

유방암 조직에서 Cyclin D₁과 p16단백발현의 임상적 의의

영남대학교 의과대학 외과학교실, 병리학교실¹

이수정 · 권평보 · 김동석¹

= Abstract =

The Clinical Significance of Cyclin D₁ and p16 Protein Expression in Primary Breast Carcinoma.

Soo Jung Lee, M.D., Koing Bo Kwun, M.D. and Dong Suk Kim, M.D.¹

*Department of General Surgery and Pathology¹
Yeungnam University College of Medicine, Daegu Korea*

Background: There is experimental evidence that overexpression of cyclin D₁ accelerates the entry of cells into S-phase, but that p16 inhibits the CDK4 and CDK6 by binding in competition with cyclin D₁. Previous attempts to correlate cyclin D₁ amplification with prognoses have frequently drawn associations with adverse outcome or a more aggressive phenotype. Recently, overexpression of cyclin D₁ has been associated with improved relapse-free survival and overall survival rates. To elucidate whether the expression of cyclin D₁ and p16 protein might be of clinical value as prognostic factors, the immunoreactivity of cyclin D₁ and p16 protein were compared by the chi-square test with histopathologic findings and such known prognostic factors as estrogen receptor, progesterone receptor, c-erbB-2, p53 and Ki-67. **Methods:** The expression of cyclin D₁ and p16 protein was analysed using immunohistochemical methods in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples of 340 invasive breast carcinomas accumulated between 1990 to 1997 at Yeungnam University Hospital. Disease-free survival and overall survival were compared to cyclin D₁ and p16 status by Kaplan-Meier method. **Results:** The nuclear immunoreactivity of cyclin D₁ and p16 protein was detected in 75.6% (257/340) and 70.5% (208/295) cases, respectively. Cyclin D₁ was found to have a strong correlation with lower histologic grade, lower nuclear grade, lower mitotic index, lower SBR and MSBR grade ($p < 0.05$). Cyclin D₁ was more common in non-ductal carcinomas than ductal carcinomas, though this did not reach statistical significance. Cyclin D₁ was also correlated with positive estrogen receptor, negative c-erbB-2 and positive p16 protein. P16 protein expression was found to have a correlation with positive estrogen receptor and progesterone receptor. The expression of cyclin D₁ and p16 protein was not significantly correlated with overall survival and disease free survival. **Conclusions:** These results showed that expression of cyclin D₁ and p16 protein could not be used as a prognostic indicator in primary breast carcinoma. (Korean J of Breast Cancer 1998;1:226~240)

Key Words: Breast carcinoma, Cyclin D₁, p16

서론

최근 암이나 암세포주에서 유전자 변이 중 세포 주기를 조절하는 유전인자의 변이가 가장 흔한 것으로 조사되었으며 거의 모든예에서 G1 phase에 관여하는 유전자 중 1개 이상 변이가 일어나는 것으로 알려져 있다.

성숙핵의 세포주기는 2가지 중요한 지점에서 조절을 받는데 그 중 하나는 G1/S transition을 조절하는 것을 START (restriction point)라고 하며 여기에 관여하는 cyclin을 G1 cyclins이라고 하고 또 하나는 G2/M transition에 관여하는 물질로 mitotic cyclins이라고 한다¹⁾. Mitotic cyclins에는 cyclin A와 cyclin B가 있으며 G1 cyclins에는 cyclin C, cyclin D, cyclin E가 여기에 속한다. 이 중 가장 중요한 역할을 하는 cyclin D는 D₁, D₂ 그리고 D₃의 3가지 유형이 있으며 세포유형에 따라 달리 나타난다²⁻⁶⁾. Cyclin D₁은 염색체 11q13에 있는 CCND₁ 유전자에 의해 암호화(encode)되며, 처음에는 B형 림프종이 부갑상선 선종에서 발견되어 Bcl-1, PRAD1, D11S287 또는 CCND₁이라고 명명되었다^{3,5,6)}.

D-type cyclins는 CDK4 또는 CDK6와 복합체를 이루어 활성화되어 세포를 START 지점에서 S-phase로 가게 하는데 cyclin D가 관여하는 Rb 조절 경로를 요약하면 다음과 같다. 정상세포에서 세포주기의 초기인 G1 phase에서는 Rb 단백질에 DNA 복제에 관여하는 전사인자인 E2F family가 결합하고 있다가 cyclin D/CDK4이나 cyclin D/CDK6 복합체에 의하여 Rb가 인산화되면 Rb와 결합된 E2F가 유리된다. 유리된 E2F는 S-phase에서 DNA복제에 필요한 여러 유전자들을 합성하면서 세포주기를 진행시킨다^{7,8)}.

지금까지 cyclin D₁은 유방암, 위암, 식도암, 방광암 그리고 두경부의 편평세포암에서 증폭되어 나타난다고 알려져 있다^{9,10)}.

이와 반대로 cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)는 G1 phase를 억제한다고 알려져 있다.

CKIs는 2가지로 대별되며 하나는 kip/cip family라고 하는 p21, p27 그리고 p57이라고 하는 단백질

로서 cyclin D나 cyclin E가 CDK와의 복합체를 형성하는것을 억제하며 다른 하나는 INK₄ 단백질이라고 하는 p15, p16, p18 그리고 p19가 있으며 이것은 cyclin D-CDK4나 cyclin D-CDK6의 결합을 특이하게 억제한다고 알려져 있다¹¹⁻¹⁷⁾.

INK₄ family인 p15나 p16을 무력화시키는 변이(mutation)의 형태는 결손(deletion)이며 이로 인해 cyclin D와 CDK의 결합을 촉진시킴으로써 활성화가 일어난다. Rb 조절 경로에서 흔히 볼 수 있는 변이의 종류는 cyclin D₁의 증폭, Rb의 변이에 의한 비활성화, CDK4의 변형에 의한 활성화 등이다¹⁸⁻²¹⁾.

지금까지 p16 유전자 결손은 흑색종, 교아세포종(30-70%), 소아 또는 성인의 급성 백혈병(10-30%), 비인두암(35%), 악성 중피종(22%), 방광암(18%)에서 나타난다고 보고되고 있다²¹⁾.

지금까지 유방암에서 cyclin D₁이 과표현되면 재발률과 생존율이 나쁘다는 보고²²⁻²⁶⁾와 오히려 좋다는 보고²⁷⁻²⁹⁾가 있어서 아직 논란이 많은 실정이다.

본 연구에서는 유방암종 조직에서 cyclin D₁과 p16을 면역조직화학적 검사로 측정하여 지금까지 예후인자로 알려진 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, c-erbB-2, p53, Ki 67 및 조직학적 예후인자와의 관련성을 알아보고 환자의 무병생존율과 생존율을 조사하여 예후 인자로서의 역할을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1990년 1월부터 1996년 12월까지 7년동안 영남대학교 의과대학 외과학교실에서 수술한 유방암 중폐종 슬라이드와 파라핀 블록이 온전하게 보존된 침윤성 유방암종 340예를 대상으로 하였다. 임상 및 병리기록에 의존하여 환자의 나이, 종양의 크기, 림프절 전이 상태 등을 기록하였고 cyclin D₁과 p16 및 ER, PR, c-erbB-2, p53 및 Ki 67은 면역조직화학적 염색을 하였다.

