

유방암에서 Cyclin D1 발현에 따른 에스트로겐 수용체 양성률에 대한 연구

한림대학교 의과대학 외과학교실, ¹연세대학교 의과대학 병리학교실

서효찬 · 김승일 · 양우익¹ · 박찬흔 · 박철재

Cyclin D1 Expression in Primary Breast Carcinoma: Correlation with Estrogen Receptor Status and Other Clinicopathologic Parameters

Hyo Chan Seo, M.D., Seoung Il Kim, M.D., Woo Ick Yang, M.D.¹, Chan Hun Park, M.D. and Chul Jae Park, M.D.

Department of Surgery, Hallym University College of Medicine,
¹Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Cyclins are groups of proteins that play a role as a major regulator of the G1 restriction point promoting inactivation of the retinoblastoma protein. The cyclin D1 gene, CCND1, is amplified in approximately 20% of breast carcinomas and the protein is reportedly overexpressed in 60~80% of all cases. Cyclin D1 overexpression was strongly correlated to estrogen receptor positivity and better histologic grade in breast cancer. The aim of this study was to correlate cyclin D1 overexpression using a well characterized antibody with estrogen receptor status and other clinicopathologic parameters.

Methods: From March 1989 to December 1994, 85 patients with primary breast carcinoma were the subject in this study. We analyzed cyclin D1 expression by immunohistochemical staining using cyclin D1 antibody, cells were considered positive according to distinct nuclear staining. The correlation between cyclin D1 expression was compared with important clinicopathologic parameters (tumor size, axillary lymph node status, p53 expression, c-erbB2 expression, histologic grade, estrogen receptor status).

Results: Cyclin D1 expression was detected in 37 cases (43.5%). Cyclin D1 expression was high in patients with tumors that expressed estrogen receptor (58.5% vs 26.5%,

$P=0.019$). Cyclin D1 was mainly overexpressed in the histologic grade I and II (75.0%), as compared with 65.2% in cyclin D1 negative tumor, however there was no statistical significance ($P=0.067$). There were no significant correlation with tumor size, axillary lymph node status, p53 expression, or c-erbB2 expression ($P>0.05$).

Conclusion: Cyclin D1 expression in estrogen receptor (ER) positive patients was significantly higher than that seen in ER negative patients. There was a negative correlation between cyclin D1 and tumor histologic grade, however it was not statistically significant. Tumor size, axillary lymph node status, p53 expression, and c-erbB2 expression were not correlated with cyclin D1. (*Journal of Korean Breast Cancer Society* 2002;5:1-6)

Key Words: Breast cancer, Cyclin D1, Estrogen receptor
중심 단어: 유방암, Cyclin D1, 에스트로겐 수용체

서 론

Cyclin D1은 세포주기 조절인자 중 하나로서 1991년에 클로닝 되었으며 망막모세포종 유전자(retinoblastoma gene; Rb) 단백질을 인산화시켜 세포주기상 G1 상태가 S 상으로 이행되는 과정을 촉진하는 것으로 밝혀져 있다. Cyclin D1은 인간의 유방암 종양세포에서 약 20%의 유전자 증폭(amplification)과 약 50% 이상의 단백질 과발현이 관찰되고 있다. 이러한 Cyclin D1의 과발현은 에스트로겐 수용체의 양성 발현과 관련이 있으며 종양의 조직학적 등급과는 역상관 관계가 있다고 보고되고 있으며 기타 임상병리학적 인자들과의 관련성을 규명하기 위한 연구들이 있어왔다. 저자 등은 cyclin D1의 과발현과 에스트로겐 수용체 양성률 및 기타 조직병리학적 인자들과의 관련성을 규명하기 위해 본 연구를 진행하였다.

