보고되고 있다.(5) 종양세포의 증식력을 측정할 수 있는 방법으로는 DNA 배수성과 S-phase fraction (SPF)을 유세포분석으로 측정하는 방법, labeling index, 분열지수(mitotic index), 면역 조직화학 염색, 또는 thymidine kinase assay로 측정하는 방법 등이 있다.(6-8) 유세포분석에 의한 연구는 그 연구 방법과 결과 분석의 다양성으로 임상적 적용에 대한 한계로 지적되어 왔으나, Chassevent (9) 등에 의해 연구 방법과 분석의 표준화에 의한 SPF의 측정결과의 오차를 최소화하였다. 그러나, 유세포 분석(flow cytometric analysis)을 이용한 SPF를 측정하는 방법이 환자의 예후 예측요소의 임상적인 적용에 있어서는 아직 논란이 있다.

본 연구에서는 침윤성 유방암에서 DNA 배수성과 SPF를 유세포 분석한 결과를 기준에 알려진 임상병리학적 예후인자들과 연관관계를 조사하고, 무병생존율과 전체생존율의 차이를 분석하여 예후 인자로서의 의의를 알아보려고 하였다.

## 방 법

1986년 10월부터 1999년 6월까지 고려대학교 의과대학 안암병원 외과에서 유방암 진단을 받고 근치적수술을 받은 환자 중 DNA 배수성과 SPF를 검사한 143예를 대상으로 후향적으로 연구하였다. 유방암이 국소 재발한 경우와 수술 전 방사선치료를 받은 경우는 연구 대상에서 제외하였다. 평균 나이는 48세였고(range 25-80세), 추적 기간은 의무 기록을 조사하여 평균 75개월(range 4-161개월)이었다. 임상 병리학적 특성은 Table 1과 같다.

### 1. DNA 배수성과 S-phase fraction 측정

표준 유세포 분석 방법으로 DNA 배수성과 SPF를 검사하였다. 간단히 요약하면, 동결절편 조직에서 만들어진 파라핀 포매 조직의 일부를 50  $\mu$ m 두께의 2개 절편으로 만들어 xylene 용액에 넣어 탈 파라핀화 시킨 후 100%, 95%, 75% 및 50% 에탄올에 각각 순서대로 거친 후 증류수에 넣어 흡수 시켰다. 그 후 조직을 37°C에서 0.5% pepsin (pH 1.5)에 30분간 반응시킨 후 1,500 rpm으로 10분간 원심 분리하고 상층액을 버린 후 침전된 조직에 citrate buffer, trypsin, RNase 혼합액을 차례로 넣어 10분간 반응시킨 후에 30 micron 나일론 필터에 걸렸다. 여과액에 propidium iodide 용액을 첨가 후 유세포 측정기를 이용하여 DNA 배수성과 SPF를 측정하였다. 유세포 측정기는 FACScan (Becton-Dickinson, NJ, USA)을 사용하여 DNA 분석에는 20,000개 정도

의 세포를 이용하였다. Cell FIT program을 사용하여 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S기, G<sub>2</sub>M기의 양을 측정하였고, Histogram에서는 DNA index (DI)가 1.0으로 정상 유방 조직과 같은 배수성을 이배수성(Diploid), 그 이외의 DI는 비배수성(Aneuploid)으로 각각 정의하였다. SPF의 cut off value는 log rank test를 이용하여 계산한 중간값인 10을 기준으로 10보다 높은 군(high SPF)과 낮은 군(low SPF)으로 나누었다.(10)

### 2. 임상 자료 및 면역조직화학염색

면역조직 화학염색 방법은 파라핀에 포매된 종양 조직을 절편한 후 단클론 항체(mouse anti-human ER/PR monoclonal antibody, DiNonA Inc. Seoul, Korea)를 이용하여 준비 과정을 거쳐 염색하였다. 파라핀 포매조직을 절편 하여 xylene으로 탈 파라핀화 시킨 다음 100%, 90%, 80% 및 70% 에탄올에 흡수 시켰다. Ethanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액으로 처리한 다음 phosphate buffer saline으로 세척하였다. 내재성 비특이적 반응을 차단하기 위하