1. 병리조직학적 관찰

종양의 크기는 장경을 기준으로 하며 TNM 분류법³⁰⁾에 의해 2.0 cm 이하, 2.1-5.0 cm 그리고 5.0 cm

보다 큰 경우로 나누었다. 조직학적 유형은 WHO 분류법³¹⁾을 따랐으며, 조직학적 등급은 modified Bloom-Richardson 등급체계에 따라 조직학적 분화도, 핵의 다형성, 유사 분열지수로 나누어 매겼다. 조직학적 분화도는 종양이 소관이나 선, 유두상 모양이 75% 이상이면 1점, 10%에서 75% 사이이면 2점, 10% 미만이면 3점으로 하였다. 핵의 다형성은 가장 심한 곳을 기준으로 하였으며, 핵의 크기와 모양이 규칙적이고 작으며 핵염색질이 골고루 분포하면 1점, 핵의 다형성이 경하고 핵의 크기가 중간 정도이며 핵인이 나타나면 2점, 핵의 크기와 모양이 다양하며 핵인이 뚜렷하거나 여러 개이고, 핵염색질이 거칠면 3점으로 하였다³²⁾.

유사분열지수는 유사분열이 관찰되는 부위 10군데를 선택하여 400배 시야에서 유사분열수의 합이 1-9개이면 1점, 10-19개이면 2점, 20개 이상이면 3점으로 하였다.

전체적인 조직학적 등급은 Scarff-Bloom-Richardson (SBR) 분류에 따라 세 등급의 점수를 합한 점수가 3-5점이면 1등급, 6, 7점이면 2등급, 8, 9점이면 3등급으로 하였다³³⁾.

또한 조직학적 분화도를 무시하고 핵의 다형성과 유사분열 지수만을 합한 값으로 modified SBR (MSBR) 등급을 매겼는데, 합한 점수가 2점이면 1등급, 3점은 2등급, 4점은 3등급, 5점은 4등급 그리고 6점인 경우 5등급으로 하였다.

2. 면역조직화학적 염색

1) Cyclin D₁과 p16 단백질

cyclin D₁ 단백질 염색은 각 증례당 형태학적으로 가장 잘 보존된 블록 한 개를 선택하여 4 μm 두께로 절편을 만들어 100% xylene으로 파라핀을 제거한 후 100%, 90% 및 75% 알콜로 재수화하였다. 3% 과산화수소를 15분간 작용시킨 후 Tris 완충액으로 3회 세척한 다음 0.21% citric acid 용액에 슬라이드를 넣고 5분간 극초단파로 처리한 후 protein blocker (Zymed, USA)를 30분간 도포하였다. 일차항체는 R124 (Santa-Cruz, U.S.A)를 1:500으로 희석하여 사용하였으며 37℃에서 2시간 동안 부치시킨 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. 그 후 일차항체인 Link

antibody (LSAB kit, DAKO, USA)를 37℃에서 30분간 도포한 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. Streptavidin-HRP (Zymed, USA)로 30분간 도포한 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. Diaminobenzidine tetrachloride (DAB)를 5-10분간 도포하여 발색하였고 10% Mayer's hematoxylin으로 대조염색하였다. p16 단백질염색은 cyclin D₁ 단백질염색과 같은 방법으로 시행하였으며 일차 항체는 F12 (Santa-Cruz, U.S.A)를 1:200으로 희석하여 사용하였다.

2) 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체

에스트로겐 및 프로게스테론 수용체의 염색은 동결된 조직을 이용하여 4 μm 두께로 절편을 만들어 3% 과산화수소를 5분간 작용시킨 후 Tris 완충액으로 3회 세척한 다음 protein blocker (Zymed, USA)를 5분간 도포하였다. 일차항체는 ER-IL, PGR-IL (Novocastra, U.K.)을 희석하지 않고 사용하였으며 상온에서 1시간 동안 부치시킨 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다. 그 후 Link antibody, Streptavidin-HRP, DAB의 사용 및 대조염색은 cyclin D₁ 단백질염색과 동일한 방법으로 시행하였다.

3) p53, c-erbB-2 및 Ki-67 단백질

이들 단백질의 염색은 cyclin D₁과 같은 방법으로 파라핀 제거와 재수화한 후 3% 과산화수소를 p53은 15분, c-erbB-2와 Ki-67은 5분간 도포하였다. Tris 완충액으로 3회 세척한 후 protein blocker를 p53은 30분, c-erbB-2나 Ki-67은 10분간 도포하였다.

p53의 일차항체는 NCL-DO7 (Novocastra, U.K.)을 1:300으로 희석하여 사용하였으며 37℃에서 2시간 부치시킨 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다.

C-erbB-2의 일차항체는 NCL-CB11 (Novocastra, U.K.)을 1:40으로 희석하여 상온에서 1시간 부치시킨 후 Tris 완충액으로 3회 세척하였다.

Ki-67 단백질의 염색은 7B11 (Zymed, U.S.A)를 1:50으로 희석하여 상온에서 1시간 부치시킨 후 Tris 완충액으로 세척하였다. 그 후 Link antibody, Streptavidin-HRP, DAB의 사용 및 대조염색은 cyclin D₁ 단백질 염색과 동일한 방법으로 시행하였다.

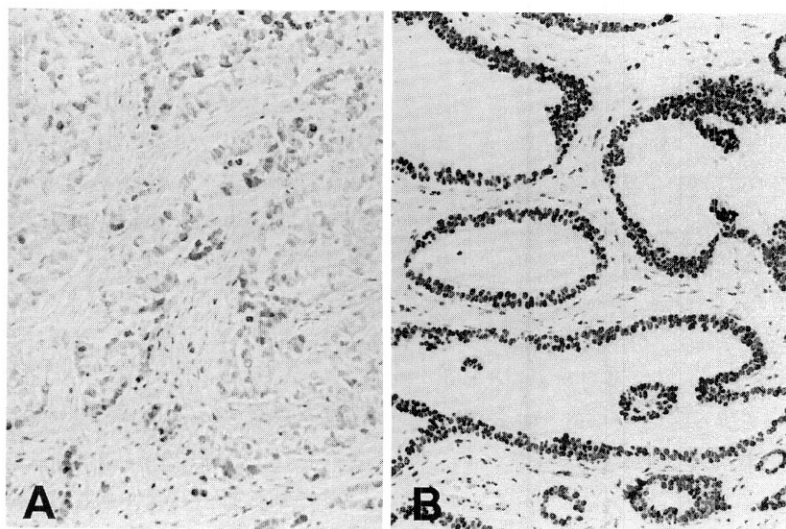


Fig. 1. Antibody for cyclin D₁. Most of the cells show diffuse nuclear staining of moderate (A) to strong (B) intensity.