방 법

1) 대상 환자

본 연구는 1989년 3월부터 1994년 12월까지 한림대학교

책임저자 : 박찬흔, 서울시 강동구 길동 445

☎ 134-010, 강동성심병원 일반외과

Tel: 02-2224-2222, 2226, Fax: 02-2224-2570

E-mail: hhh@hallym.or.kr

접수일 : 2001년 11월 9일, 게재승인일 : 2001년 11월 9일

본 논문은 제 53차 대한외과학회 추계통합학술대회에서 구연되었음.

강동성심병원에서 유방암 진단하에 수술을 시행 받은 환자 중 종양의 파라핀 블록 상태가 양호한 85예를 대상으로 하였다. 전체 대상 환자 85예에서 cyclin D1과 에스트로겐 수용체 발현 유무가 조사되었으며, 조직학적 등급(histologic grade)은 47예, p53 발현은 16예, c-erbB2 발현은 17예에서 조사되었다. 대상 환자들의 기타 임상 병리학적 특징은 의무기록지, 수술기록지 및 병리기록지를 조사하였다.

2) 면역조직화학 염색

Microwave enhanced immunohistochemical staining method를 사용하여 cyclin D1에 대한 발현 여부를 조사하였다. 10 nmol/L의 citrate buffer (pH 6.0)에서 20분간(5분×4) microwave oven으로 전처리 한 후 1 : 20으로 희석된 cyclin D1 antibody NCL-Cyclin D1-GM (Novocastra Laboratories Ltd. Newcastle, UK)으로 밤새 처리하였다. 이후 Dako LSAB Kit (Dako carpinteria, CA, USA)를 사용하여 labelled streptavidin-biotin method로 면역조직화학염색을 시행하고 chromogene으로 diaminobenzidine (DAB)을 counterstain으로 light hematoxylin을 이용 발색을 하였다. Negative control은 non-immune serum으로 하였다.

3) 분석

Cyclin D1은 면역조직화학염색에서 분명한 핵염색(nuclear staining)을 보이는 경우를 양성으로 판정하였다. 양

성이면서 50% 미만시 faint (+), 50~75%는 distinct (++), 그 이상은 strong (+++)으로 분류하였다. Cyclin D1 발현 유무에 따른 종양의 크기(T stage), 액와림프절 전이 여부(N stage), 조직학적 등급(histologic grade), p53과 c-erbB2 발현 유무 및 에스트로겐 수용체 발현 유무를 분석하였다.

결 과

1) 종양의 임상병리학적 분포

대상 환자의 연령은 26세부터 79세까지 분포하였고 평균 연령은 49.5이었다. 종양의 임상병리학적 특징은 Table 1에 요약하였다. 종양의 크기는 T1이 29예(34.1%), T2가 40예(47.1%), T3가 12예(14.1%), T4가 4예(4.7%)였고, 액와림프절 전이 여부는 음성 25예(29.4%), 양성 60예(70.6%)이었다(Table 1). AJCC 분류에 의한 임상병기의 분포는 병기 I, 22예(25.9%); 병기 IIA, 34예(40%); IIB, 14예(16.5%); IIIA, 10예(11.8%); IIIB, 4예(4.7%); IV, 1예(1.2%)의 분포를 보였다(Table 1). 종양의 조직학적 등급은 대상환자 중 47예에서 조사되었으며 등급 I이 5예(10.6%), 등급 II가 28예(59.6%), 등급 III가 14예(29.8%)이었다(Table 1). 기타 p53 발현은 16예에서, c-erbB2 발현은 17예에서 각각 조사되었으며 발현 정도에 따라 음성, faint (+), distinct (++), strong (+++)으로 분류하였고 결과는 Table 1에 요약하였다. 에스트로겐 수용체 발현 여부는 전 환자를 대상으로