Table 1. Correlation between pathologic characteristics and S-phase fraction

Characteristic	No. of case	SPF		p
		Low	High	
TNM stage				0.063
I	17	11 (7.69%)	6 (4.19%)	
IIA	53	24 (16.78%)	29 (20.28)	
IIB	38	18 (12.58%)	20 (13.96%)	
IIIA	24	13 (9.09%)	11 (7.69%)	
IIIB	11	7 (4.89%)	4 (2.79%)	
Tumor size				0.693
1	26	14 (9.79%)	12 (8.39%)	
2	94	45 (31.46%)	49 (34.26%)	
3	23	14 (9.78%)	9 (6.28%)	
Lymph node				0.637
0	69	37 (25.87%)	32 (22.37%)	
1	46	21 (14.68%)	25 (17.48%)	
2	19	9 (6.29%)	10 (6.99%)	
3	9	6 (4.19%)	3 (2.09%)	
Grade				0.018
I	18	9 (6.29%)	9 (6.29%)	
II	65	35 (24.47%)	30 (20.97%)	
III	20	4 (2.79%)	16 (11.18%)	
Unknown	40	25 (17.48%)	15 (10.49%)	
ER				0.618
Negative	38	17 (11.89%)	21 (14.68%)	
Positive	62	34 (23.77%)	28 (19.58%)	
Unknown	43	22 (15.38%)	21 (14.68%)	
PR				0.659
Negative	46	21 (14.68%)	25 (17.48%)	
Positive	42	22 (15.38%)	20 (13.98%)	
Unknown	55	30 (20.97%)	25 (17.48%)	

SPF=S-phase fraction; ER=estrogen receptor; PR=progesterone receptor.

여 정상 혈청을 가한 후 실온에 20분간 방치하였다. 이차 항체로 biotinylated antirat antibody를 사용하였고 phosphate buffer saline으로 20분씩 3회 세척한 후 streptavidine biotinylated peroxidase complex를 반응시킨 후 diaminobenzidine 용액으로 발색시킨 후 hematoxyline으로 대조염색하였다. 판정은 세포핵이 염색된 정도를 분석하여 10% 이상 염색된 경우를 양성, 10% 이하로 염색된 경우를 음성으로 하였다.

### 1) 자료분석

환자의 연령, 원발 종양의 크기, 조직학적 분화도, 액와 림프절 전이 상태 등은 수술 시 의무기록과 조직학적 결과 자료를 이용하였다.

### 3. 통계

DNA 배수성 및 SPF 결과와 임상병리학적 특성 비교는 Chi-square test를 이용하였으며  $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의하다고 정의하였다. 실제 생존율은 Kaplan-Meier test를 사용하여 산출한 값을 log rank test와 비교하고 비교 위험도(relative risk)와 95% 신뢰 구간을 측정하였다. DNA 배수성과 SPF가 생존율에 미치는 영향과 다른 예후 인자와의 관계는 forward stepwise procedure로 SPSS 12.0.1 for Window에서 Cox proportional hazard regression을 사용하여 단일 및 다중분석 하였다.

## 결 과

### 1. DNA 배수성 및 SPF과 임상병리학적 인자들과의 상관관계

평균 추적 기간은 75개월(4-161개월)이었으며, 추적기간 중 국소재발은 11예(7.7%), 원격전이는 26예(18.2%)였다. 질병관련

사망은 20예(14%)였다. 5년 무병 생존율은 73%였고, 5년 전체 생존율은 85%였다. DNA 배수성은 암의 크기, 림프절 전이, 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체와는 통계적으로 유의한 상관관계가 없었으나 조직학적 분화도와는 연관이 있었다( $p=0.028$ ). SPF는 암의 크기, 림프절 전이, 에스트로겐 수용체 및 프로게스테론 수용체와는 연관이 없었으나, 조직학적 분화도가 좋을수록 SPF가 낮아 통계적인 의의가 있었다( $p=0.003$ ) (Table 1).