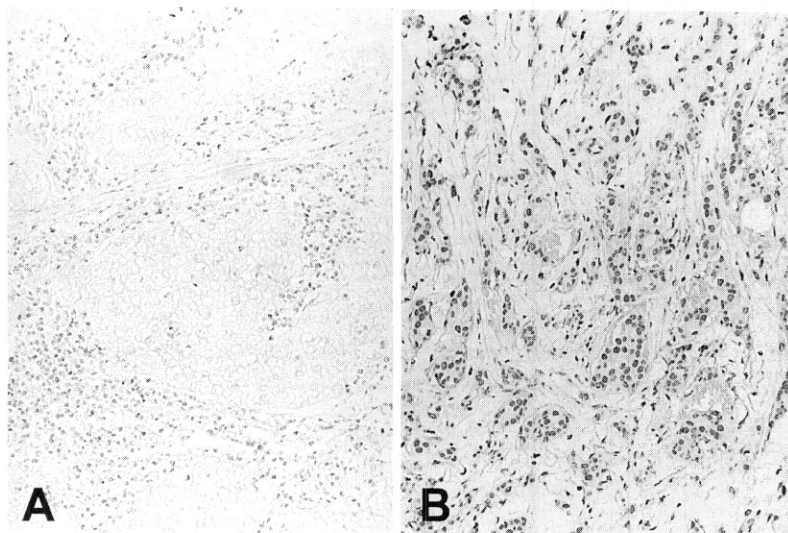


Fig. 2. For p16. Most of the tumor cells show negative (A) or positive (B) nuclear staining.

3. 양성 판정기준

매염색시마다 양성대조염색을 시행하였고 일차항체를 도포하지 않은 상태로 음성대조염색을 함께 시행하였다. Cyclin D₁ 단백질은 종양의 핵에 갈색으로 염색된 정도를 면적과 강도로 구분하여 면적은 0, 1 (<5%), 2 (5-50%) 및 3 (>50%) 점으로 나누었으며

강도는 염색정도에 따라 0, 1 및 2점으로 나누어서 두 점수의 합이 4점 이상(4-5점)이면 양성, 3점 이하(0-3점)이면 음성으로 판정하였다³⁴⁾.

p16 단백질은 핵이 분명히 갈색으로 염색된 종양세포의 수가 전체 종양세포수의 5% 이상일 경우 p16 유전자 이상이 없다고 판단하였다.

에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 및 p53

단백은 종양세포의 핵에 분명히 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였다. 이들의 양성 판정은 양성과 음성 두 가지로 하였으며 염색의 강도에 따른 구분은 하지 않았다. 세포질에 갈색으로 염색된 예에서는 핵에도 함께 염색된 예만을 양성으로 하였고 그렇지 않는 경우에는 음성으로 판정하였다.

C-erbB-2 종양단백은 세포질의 염색 유무와는 상관 없이 10% 이상의 종양세포에서 세포막에 진한 갈색으로 염색되면 양성으로 판정하였다.

Ki-67은 400배 시야에서 전체 종양세포수에 대한 분명히 갈색으로 염색된 종양 세포수의 백분율로 표시하여 20% 이상이면 양성으로 판독하였다.

Table 1. Status of cyclin D1 according to the age

Age	Cyclin (+)	Cyclin D ₁ (-)	Total
20-29	5	5	10
30-39	58	10	68
40-49	112	31	143
50-59	51	26	77
60-69	22	8	30
70-79	9	3	12
Total	257 (75.6%)	83 (24.4%)	340

Table 2. Cyclin D1 expression according to the histologic types

Type	Cyclin (+)	Cyclin (-)	Total
Invasive ductal NOS*	194 (73.5%)	70 (20.6%)	264
Non-ductal	63 (82.9%)	13 (17.1%)	76
Invasive lobular	16	2	18
Micropapillary	9	3	12
Micropapillary	9	2	11
Mucinous	4	2	6
Medullary	3	2	5
Metaplastic	4	0	4
Papillary	4	0	4
Tubular	4	0	4
Tubulolobular	10	3	13
Other			
Total	257 (75.6%)	83 (24.4%)	340

* NOS, Not otherwise specified.

4. 자료분석

Cyclin D₁와 p16 및 다른 예후인자와의 관련성은 SPSS/PC+프로그램을 이용하여 χ^2 -test로 감정하였으며 유의수준은 0.05 이하로 하였다. 수술 후 무병 생존율과 생존율은 Kaplan-Meier 방법으로 산출하였다.

성 적

포르말린 포매 조직에서 R124 단크론 항체를 이용한 cyclin D₁의 면역조직화학적 검사상 핵에 균일하게 갈색으로 염색이 되었으며 핵에 염색되는 면적 정도와 핵에 염색되는 강도가 달리 나타났으며 p16 단백질은 핵에 분명히 갈색으로 염색된 종양세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 1, 2).

유방암 340예의 평균 연령은 46.7 ± 10.7 (22-81세)였으며 연령에 따른 cyclin D₁ 양성률의 차이는 없었다(Table 1). 조직학적 유형은 침윤성 관상피암종이 264 (77.6%)에, 비관상피암종이 76 (22.4%)에였다. 전체 340예의 cyclin D₁의 양성률은 257/340 (75.6%)였으며 관상피형의 양성률(73.5%) 보다 비관상피형인 경우(82.9%)가 양성률이 높은 경향을 보

었다($p=0.07$). 특히 침윤성 소엽암종인 경우에는 18예 중 16예(88.9%)에서 양성물을 나타내었으며, 점액성암종은 11예 중 9예, 관상암종이나 관상소엽암종은 각각 4예 중 4예, 유두상암종은 4예 중 4예에서 양성물을 나타내어 예후가 좋은 암일수록 cyclin D1의 양성률이 높았다(Table 2).

암의 크기가 기록된 287예 중 2 cm 이하인 경우가 96예, 2-5 cm인 경우가 152예, 그리고 5 cm보다 큰 경우가 39례였으며 이들의 cyclin D1의 양성률은

Table 3. Association between cyclin D1 and tumor size, and axillary lymph node metastasis

	Positive No. of cyclin D1 (%)	p-value
T1 (≤ 2 cm)	17/ 96 (82.3)	N-S
T2 (2-5 cm)	110/152 (72.4)	
T3 (> 5 cm)	28/ 39 (71.7)	
Axillary L/N		N-S
(-)	95/124 (76.6)	
(+)	122/163 (74.8)	

Table 4. Correlation between cyclin D1 and histologic parameters

	Positive No. of cyclin D1 (%)	p-value
Histologic grade	16/ 20 (80.0) 48/ 55 (87.8) 123/179 (68.7)	<0.05
Nuclear grade	5/ 5 (100) 59/ 72 (81.9) 124/180 (68.9)	
Mitotic index	78/ 94 (83.0) 48/ 66 (72.7) 58/ 91 (63.7)	
SBR grade	29/ 32 (90.6) 73/ 96 (76.0) 84/125 (67.2)	<0.05
MSBR grade	4/ 4 (100) 44/ 49 (89.8) 37/ 54 (68.5) 49/ 63 (77.8) 52/ 83 (62.7)	

각각 82.3, 72.4, 71.7%로서 차이가 없었으며 액와 림프절 전이가 있었던 경우의 cyclin D1의 양성률은 76.6% (95/124)였으며 전이가 없었던 경우는 74.8% (122/163)로서 차이가 없었다(Table 3).