Table 1. Details of general clinicopathologic characteristics

	n	%		n	%
Tumor size (n=85)			HG (n=47)		
T1	29	34.1	I	5	10.6
T2	40	47.1	II	28	59.6
T3	12	14.1	III	14	29.8
T4	4	4.7			
Axillary LN (n=85)			p53 (n=16)		
Negative	60	70.6	Negative	10	62.5
Positive	25	29.4	Faint (+)	4	25.0
			Distinct (++)	1	6.3
			Strong (+++)	1	6.3
TNM stage by AJCC (n=85)			c-erbB2 (n=17)		
I	22	25.9	Negative	1	5.9
IIA	34	40.0	Faint (+)	3	17.6
IIB	14	16.5	Distinct (++)	0	-
IIIA	10	11.8	Strong (+++)	13	76.5
IIIB	4	4.7			
IV	1	1.2			

LN = lymph node; AJCC = american joint committee on cancer; HG = histologic grade.

로 시행되었고 음성 46예(54.1%), faint (+) 11예(12.9%), distinct (++) 5예(5.9%), strong (+++) 23예(27.1%)로 전체 양성 발현율은 45.9%였다(Table 2).

2) Cyclin D1 발현을 분포

Cyclin D1 발현율은 음성이 48예(56.5%)였고, 양성이 37예(43.5%)로 나타났으며 양성 발현을 보인 종양은 각각 faint (+) 20예(23.5%), distinct (++) 9예(10.6%), strong (+++) 8예(9.4%)의 분포를 보였다(Table 2).

Table 2. Expressions of cyclin D1 and estrogen receptor

Cyclin D1 (n=85)	n	%
Negative	48	56.5
Faint (+)	20	23.5
Distinct (++)	9	10.6
Strong (+++)	8	9.4

Estrogen receptor (n=85)	n	%
Negative	46	54.1
Faint (+)	11	12.6
Distinct (++)	5	5.9
Strong (+++)	23	27.1

Table 3. Association between cyclin D1 expression and clinicopathologic parameters

Variables	Grouping	Cyclin D1		p value
		Negative (%)	Positive (%)	
Tumor size	T1	37.5	29.7	> 0.05
	T2	45.8	48.6	
	T3	12.5	16.2	
	T4	4.2	5.4	
Axillary LN	Negative	70.8	70.3	> 0.05
	Positive	29.2	29.4	
HG	I	-	20.8	0.067
	II	65.2	54.2	
	III	34.8	25.0	
p53	Negative	62.5	75.0	> 0.05
	Positive	34.8	25.0	
c-erbB2	Negative	12.5	-	> 0.05
	Positive	87.5	100	
ER	Negative	63.0	37.0	> 0.05
	Positive	48.7	51.3	

LN = lymph node; HG = histologic grade; ER = estrogen receptor.

3) Cyclin D1 발현에 따른 에스트로겐 수용체 및 임상 병리학적 인자들과의 관련성 분석

Cyclin D1 발현에 따른 에스트로겐 수용체 발현 여부 및 임상병리학적 인자들과의 관련성 여부를 분석하였다. Cyclin D1 발현과 종양의 크기, 액와림프절 전이 여부, p53 발현율 및 c-erbB2의 발현 여부는 관련이 없었다($P > 0.05$)(Table 3). Cyclin D1 발현과 조직학적 등급과의 관련 여부를 분석한 결과 cyclin D1 음성인 종양에서 조직학적 등급 I이 0%, II가 65.2%, III가 34.8%였고, cyclin D1이 양성인 경우에는 조직학적 등급 I이 20.8%, II가 54.2%, III가 25.9%로 cyclin D1 양성발현과 좋은 조직학적 등급과 관련 있는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다($p=0.067$)(Table 3).

Cyclin D1 발현 정도에 따른 에스트로겐 수용체 양성률을 보면 cyclin D1 음성시 39.6%, faint (+)시 50.0%, distinct (++)시 55.6%, strong (+++)시 62.5%로 증가하여 (Fig. 1) cyclin D1 발현과 에스트로겐 수용체 발현과 관련이 있으나 통계적 유의성 검정에는 실패하였다($P > 0.05$).