### 2. 생존 분석

#### 1) DNA 배수성과 임상병리학적 특성과의 생존율 분석

전체 환자군에서 log-rank test를 통해 비배수성일 때 5년 전체(overall) 생존율은 80%이고 이배수성의 5년 전체 생존율은 90%였으며, 5년 무병 생존율도 각각 75%와 71% 정도였으나 통계적인 유의성이 없어( $p=0.120$ ,  $p=0.526$ ) DNA 배수성은 전체 생존율과 무병 생존율에 영향을 미치지 않았다.

종양크기에서는 T1에서 이배수성과 비배수성의 5년 생존율은 92%로 동일하였고, T2에서도 동일하게 75%였으며 통계적인 유의성이 없었으며( $p=0.543$ ), T3에서도 통계적으로 유의성이 없었다( $p=0.651$ ). 림프절 음성인 군에서 이배수성과 비배수성간의 5년 생존율은 각각 88%와 85%로 차이가 없었고( $p=0.697$ ), 림프절 양성인 군에서도 이배수성의 5년 생존율은 60%, 비배수성은 62%로 생존율의 차이가 없었다( $p=0.687$ ).

#### 2) SPF와 임상병리학적 특성과의 생존율 분석

저 SPF (LSP)군은 73예, 고 SPF (HSP)군은 70예이었다. 5년 전체 생존율은 두 군에서 각각 89.7%와 80%로 약간 차이가 있었으나 유의하지 않았고(Fig 1A) 5년 무병 생존율은 LSP에서 80%와 HSP에서 66%로 전체 환자에서 SPF가 높을수록 5년 무병 생

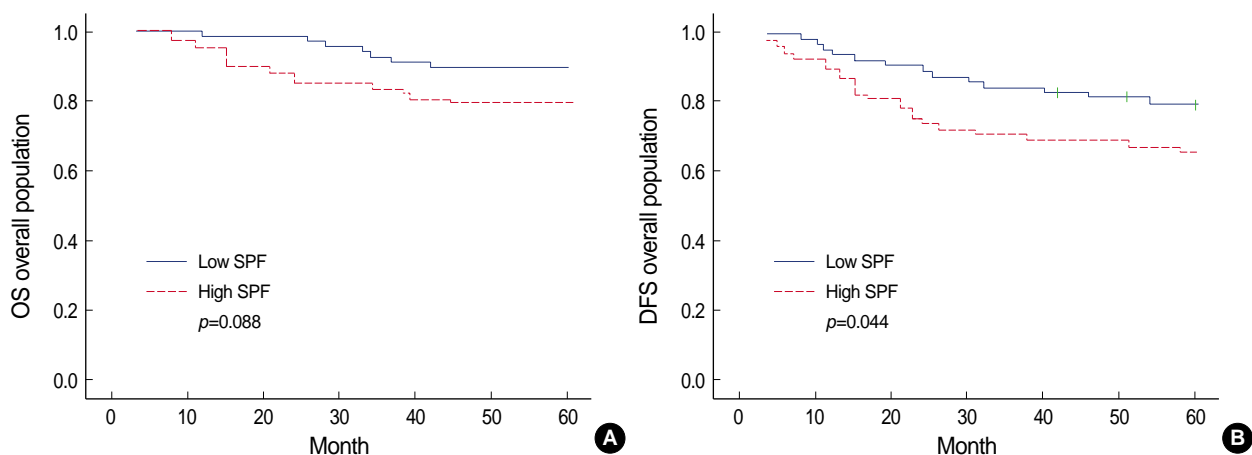


Fig 1. Univariate survival analysis according to s-phase fraction tertiles: overall survival (A) and disease free survival (B) in the overall patients.