관상피암종 264예를 Bloom-Richardson 등급체계에 따라 조직학적 분화도, 핵의 다형성, 유사분열지수로 나누어 등급을 나누었을 때 조직학적 등급에 따른 cyclin D1 단백질 발현율은 1등급, 2등급, 3등급일 때 각각 80.8%, 87.8%, 68.7%로서 3등급에 비해 1, 2등급이 양성률이 높았다($p<0.05$). 핵등급에 따른 cyclin D1의 양성률은 1등급, 2등급, 3등급일 때 각각 5/5 (100%), 59/72 (81.9%), 124/180 (68.9%)였으며, 유사분열지수에 따른 양성률은 1등급, 2등급, 3등급일 때 각각 78/94 (83%), 48/66 (72.7%), 58/91 (63.7%)로서 핵등급이 낮을수록 유사분열지수가 낮을수록 양성률이 높았다(Table 4, $p<0.05$). 그리고 전체적인 조직학적 등급을 SBR과 MSBR로 구분하였을 때 SBR등급이 높을수록 MSBR등급이 높을수록 낮은 양성률을 나타내었다(Table 4, $p<0.05$).

Table 5. Correlation between cyclin D1 and various prognostic factors

	Positive No. of cyclin D1 (%)	p-value
ER		<0.05
Positive	99/123 (80.5)	
Negative	92/138 (66.8)	N-S
PR		
Positive	115/151 (76.2)	<0.05
Negative	75/109 (68.8)	
c-erbB2		<0.05
Positive	34/ 63 (54.0)	
Negative	138/175 (78.9)	N-S
p53		
Positive	94/133 (70.7)	<0.05
Negative	82/108 (75.9)	
p16		<0.05
Positive	165/208 (79.3)	
Negative	58/ 87 (66.7)	N-S
Ki67		
<20%	11/ 11 (100)	
>20%	21/ 22 (95.5)	

Table 6. Correlation between cyclin D₁ and stage

	Positive No. of cyclin D ₁ (%)	p-value
Stage I	28/ 36 (77.8)	N-S
Stage II	98/113 (73.7)	
Stage III	24/ 35 (68.6)	
Stage IV	3/ 5 (60.0)	

Table 7. Status of p16 according to the age

Age	p16 (+)	p16 (-)	Total
20-29	6	2	8
30-39	45	15	60
40-49	81	39	120
50-59	42	27	69
60-69	24	4	28
70-79	10	0	10
Total	208 (70.5%)	87 (29.5%)	295

에스트로젠 수용체 양성군은 261예 중 123예(47.1%)였으며 ER 양성인 경우 cyclin D₁의 양성률은 80.5%, ER 음성인 경우 cyclin D₁의 양성률은 66.8%로서 ER 양성인 경우가 ER 음성인 경우보다 양성률이 높았다($p < 0.05$). 프로게스테론 수용체 양성군은 260예 중 151예(58.1%)였으며, PR 양성인 경우와 음성인 경우의 cyclin D₁의 양성률은 각각 76.2%, 68.8%로서 차이는 없었다($p > 0.05$). C-erbB-2 중양단백 발현의 양성률은 238예 중 63예로서 26.5%였으며 c-erbB-2가 양성인 경우와 음성인 경우의 cyclin D₁의 양성률은 각각 54.0%와 78.9%로서 c-erbB-2가 음성인 경우가 cyclin D₁의 양성률이 높았다($p < 0.05$). p53의 양성률은 241예 중 133예로서 55.2%였으며 p53 양성인 경우와 음성인 경우의 cyclin D₁의 양성률은 각각 70.7%와 75.9%로서 차이가 없었다. Ki-67의 양성률은 63.6% (21/33)였으며 Ki-67의 양성률과 음성

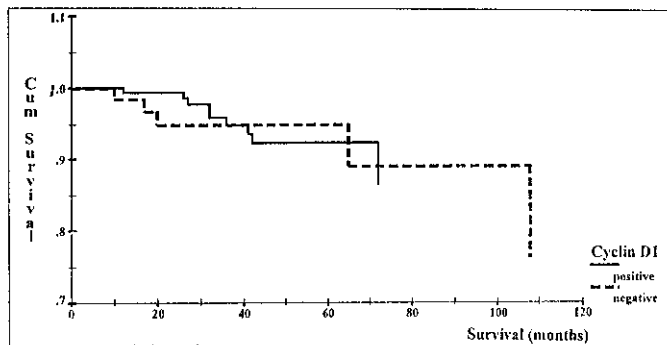
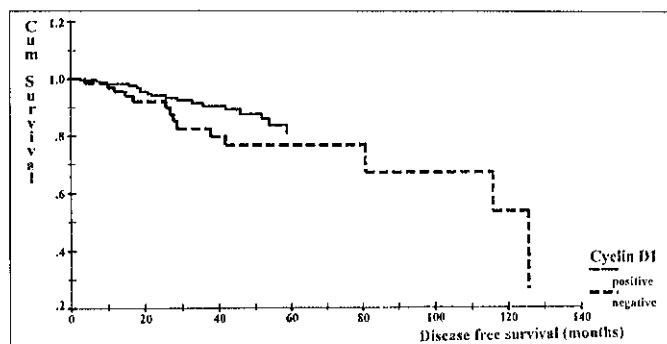
**Fig. 3.** Kaplan-Meier overall survival curves in breast cancer patients with cyclin D₁ protein expression ($p > 0.05$).**Fig. 4.** Kaplan-Meier disease free survival curves in breast cancer patients with cyclin D₁ protein expression ($p > 0.05$).

Table 8. p16 expression according to the histologic types

Type	p16 (+)	p16 (-)	Total
Invasive ductal NOS*	164 (71.3%)	66 (28.7%)	230
Non-ductal	44 (67.7%)	21 (32.3%)	65
Invasive lobular	9	4	13
Micropapillary	8	3	11
Mucinous	7	2	9
Medullary	4	1	6
Metaplastic	2	3	5
Papillary	1	2	3
Tubular	3	1	4
Tubulolobular	3	0	4
Other	7	3	13
Total	208 (70.5%)	87 (29.5%)	295

Table 9. Association between p16 and tumor size, and axillary lymph node metastasis

	Positive No. of p16 (%)	p-value
T1 (≤2 cm)	40/ 53 (75.5)	N-S
T2 (2-5 cm)	74/106 (69.8)	
T3 (> 5 cm)	17/ 22 (77.3)	
Axillary L/N		N-S
(-)	66/ 84 (78.6)	
(+)	64/ 97 (66.0)	

에 따른 cyclin D₁의 차이는 없었다. p16이 양성일 때와 음성일 때의 cyclin D₁의 양성률은 각각 165/208 (79.3%)와 58/87 (66.7%)로서 p16이 양성일 때 cyclin D₁의 양성률이 높은 경향을 나타내었다 (Table 5, $p<0.05$). 종양의 병기에 따른 cyclin D₁의 발현빈도는 병기가 낮을수록 높은 빈도를 보였으나 통계학적인 유의성은 없었다 (Table 6).

p16은 295예에서 측정되었으며 p16의 양성률은 208/295 (70.5%)였으며 연령별 차이는 없었다 (Table 7). 조직학적 유형별로는 p16의 양성률은 관상피암종인 경우 164/230 (71.3%)였고 비관상피암종인 경우는 44/65 (67.7%)로서 관상피암종에서 다소 높게 나타났으나 통계적 의미가 없었으며 암의 크기에 따른 p16의 양성률도 차이가 없었다 (Table 8, 9). 230