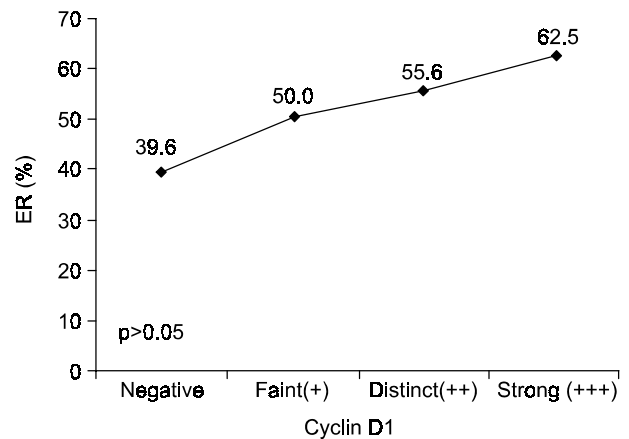


Fig. 1. Estrogen receptor status according to intensity of cyclin D1 positivity (ER = estrogen receptor).

Table 4. Relation between estrogen receptor status and cyclin D1 expression over than distinct (++) (negative, faint versus distinct, strong)

ER	Cyclin D1				p value
	Negative		Positive		
	n	%	n	%	
Negative	50	73.5	7	41.2	0.019
Positive	18	26.5	10	58.8	

ER = estrogen receptor.

(Table 3). 한편 cyclin D1의 양성 기준을 중등도, 즉 distinct (++) 이상으로 재분류하여 에스트로겐 수용체 양성률과의 관계를 분석한 결과 cyclin D1이 높게 발현될수록 에스트로겐 수용체 발현이 유의하게 증가하였다($p=0.019$) (Table 4).

고 찰

앞서 기술하였던 바와 같이 cyclin D1은 여러 암의 발달과 진행에 있어서 중요한 세포 주기 조절 단백질이다. 특히 유방암에서 cyclin D1의 과표현(overexpression)은 중요한 의미를 가지며 예후인자로서의 중요성 및 다른 예후인자들과의 관련성에 대한 여러 주장들이 보고되었다. Cyclin D1의 과표현과 ER 양성도와 관련하여 Takano 등(1)은 117명의 유방암 환자를 대상으로 cyclin D1과 cdk 4에 대해서 면역 조직 화학 염색(Immunohistochemistry)과 PCR (polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 과표현(overexpression) 정도를 분석하였는데 환자의 31.6%에서 cyclin D1이 과표현되었고, (2) cyclin D1과 cdk 4, ER 양성도와 의미 있는 상관관계를 보였으며 cdk 4와 ER 양성도와는 연관성이 없었다고 보고하였다. 이 연구에서 cyclin D1 과표현과 다른 예후인자와는 관련성이 없었으며 cyclin D1과 cdk 4의 과표현은 모두 예후와는 관계가 없었다. 그리고 그들은 유방암의 20~80% 정도에서 cyclin D1이 과표현 된다고 하였으며 이러한 차이는 면역 조직 화학에 사용된 항체의 종류와 평가 기준의 차이 때문일 것이라 하였다.

Barbareschi 등(3)의 보고에 의하면 64명의 유방암 환자 중 24%에서 cyclin D1의 유전자 증폭이 나타났고, 면역 조직 화학 염색을 통한 과표현은 환자의 50%에서 나타났다. 이러한 유전자 증폭과 단백질 과표현과의 불일치는 cyclin D1 단백질의 과표현이 유전자 증폭 뿐만 아니라 다른 기전에 의한 것이며 ER의 양성 반응과 관련이 있을 것이라고 보고하였다. 즉, 높은 ER 양성도가 높은 cyclin D1의 농도를 유지하면서 상호 작용하는 것이라 하였다. Dickson 등(4)은 유방암의 약 15%에서 cyclin D1 유전자 증폭이 일어났고 약 40%에서 cyclin D1 단백질의 과표현이 나타났다고 보고하였다.(5)