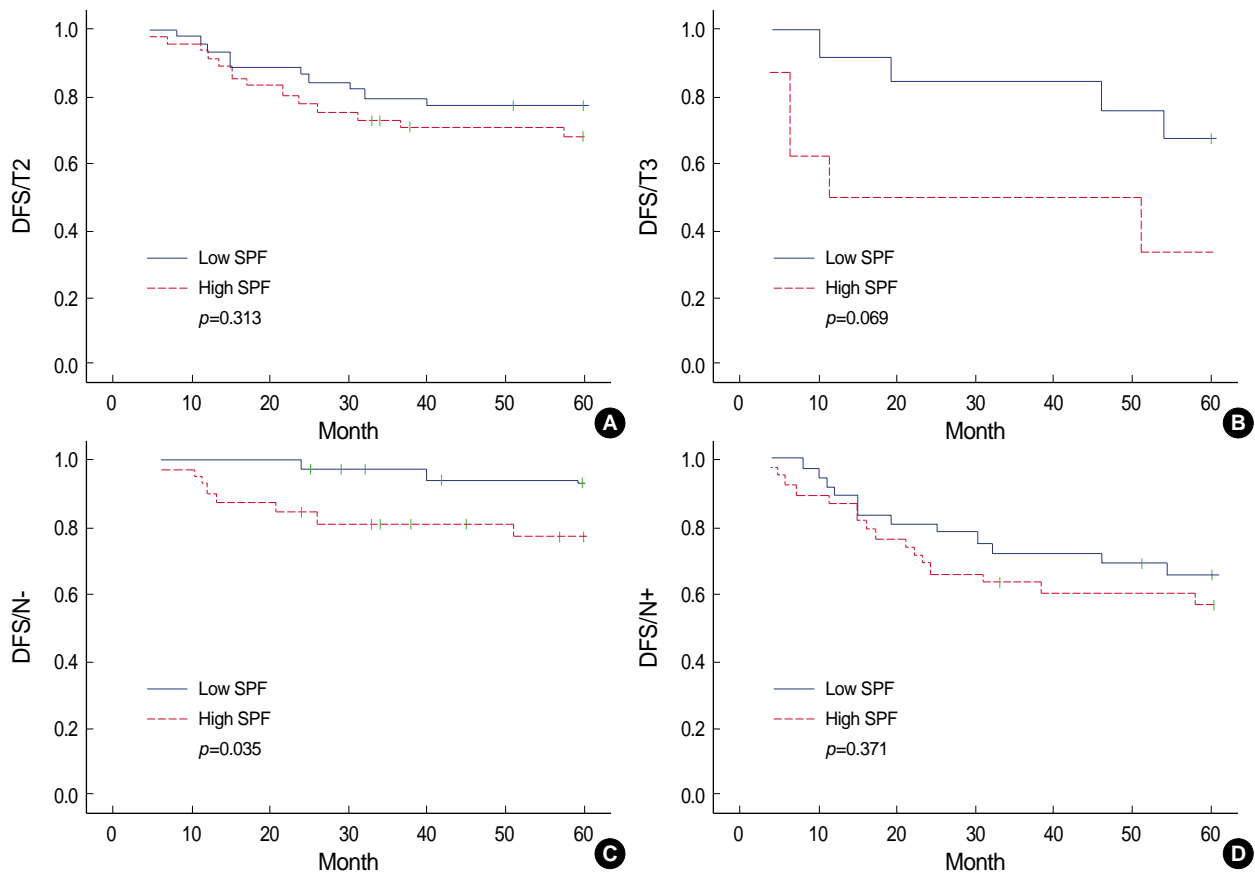


Fig 2. Disease free survival according to s-phase fraction tertiles in subgroups. (A) T2 patient, (B) T3 patient, (C) node-negative patients, (D) node-positive patients.

존율이 통계적으로 유의하게 낮았다( $p=0.044$ ) (Fig 1B). 종양의 크기에서 T1은 LSP 및 HSP에서 추적 관찰 기간동안 국소 전이나 원격 전이된 예가 없어서 비교할 수 없었고, T2에서 LSP와 HSP의 5년 무병 생존율은 각각 77%와 67%로 SPF가 낮을수록 생존율은 증가하였으나 통계적인 유의성이 없었다( $p=0.313$ ) (Fig 2A). T3군에서는 LSP의 5년 무병 생존율이 67.7%, HSP은 33%로 차이가 있었으나 통계적인 유의성은 없었다( $p=0.068$ ) (Fig 2B). 액와부 림프절 전이 음성군에서 5년 무병 생존율은 LSP에서 94.3%, HSP에서 77%로 SPF가 낮을수록 유의성 있게 무병 생존율이 높았으나( $p=0.035$ ) (Fig 2C), 액와부 림프절 전이 양성군에서는 LSP과 HSP간에 5년 무병 생존율 차이가 없었다(Fig 2D). 조직학적 등급으로 분석하면 분화군에서는 5년 무병 생존율이 LSP는 100%, HSP는 56%로 큰 차이를 보여 통계적으로 유의하였으나( $p=0.027$ ) 미분화군에서는 5년 무병 생존율에 유의성이 없었다( $p=0.329$ ). 에스트로겐 수용체 양성군에서는 5년 무병 생존율이 LSP와 HSP가 84.5%와 57%로 SPF 값이 낮은군에서 더 높은 생존율을 보였으며( $p=0.012$ ) (Fig 3A), 에스트로겐 음성군에서는 무병 생존율에 차이가 없었다(Fig 3B). 프로게스테론 수용체 음성군에서는 5