Table 10. Correlation between p16 and histologic parameters

	Positive No. of p16 (%)	p-value
Histologic grade	9/ 15 (60.0) 37/ 49 (75.5) 112/157 (71.3)	N-S
Nuclear grade	3/ 4 (75.0) 42/ 57 (73.7) 116/163 (71.2)	N-S
Mitotic index	58/ 79 (73.4) 48/ 59 (81.4) 51/ 80 (63.8)	N-S
SBR grade	17/ 25 (68.0) 65/ 85 (76.5) 76/109 (69.7)	N-S
MSBR grade	2/ 3 (66.7) 28/ 37 (75.7) 38/ 51 (74.5) 42/ 54 (77.8) 48/ 74 (64.9)	N-S

예의 관상피암종에서 Bloom-Richardson 등급에 따른 조직학적 분화도, 핵의 다형성, 유사분열지수와 p16과의 연관성은 없었으며 SBR방법이나 MSBR방법에 따른 연관성도 없었다 (Table 10).

에스트로겐 수용체 및 프로그스테론 수용체가 양

성일수록 p16 단백질현의 빈도가 유의하게 높았으나 c-erbB2와 p53와는 무관하였다(Table 11). p16과

Table 11. Correlation between p16 and various prognostic factors

	Positive No. of p16 (%)	p-value
ER		<0.05
Positive	86/109 (78.9)	
Negative	78/121 (64.5)	
PR		<0.05
Positive	103/133 (77.4)	
Negative	61/ 97 (62.9)	
c-erbB2		N-S
Positive	40/ 58 (69.0)	
Negative	108/152 (71.1)	
p53		N-S
Positive	81/115 (70.4)	
Negative	71/100 (71.0)	

Table 12. Correlation between p16 and stage

	Positive No. of p16 (%)	p-value
Stage I	21/ 31 (77.4)	N-S
Stage II	83/133 (73.5)	
Stage III	19/ 32 (59.4)	
Stage IV	4/ 5 (80.0)	

병기에 따른 연관성도 관찰할 수 없었다(Table 12).

Cyclin D₁의 발현유무와 생존율의 비교에서 cyclin D₁ 양성군과 음성군에서 5년 생존율은 각각 92.2%, 94.9%로서 차이가 없었으며 무병생존율에 있어서도 차이가 없었다(Table 3, 4).

p16 단백질의 발현유무와 생존율의 비교에서 p16 양성군과 음성군에서 5년 생존율은 93.7%, 91.7%로서 차이가 없었으며 무병생존율에 있어서도 차이가 없었다(Fig. 5, 6).

고 찰

Cyclin D₁이 위치하는 염색체 11q13의 증폭은 비교적 특이한 암에서만 관찰되고 일반적으로 이러한 유전자의 과표현이 암의 유발원인이 된다고 알려져 있다¹⁰⁾. Cyclin D₁은 CDK4 또는 CDK6와 결합하여 세포분열주기의 G1 phase에 작용하며 Rb gene의 인산화에 관여한다. Rb가 인산화가 되지 않으면 전사 인자(transcription factors)인 E2F family와 결합하여 세포주기의 진행을 억제하며 인산화되면 억제 능력이 소실된다. 따라서 cyclin D₁이나 CDK4가 과표현되거나 암 억제유전자인 p16의 기능이 소실되면 Rb의 인산화를 시켜 세포분열이 일어나도록 촉진한다^{18,19,21)}. 따라서 p16, cyclin D₁, CDK4와 Rb는 암을 유발시키는데 관여한다고 볼 수 있다. 그러나 어떤 암종에서 특이하게 이런 단백질들의 변형이 일어나는지와 이들이 임상결과에 어떤 영향을 주는지는 아직

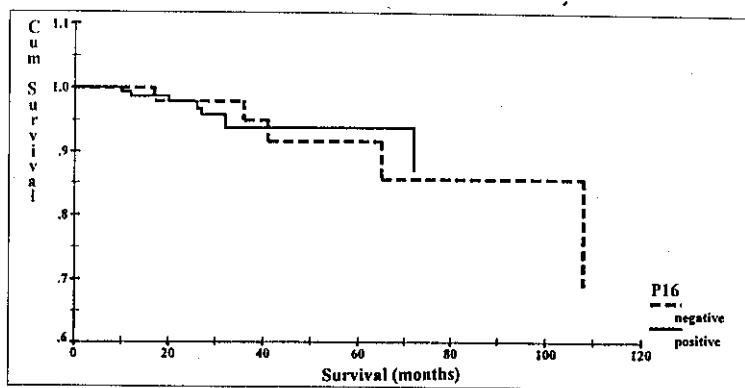


Fig. 5. Kaplan-Meier overall survival curves in breast cancer patients with p16 protein expression ($p > 0.05$).

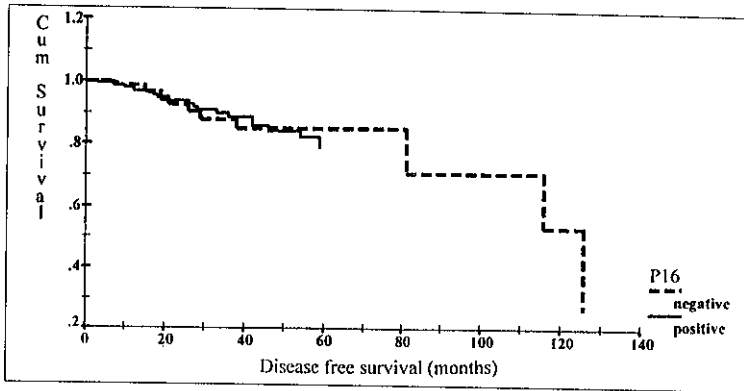


Fig. 6. Kaplan-Meier disease free survival curves in breast cancer patients with p16 protein expression ($p > 0.05$).

명확하지 않다.

Cyclin D₁의 과표현을 알기 위해 측정하는 방법에는 여러가지가 있으나 지금까지 면역조직화학적 방법이나 Western blot에 의한 단백측정 및 11q13 DNA 증폭을 측정한 결과가 거의 일치하며 DNA 증폭이 많을수록 면역조직화학적 검사에서도 강하게 염색된다고 한다. 아울러 CCND1 locus의 증폭은 있으나 전사능력이 없는 경우와 소량 증폭되어 있는 경우는 DNA나 RNA를 측정해서 나타나지 않는 것이 면역조직화학적 검사에는 염색되므로 양성률이 높게 나타난다고 하였다^{18,27,35-39}).

면역화학적 검사의 단점으로는 판독상의 기준이 표준화되어 있지 않다는데 있다. Gillett 등²⁷은 염색 정도에 따라 경도, 중등도, 강도로 분류하였고 Bartkova 등³⁵은 미약하거나 염색되지 않는 경우, 10-50%의 암세포가 염색된 것이 보일 정도, 그리고 50% 이상의 핵이 강하게 염색되는 것으로 구분하였으며, 최근의 Michalides 등³⁷은 50% 이상의 핵이 강하게 염색되면 ++, 5-50%의 핵이 분명히 염색되었으면 +, 5% 이하의 핵이 약하지만 염색되었으면 +/-, 그리고 염색이 되지 않았으면 -로 구분하였다. 본 논문에서는 이를 분명히 구분하기 위하여 핵이 염색되는 면적에 따라 0, 1 (<5%), 2 (5-50%) 및 3 (>50%)점으로 구분하였고 염색 강도에 따라 염색이 미약하거나 되지 않으면 0점, 약하게 염색되면 1, 강하게 염색되면 2점으로 하는 점수제를 도입하여 판독상의 오차를 줄이려고 하였다³⁴).

유방암에서 면역조직 화학적 검사에서 cyclin D₁의 과표현 정도는 28-81.3%로 다양하며 이는 사용하는 항체나 판독기준이 서로 다르기 때문이라고 생각된다^{27,29,35-39}). 본 연구에서 cyclin D₁의 양성률은 73.3%로 비교적 높게 측정되었으며 관상피형에서 70.5%, 그리고 이보다 예후가 좋다고 알려진 비관상피형에서는 81.8%로 비교적 높은 양성률을 보였으나 통계적인 의미는 없었다.

조직학적 유형에 따른 cyclin D₁의 양성률에 있어서 Michalides 등³⁷은 관상피암종이나 비관상피암종의 차이가 없다고 하였으나 van Diest 등³⁸은 관상암종(11/13), 침윤성 사상암종(4/4), 소엽상암종(17/20)에서 양성인 반면에 침윤성 관상피암종은 50% 정도에서 양성률을 보여 비관상암종일수록 발현율이 높다고 하였으며, Courjal 등³⁶도 침윤성 관상피암종보다가는 침윤성 소엽암종이 2배 정도 높은 발현율을 나타낸다고 하였다. 본 연구에서도 통계적인 유의성이 없었으나 비관상 암종인 경우 cyclin D₁의 양성률이 높은 경향을 보였으며 특히 침윤성 소엽암종(16/18), 점액성 암종(9/11), 관상 암종(4/4) 및 관상 소엽암종(4/4) 유두상 암종(4/4)에서 높은 양성률을 보여 예후가 좋은 암일수록 높은 양성률을 나타내었다.

지금까지 보고에서 cyclin D₁의 발현정도가 나이와 암의 크기와는 상관없이 없다는 보고^{40,42})가 많으며 이는 본 연구 결과와도 유사하였다.

액와림프절 전이 유무에 대한 연관성은 림프절

전이가 있는 경우가 양성률이 높다는 보고⁴³⁾도 있으나 다른 보고⁴⁰⁻⁴²⁾에서는 대부분이 연관성이 없다고 하며 본 연구에서도 연관성이 없는 것으로 조사되어 cyclin D₁이 전이에는 연관이 없는 것으로 생각한다.

조직학적 등급에 따른 cyclin D₁의 양성률은 고분화 암일수록 양성률이 높다는 보고⁴⁰⁻⁴²⁾가 많으며 본 연구에서도 조직학적 등급이 낮을수록, 핵등급은 낮을수록 cyclin D₁의 발현빈도가 높았다. 아울러 유사분열지수도 등급이 낮을수록 발현빈도가 높아 다른 보고자⁴¹⁾와 유사하였다.

아울러 SBR이나 MSBR 등급에 따른 cyclin D₁은 등급이 낮을수록 발현빈도가 높은 경향을 나타내었다. 이와 같이 이론적으로 cyclin D₁이 과표현되면 예후가 나쁜 병리조직학적 소견이 나타나야 함에도 불구하고 상반되는 결과가 나타나는 이유에 대해서는 명확히 규명된 바가 없다. 그러나 cyclin D₁의 과표현으로 인한 유사분열이 많아져서 생기는 증식에 의해서 반드시 고분화암이 된다고는 볼 수 없는 것은 cyclin D₁이 과표현되어 G1 phase가 짧아진다 하더라도 세포주기의 다른 부분에서 보상받거나 p53이나 Rb와 같은 다른 조절인자에 의해 억제될 수 있기 때문이다. 미분화된 관상암종이나 수질암종의 대부분은 cyclin D₁이 없어도 다른 방법으로 증식된다는 보고도 있다. 즉 미분화암인 경우 cyclin D₁은 없더라도 Rb 유전자의 결함에 의해 증식을 촉진할 수 있기 때문이라고 하였다^{41,42,44,45)}.

고분화암인 경우에 에스트로겐 수용체 양성인 경우가 많으며 이런 경우 cyclin D₁이 낮다는 보고²⁸⁾도 있으나 대부분 발현이 높다는 보고^{27,37,38)}가 많으며 본 연구에서도 cyclin D₁과 에스트로겐 수용체가 밀접한 상관관계가 있음을 나타내었다. 이는 에스트로겐에 반응을 잘하는 암인 경우 에스트로겐에 의해 cyclin D₁의 유도 또한 잘 되기 때문이라는 보고^{40,46)}가 있다. 이는 에스트로겐 수용체 양성인 유방암의 경우 cyclin D₁의 과표현이 cyclin D₁ DNA의 증폭에 의한 것이라기 보다는 에스트로겐에 의한 민감성에 의해 나타나므로 에스트로겐 수용체와는 달리 cyclin D₁이 단독적으로 예후인자로서의 역할을 한다고는 보기 힘들다고 하겠다.

p53은 에스트로겐 수용체 음성인 경우나 미분화

암인 경우에 발현율이 높으며, 이론상 p53의 역할이 소실되면 cyclin D₁이 활성화되는 것으로 알려져 있지만 지금까지 보고에서는 상관관계가 없는 것으로 알려져 있으며^{28,37)} 본 연구에서도 상관관계는 없었다. C-erbB-2의 발현은 예후가 나쁜 것으로 알려져 있으며 McIntosh 등²⁸⁾은 cyclin D₁과 c-erbB-2와의 상관관계는 없었으나 EGFR이 높고 cyclin D₁이 높으면 예후가 나쁘다고 보고하였다. 본 연구에서는 c-erbB-2가 음성일수록 cyclin D₁의 발현율이 높게 나타났다. 이에 대한 원인은 앞으로 규명해야 할 과제라고 생각된다.

Ki-67은 핵항원으로서 세포 주기에 있는 세포 중 G0, 초기의 G1을 제외한 후기 G1, S, M 그리고 G2에 있는 세포에서만 염색되는 증식되는 세포의 정도를 알 수 있는 척도로서 알려져 있으며 본 연구에서는 Ki-67 발현과 cyclin D₁의 상관관계는 없었다. 이는 Ki-67의 검수수가 적을 뿐 아니라 G1 후기를 반영하는 cyclin D₁에 비해 Ki-67은 G0과 초기의 G1을 제외한 광범위한 증식세포를 반영하므로 직접적인 연관성을 얻기는 힘들 것으로 판단되나 cyclin D₁이 발현되더라도 증식세포 수가 많아지지 않는 것은 다른 보고와 유사하였다²⁷⁻³⁵⁾.