년 무병 생존율이 LSP는 80%, HSP는 45%로 통계적으로 유의하였으나( $p=0.010$ ) (Fig 3C), 양성군에서는 SPF에 따라 통계적 차이가 없었다(Fig 3D).

### 3) Multivariate Cox analysis

전체 환자에서 5년 무병 혹은 전체 생존율에 영향을 미치는 독립적인 예후 인자는 림프절 전이 갯수와 프로게스테론 수용체 유무였다(Table 2). 림프절 전이 음성군에서는 SPF가 5년 생존율에 영향을 미치는 유일한 인자였으나 림프절 전이 양성군에서는 유의한 예후 인자가 존재하지 않았다.

## 고 찰

유방암 환자의 치료 계획에 있어 환자의 병기와 함께 예후 인자는 수술 후의 보조적 항암요법, 항호르몬 치료 및 추적관찰에 있어 중요한 요소로 인정되고 있다. 이에 영향을 주는 예후 인자로는 호르몬 수용체의 유무, 조직학적 등급 및 종양 표지자와 종양 관련 유전자 등이 있으며, 임상적으로 치료계획에 적용되고 있다.

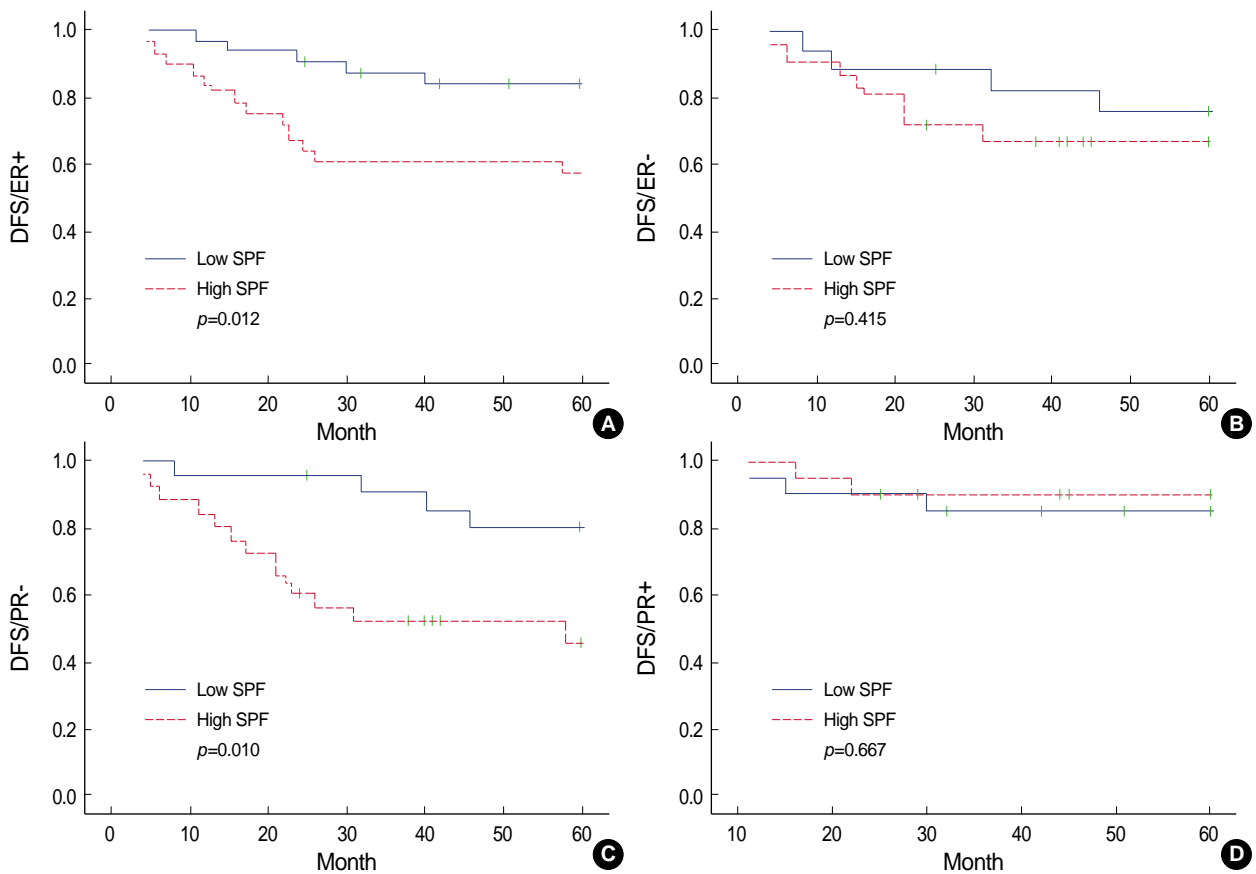


Fig 3. Disease free survival according to s-phase fraction tertiles in subgroups. (A) estrogen receptor positive patient, (B) estrogen receptor negative patient, (C) progesterone receptor negative patients, (D) progesterone receptor positive patients.

Table 2. Multivariate analysis for overall population and TNM classification for disease free survival

Variables	Overall I (n=143)		Node (-) (n=69)		Node (+) (n=74)	
	RR (CI)	p-value	RR	p-value	RR	p-value
Node involvement		0.001				
No	1					
N+	3.518 (1.658-7.464)					
PR		0.009		NS		NS
Negative	3.751 (1.383-10.174)					
Positive	1					
SPF		0.052		0.045		NS
Low			1			
High			5.030 (24.409-1.036)			

RR=Relative Risk; PR=progesterone receptor; SPF=S-phase fraction; NS=no significant.

그러나 같은 병기라 할지라도 치료 후에 다양한 경과를 보이고 있어 이는 종양의 생물학적 특성이 다양하리라 여겨지고 있다. 조기

유방암 치료 후에도 약 10~20%에서 재발과 전이를 보이므로 기존의 예후 인자만으로 치료제를 선택하거나 예후를 예측하기에는 부족한 부분이 있다고 생각되기에 이를 보완하고자 여러 생물학적 인자들을 연구하였으며, 이 중 세포증식 인자들을 유방암 예후 인자로 연구되어 왔으나 임상 활용도에서 아직까지 논란이 되고 있다.(2-4) 김 등(10)에 따르면 SPF가 기존의 병리학적 인자들 중 불량한 지표와 연관성이 있고 생존 분석 결과 액와 림프절 전이 음성인 조기 유방암에서 SPF이 높은 경우 무병 생존율 및 전체 생존율이 모두 불량한 결과를 보이거나 통계적 유의성이 없어서 SPF를 예후 인자로 적용하기는 어렵다고 하였다. 그러나, 이러한 논란은 연구방법의 다양성과 분석의 차이에서 기인되는 것으로 생각되며, 유세포 분석법에 있어서도 서로 다른 기관에서의 연구에 있어 재현성의 문제가 제기되어 왔다.(11, 12) Viel 등(13)은 S-phase fraction의 기준점(cutoff value)이 연구자마다 다르기 때문이라고 하였는데 1992년, American Consensus Conference의 기준에 따라 low, medium과 high로 구분하여 유의성을 찾을 수 있다고 보고하였다.(14-16) 이러한 문제의 해결을 위해 실험 방법과 분석법의 표준화를 시도하였으며, 이를 통해 SPF와 재발

및 유병생존율과의 상관관계를 보고하여 SPF의 예후 인자로의 연구가 가능하게 되었다. (13, 17) 이에 본 연구에서는 연속적인 변수를 이분하는 것은 정량적인 정보를 놓칠 수도 있고 실제 연관 관계를 교란시킬 수도 있을 것이라고 생각되어 최적의 기준점을 사용하기 보다 Log rank test의 중앙값을 사용하였다.