INK₄ 중의 하나인 p16은 9p21에 위치하며 cyclin D₁을 억제하는 암억제 인자 중의 하나이다.

p16의 변형은 주로 결손 형태로 나타나며 이때면 역조직화학적 검사상 발현되지 않는다. Geradts 등⁴³⁾은 유방암의 경우 104예 중 49%에서 음성으로 나타나며 다른 조직학적 예후인자와는 연관성이 없다고 하였다. 본 연구에서는 29.5%에서 음성으로 빈도는 약간 낮았으나 다른 조직학적 예후인자와는 연관성이 없는 것은 유사하였다. 이러한 빈도차이는 p16단백이 파괴되기 쉬우며 판독기준에 따라 달라지기 때문이라고 생각된다. 그러나 p16이 양성일 때 cyclin D₁ 양성률은 79.3%이며 p16이 음성일 때 cyclin D₁의 양성률은 66.7%로서 p16이 변형되어 소실된 경우에 cyclin D₁의 비활성화를 초래하는 상반되는 결과를 나타냈다. 반면에 에스트로겐 수용체와 프로게스테론 수용체가 양성일수록 p16의 양성률이 높게 측정되어 p16이 호르몬 수용체와 밀접한 관계가 있음을 시사하였다.

지금까지 p16단백의 변형이 유방암의 생존율에는 영향을 주지 않으며 유방암의 발생과 진행에도 무관하다고 한다⁴⁷⁾. 이는 본 연구의 결과와 유사하였다. 지금까지 보고된 자료에서 cyclin D₁이 과표현되면 더 악성이며 재발율과 생존율이 나쁘다는 보고²²⁻²⁶⁾와 오히려 예후가 좋다는 보고²⁷⁻²⁹⁾가 있어서 아직은 논란이 많다. Cyclin D₁이 높으면 이론적으로 예후가 나빠야 함에도 불구하고 예후가 좋다는 이유에 대한 설명으로 앞에서 언급한 것 외에도 Bartkova 등은 여러종류의 암종에서 11q13의 증폭이 없이 비정상적인 형태의 cyclin D₁의 발현을 관찰하였으며 적당한 양의 cyclin D₁은 G1 phase를 활성화시키지만 많은 양의 cyclin D₁은 오히려 S-phase로 가지 못하게 한다는 보고도 있다¹⁸⁾. 그리고 cyclin D₁이 많으면 세포증식능력을 반영하는 S-phase fraction이나 Histone H4 또는 PCNA 표시지수 등이 높아야 하나 그렇지 않다는 보고도 있다^{27,35,40)}. 아울러 Rb 유전자가 cyclin D₁의 전사를 조절하며 Rb 유전자가 변형되면 cyclin D₁도 역할을 못하며, 그 이유로는 p16이 많아져서 CDK4나 CDK6의 결합을 무력화시킴으로써 cyclin D₁의 역할을 못하게 된다는 것이다^{7,48,49)}. 그러나 아직까지 이러한 이유와 기전에 대해 확실히 밝혀진 것은 없어서 앞으로 규명해야 할 과제라고 생각한다. 본 연구에서는 cyclin D₁의 과표현에 따른 무병생존율이나 생존율의 차이는 발견되지 않았다. 따라서 cyclin D₁이 단독으로 예후인자로서의 역할은 하기 어렵다고 생각한다.

이상을 요약하면 cyclin D₁이 예후가 좋은 비관상피형에서 발현율이 높았으며 아울러 좋은 예후와 연관이 있다고 알려진 고분화암, 낮은 핵의 분화도, 낮은 유사분열지수, 에스트로겐 수용체 양성, c-erbB-2 음성일수록 cyclin D₁의 발현율이 높으므로 cyclin D₁은 미분화암 보다는 오히려 고분화암을 유도하는 역할을 하는 것으로 추측된다. 따라서 cyclin D₁이 발현될수록 예후는 좋을 것으로 예측되나 향후 재발율과 생존율에 대한 장기간의 추적조사가 필요할 것으로 생각한다.

p16이 양성일수록 스테로이드 수용체도 양성인 경우가 많아 p16과 스테로이드 수용체와의 어떠한 상호작용을 하는지는 규명되어야 할 부분으로 생

각한다. 아울러 p16이 양성일수록 cyclin D₁의 양성률도 높아서 cyclin D₁이 과표현된다고 해서 p16의 변형이 초래되었다고 볼 수는 없을 것으로 생각한다.

결론적으로 cyclin D₁과 p16은 세포주기에 관여하는 하나의 인자이나 높은 양성률이 생존율과 무병생존율의 차이가 없으므로 독립적인 예후인자가 될 수는 없다고 생각되나 향후 세포주기의 다른 여러가지 인자들과 복합적으로 조사해 보는 것이 바람직하다고 생각한다.

요 약

세포주기 조절에 관련이 있는 cyclin D₁이 과표현되면 G1 phase를 단축시켜 S-phase로 가게 하며 p16은 cyclin D₁과 CDK4의 복합체의 활성화를 억제하는 역할을 한다고 알려져 있다.

지금까지 유방암에서 cyclin D₁이 과표현되면 재발율과 생존율이 나쁘다는 보고와 좋다는 보고가 있어서 아직 논란이 많은 실정이다.

본 연구에서는 1990년 1월부터 1996년 12월까지 7년동안 영남대학교 의과대학 외과학 교실에서 수술한 340예의 침윤성유방암 조직에서 cyclin D₁과 p16을 면역조직화학적 검사로 측정하여 지금까지 예후인자로 알려진 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, c-erbB-2, p53, Ki-67 및 조직학적 예후인자와 관련성을 알아보고 환자의 무병생존율과 생존율을 조사하여 예후인자로서의 역할을 규명하고자 하였다.

Cyclin D₁과 p16 단백질의 양성률은 각각 75.6% (257/340), 70.5% (208/295)였다. Cyclin D₁이 양성일수록 조직학적 분화도, 핵의 다형성 및 유사분열지수의 등급이 유의하게 낮았으며 통계적인 의미는 없었으나 관상피암종 보다 예후가 좋은 비관상피암종에서 높은 발현율을 나타내었다. 전체적인 조직학적 등급을 SBR과 MSBR로 구분하였을때 SBR이나 MSBR의 등급이 높은 미분화암일수록 cyclin D₁의 양성률이 낮았다. 아울러 예후가 좋다고 알려진 에스트로겐 수용체 양성일수록 그리고 c-erbB-2 음성일수록 cyclin D₁의 양성률이 높아서 cyclin D₁이 고

분화암을 형성하는데 관여하는 것으로 생각한다. 그러나 cyclin D₁과 연령, 암의 크기, 프로게스테론 수용체, p53, Ki-67 그리고 병기와는 연관성이 없었다.

p16단백은 조직학적인 예후 인자나, 연령, 암의 크기, 병기, p53와는 연관이 없었으나 에스트로겐 수용체 그리고 프로게스테론 수용체 양성일수록 높은 양성률을 나타내었다.

Cyclin D₁의 발현유무와 무병생존율과 생존율의 비교에서 cyclin D₁이 양성인 경우 무병생존율이나 생존율은 차이가 없었다. p16 단백질의 경우에도 무병생존율과 생존율 모두에서 차이가 없었다.

이상의 결과로 cyclin D₁이 고분화암일수록 높게 발현되나, cyclin D₁이나 p16 모두 유방암에서 예후 인자로서 사용하기는 어려울 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer. *Cell* 66:1071, 1991
- Draetta G, Luca F, Westendorf J, Brizuela L, et al: Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56:829, 1989
- Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, et al: Genomic organization chromosomal localization and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics* 13:565, 1992
- Lew DJ, Dulic V, Read SI: Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* 66:1197, 1991
- Motokura T, Bloom T, Kim HG, Juppner H, et al: A novel cyclin encoded by a bcl-linked candidate oncogene. *Nature* 350:512, 1991
- Xiong Y, Menninger J, Beach D, Ward DC: Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins. *Genomics* 13:575, 1992
- Bates S, Bonetta L, MacAllan D, Parry D, Holder A, Dickson C, Peters G: CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D₁. *Oncogene* 9:71, 1994
- Meyerson M, Harlow E: Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14:2077, 1994
- Lammie GA, Fantl V, Smith R, Schuurin E, Brookes S, Michalides R, Dickson C, Arnold A, Peters G: D11S128, a putative oncogene on chromosome 11q13 is amplified and expressed in squamous cell and mammary carcinomas and linked to BCL-1. *Oncogene* 6: 439, 1991
- Motokura T, Arnold A: Cyclins and oncogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1155:63, 1993
- Chan FK, Zhang J, Cheng L, Shaprio DN, et al: Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK inhibitor with homology to p16 ink4. *Mol Cell Biol* 15:2682, 1995
- Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, et al: Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol* 15:2672, 1995
- Hunter T, Pines J: Cyclins and cancer II: cyclin and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79:573, 1994
- Lee MH, Reynisdottir I, Massague J: Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9:639, 1995
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ: p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9:650, 1995
- Sheaff RJ, Roberts JM: Tumor suppression. Lessons in p16 from phylum falciparum. *Curr Biol* 5:28, 1995
- Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149, 1995
- Draetta G: Mammalian G1 Cyclins. *Curr Opin Cell Biol* 6:842, 1994
- Hartweel LH, Weinert TA: Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246:629, 1989
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tratigian SV, Stokert E, Day RS-3rd,

- Johnson BE, Skolnick MH: a cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436, 1994
- 21) Kamb A: Cell cycle regulators and cancer. *Trends Genet* 11:136, 1995
- 22) Borg A, Sigurdsson H, Clark GM, Freno M, et al: Association of INT1/HST1 coamplification in primary breast cancer with hormone dependent phenotype and poor prognosis. *Br J Cancer* 63:136, 1991
- 23) Fantl V, Smith R, Brookes S, Dickson C, et al: Chromosome 11q13 abnormality in human breast cancer. *Cancer Surveys* 18:77, 1993
- 24) Henry JA, Hennessy C, Levett DL, Lemmard TWJ, et al: Int-2 amplification in breast cancer. Association with decreased survival and relationship to amplification of c-erbB-2 and c-myc. *Int J Cancer* 53: 774, 1993
- 25) Peters G, Fantl V, Smith R, Brookes S, et al: Chromosome 11q13 markers and D-type cyclins in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 33:125, 1995
- 26) Shuuring E, Verhoeven E, van Tinteren H, Peterse HL, et al: Amplification of genes with in the chromosome 11q13 region is indicative of poor prognosis in patients with operable breast cancer. *Cancer Res* 52:5229, 1992
- 27) Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, et al: Cyclin D₁ and prognosis in human breast cancer. *In J Cancer* 69:92, 1996
- 28) McIntosh GG, Anderson JJ, Milton I, Steward M, et al: Determination of the prognostic value of cyclin D₁ overexpression in breast cancer. *Oncogene* 11: 885, 1995
- 29) Zhang SY, Caamano J, Cooper F, Guo X, et al: Immunohistochemistry of cyclin D₁ in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 102:695, 1994
- 30) American joint committee on cancer: Manual for staging of cancer. J B Lippincott company, Philadelphia, 1992, p152
- 31) The World Health Organization: The world health organization histological typing of breast tumors-second edition. *Am J Clin Pathol* 78:806, 1982
- 32) Dalton LW, Page DL, Dupont WD: Histologic grading of breast carcinoma: A reproducibility study. *Cancer* 73:2765, 1994
- 33) Le Droussal V, Tubiana-Hulin M, Friedman S, Hacene K, et al: Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR): An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer* 64:1914, 1989
- 34) Courtney SP, Williams S, Mansel RE: Observer variation in recording immunohistochemical staining patterns of breast epithelium. *Breast Dis* 5:243, 1992
- 35) Bartkova J, Lukas J, Müller H, Lützhøft D, et al: Cyclin D₁ protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 57:353, 1994
- 36) Courjal F, Louason G, Speiser P, Katsaros D, et al: Cyclin gene amplification and overexpression in breast and ovarian cancers: Evidence for the selection of cyclin D₁ in breast and cyclin E in ovarian tumors. *Int J Cancer* 69:247, 1996
- 37) Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, Houben L, et al: A clinicopathological study on overexpression of cyclin D₁ and of p53 in a series of 248 patients with operable breast cancer. *Br J Cancer* 73:728, 1996
- 38) van Diest PJ, Michalides RJ, Jannink L, vanderValk P, et al: Cyclin D₁ expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am J Pathol* 150(2):705, 1997
- 39) Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M, Thor AD, et al: Cyclin D₁ (PRAD1) protein expression in breast cancer: Approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D₁ oncogene. *Mod Pathol* 815:560, 1995
- 40) Buckley MF, Sweeney KJ, Hamilton JA, Sini RL, et al.: Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer. *Oncogene* 8:2127, 1993
- 41) Jiang W, Kahn SM, Zhou P, Zhang YJ, Cacace AM, Infante AS, Doi S, Santella RM, Weinstein IB: Overexpression of cyclin D₁ in rat fibroblasts causes abnormalities in growth control, cell cycle progression and gene expression. *Oncogene* 8:3447, 1993
- 42) Musgrove EA, Lee CS, Buckley MF, Sutherland

- RL: Cyclin D₁ induction in breast cancer cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8022, 1994
- 43) Geradts J, Wilson PA: High frequency of aberrant p16 (INK4A) expression in human breast cancer. *Am J Pathol* 149(1):15, 1996
- 44) Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G: Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene* 9:1633, 1994
- 45) Quelle DE, Ashmun RA, Shurtleff SA, Kato JY, et al: Overexpression of mouse D-type cyclins accelerated G1 phase in rodent fibroblast. *Genes Dev* 7:1559, 1993
- 46) Mushgrove EA, Hamilton JA, Lee CS, Sweeney KJ, et al: Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T47D human breast cancer cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 13:3577, 1993
- 47) Bern EM, Klijn JG, Smith M, van-Staveren IL, et al: Infrequent CDKN2 [MTS1/p16] gene alterations in human breast cancer. *Br J cancer* 72(4):964, 1995
- 48) Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G: Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlated with high levels of p16^{INK4/MTS1} tumor suppressor gene product. *EMBO J* 14:503, 1995
- 49) Müller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, et al: Cyclin D₁ expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Nat Acad Sci* 91:2945, 1994