세포 증식은 DNA 복제가 일어나는 S (synthesis) phase와 세포 분열이 진행되는 M (mitosis) phase가 반복되면서 일어나는 것으로 그 사이에는 G1 (gap 1)과 G2 phase가 있어 G1→S→G2→M의 주기를 차례로 돌며 증식하는데 M phase에서는 특징적인 염색체의 배열로 인해 면역 형광 염색으로 모양을 쉽게 관찰할 수 있으며 분열지수(mitotic index)를 구할 수 있다. 그러나 비배수성 세포에서는 M phase가 길지 않기 때문에 mitosis가 증식을 뜻하지 않게 되자 다른 연구 방법들로 대체되기 시작했고 유세포 분석을 통한 S-phase fraction으로 암세포의 증식 능력을 연구하게 되었다. (10) 1987년부터 유방암 환자들을 대상으로 하여 유세포 분석을 통해 SPF이 높은 그룹과 재발의 연관성이 있음을 발표한 이후 SPF와 DNA 배수성이 초기 유방암에서 예후 인자로 이용될 수 있다고 하였다. (17, 18) Zabotto 등(6)은 DNA 배수성에 따라서 무병 생존율의 차이가 있으며, 림프절 전이 양성군에서 배수성이나 SPF는 연관이 없으나, 림프절 전이 음성군에서 이배수성 군이 비배수성 군보다 무병 생존율이 높고 low SPF의 생존율이 high SPF의 생존율 보다 높아 림프절 전이 음성의 초기 유방암에서 SPF와 DNA 배수성이 예후를 예측하는 인자로 의미가 있다고 하였다. (18) 본 연구에서도 림프절 전이 음성군에서는 SPF가 낮은 군에서 5년 생존율이 높아 상기의 보고와 일치하는 결과를 보였으나, 림프절 전이 양성군에서는 LSP와 HSP 양 그룹간의 5년 무병 생존율에 통계적으로 유의한 차이가 없었다. Van Diest 등은 SPF와 DNA ploidy의 다른 예후 인자들과의 연관성에 대해서도 종양이 큰 경우, 림프절 전이 양성군, 불량한 조직학적 분화도와 호르몬 수용체 음성군에서 HSP와 aneuploid의 연관성을 보였다고 하였고, (19) Vielh 등은 HSP일 때 액와 림프절 전이와 상관관계를 찾을 수는 없었으나 에스트로젠 수용체의 발현에는 역비례하다고 하였다. (20) 본 연구에서도 SPF이 발현이 낮은군에서 조직학적 분화도가 좋았으며 에스트로젠 수용체 양성군에서 LSP군의 생존율이 높아 LSP는 기존에 알려진 예후 인자들 중 좋은 예후를 갖는 지표로 보였다. 다만 프로게스테론 수용체에 대해서는 양성인군과 SPF에서 연관성은 없었으나 음성인군에서는 SPF가 낮은군에서 5년 무병 생존율이 높게 나와 기존 연구의 다소 다른 결과를 보였다. 다변량 Cox 분석에서도 림프절 전이 음성군에서 SPF가 생존율에 영향을 미치는 유일한 인자였다.

## 결론

DNA ploidy와 SPF는 조직학적 분화도와 유의한 상관관계를 보였으며, DNA ploidy와 전체 생존율과 무병생존율의 상관관계는 찾을 수 없었다. 그러나, 액와 림프절 전이가 없는 경우는 무병 생존율과 SPF는 LSP군에서 양호한 무병 생존율을 보였으며, 에스트로젠 수용체 양성인 경우 역시 LSP군에서 유의하게 높은 무병 생존율을 보였다. SFP는 전체 환자군에서 LSP군이 HSP군보다 5년 무병 생존율이 높게 나왔다. 따라서 액와부 림프절 전이가 없거나 에스트로젠 수용체가 양성인 군에서 예후가 좋은 것으로 알려져 왔던 유방암 환자에서 SPF 역시 향후 재발을 예측할 수 있는 유용한 요소 중 하나로 제시한다.

## 참고문헌

1. Mamounas EP. Can we approach zero relapse in breast cancer? *Oncologist* 2005;10:9-17.
2. Michels JJ, Marnay J, Delozier T, Denoux Y, Chasle J. Proliferative activity in primary breast carcinomas is a salient prognostic factor. *Cancer* 2004;100:455-64.
3. van Diest PJ, Michalides RJ, Jannink L, van der Valk P, Peterse HL, de Jong JS, et al. Cyclin D1 expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am J Pathol* 1997;150:705-11.
4. Pinto A, André S, Laranjeira C, Soares J. Correlations of cell cycle regulators (p53, p21, pRb and mdm2) and c-erbB-2 with biological markers of proliferation and overall survival in breast cancer. *Pathology* 2005;37:45-50.
5. Louwman WJ, van Beek MW, Schapers RF, Tutein Nolthenius-Puylaert MB, van Diest PJ, Roumen RM, et al. Long-term survival of T1 and T2 lymph node-negative breast cancer patients according to mitotic activity index: a population-based study. *Int J Cancer* 2006; 118:2310-4.
6. Moureau-Zabotta L, Bouchet C, Cesari D, Uzan S, Lefrance JP, Antoine M, et al. Combined flow cytometry determination of S-phase fraction and DNA ploidy is an independent prognostic factor in node negative invasive breast cancer: analysis of a series of 271 patients with stage 1 and 2 breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91: 61-71.
7. Chassevent A, Jourdan ML, Roman S, Descotes F, Colonna M, Martin PM, et al. S-phase fraction and DNA ploidy in 633 T1, T2 breast cancers: a standardized flow cytometric study. *Clin Cancer Res* 2001;7: 909-17.

8. Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart PJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005;16:1723-39.
9. Chassevent A, Jourdan ML, Ferrero-Pous M, Colonna M, Romain S, Spyratos F, et al. Standardization and quality control in the evaluation of proliferation parameters in T1, T2, N0N1, M0 breast cancer: multicentric retrospective study. II. DNA-ploidy and S-phase fraction. *Bull Cancer* 1999;86:685-91.
10. Kim SI, Park BW, Kim SK, Lee KS. Prognostic value for the S-phase fraction in T1, T2, node negative breast cancer. *J Breast Cancer* 2005; 8:27-33.
11. D'hautcourt J L, Spyratos F, Chassevent, A. Quality control study by the French Cytometry Association on flow cytometric DNA content and S-phase fraction (S%). *Cytometry* 1996;26:32-9.
12. Baldetorp B, Bendahl PO, Ferno M, Alanen K, Delle U, Falkmer U, et al. Reproducibility in DNA flow cytometric analysis of breast cancer: comparison of 12 laboratories' results for 67 sample homogenates. *Cytometry* 1995;22:115-27.
13. Vielh P, Carton M, Padoy E, deRycke Y, Klijanienko J, El-Naggar AK, et al. S-phase fraction as an independent prognostic factor of long-term overall survival in patients with early-stage or locally advanced invasive breast carcinoma. *Cancer* 2005;105:476-82.
14. Michels JJ, Marnay J, Plancoulaine B, Chasle J. Flow cytometry in primary breast carcinomas: prognostic impact of S-phase fraction according to different analysis patterns. *Cytometry B Clin Cytom* 2004; 59:32-9.
15. Adeyinka A, Baldetorp B, Mertens F, Olsson H, Johannsson O, Heim S, et al. Comparative cytogenetic and DNA flow cytometric analysis of 242 primary breast carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;147: 62-7.
16. Jourdan ML, Ferrero-Pous M, Spyratos F, Romain S, Martin PM, Chassevent A. Flow cytometric S-phase fraction measurement in breast carcinoma: influence of software and histogram resolution. *Cytometry* 2002;48:66-70.
17. 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.
18. 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* 1987;47:5294-302.
19. van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 2004;57: 675-81.
20. Vielh P, Chevillard S, Mosseri V, Donatini B, Magdelenat H. Ki67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. Comparison and correlations with prognostic factors. *Am J Clin Pathol* 1990;94: 681-6.