한편 cyclin D1 단백질의 과표현과 ER 양성도가 연관성이 없다고 보고한 문헌도 있는데 Frierson 등(6)은 55명의 침윤성 관암 환자에서 35%의 cyclin D1 과표현과 15%의 유전자 증폭을 보고하였고 다른 예후인자들인 환자의 연령, 액와 임파절 상태, ER/PR 양성 여부, 조직학적 등급(Histologic Grade)과는 연관성이 없었으며 종양의 크기(T)와 연관성이 있다고 보고하였다. 즉, 종양의 크기가 2 cm 미만인 15명의 종양 중 14명은 cyclin D1에 대한 면역 조직 화학 반응이 음성인 반면, 4 cm 이상인 12명의 종양 중 7명은 양성 반응을 나타내었다.

Cyclin D1과 조직학적 형태와의 관련성에 대해서 van Diest 등(7)은 148명의 침습성 유방암 환자를 장기간 추적 관찰하였고 그 결과 조직학적 등급과 mitotic indices (mean nuclear area, mean nuclear volume, mitotic activity)와는 음성적 연관성(negative correlation)을 보였으며 ER과는 양성적 연관성(positive correlation)을 나타냄을 확인하였다. 특히 조직학적 형태(histologic type)와 강한 연관성을 나타냈는데 소엽암종(lobular type)에서 많은 빈도의 과표현을 보였다. 결과적으로 cyclin D1의 과표현은 조직학적 등급이 낮은 분화가 좋은 소엽암종(well-differentiated, lobular type)에서 빈도가 높았으며 ER 양성도와 강한 연관성을 가졌고 액와임프절이나 종양의 크기와는 관계가 없었다.(8) 그리고 예후적 중요성도 없다고 보고하였다. Oyama 등(9)도 침윤성 소엽암종의 80% 정도에서 cyclin D1의 과표현을 보였으며 유전자 증폭이 과표현의 원인이 되지 못하고 ki 67 표현과도 연관성이 없다고 보고하였다.(10)

박 등(11)이 보고한 문헌에서는 조직 절편 검체가 아닌 세침 흡입 검체를 이용해서 cyclin D1의 표현을 분석하였는데, 조직 절편 검체 결과와의 일치성은 75% 정도였고 51명 중 37명(72.5%)에서 cyclin D1 면역 양성 반응을 보였다. 또한 호르몬 수용체 양성도와 의미 있는 연관성이 있었고 중등도 이하의 핵등급(low or intermediate nuclear grade) 종양에서 80% 이상, 에스상 분획(S phase fraction)이 15% 이하에서 cyclin D1 표현이 높게 나타났음을 확인하였다. 즉, cyclin D1의 표현이 종양 세포의 증식 지표들과 역상관 관계가 있음을 확인하였다. McIntosh 등(12)은 새로운 단클론 항체(monoclonal Ab)로 93명의 유방암 환자에서 면역 조직 화학 분석을 하였는데 28%에서 cyclin D1의 표현이 촉진되었고 cyclin D1과 EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)나 pRb (Retinoblastoma protein)과 같이 표현될 경우가 cyclin D1만 표현되는 종양보다 예후가 나쁘다고 보고하였다. Zhang 등(13)은 새로운 anticyclin D Ab를 통해서 43명의 환자 중 35명(81.3%)의 유방암 환자에서 cyclin D1/PRAD1 유전자의 과표현이 나타났으며 유전자 증폭은 Southern analysis에 의한 분석으로 환자의 17%에서 보였음을 보고하였다. 또 덜 분화된(high grade) 종양에서 더 강도 높은 핵염색을 확인하였고 비종양성 상피 조직에서는 염색되지 않는 것으로 보아 종양 표식자(tumor marker)로서 cyclin D1/PRAD1이 유용할 것이라 보고하였다.

이외에도 관상피내암(ductal carcinoma in situ)에서의 cyclin D1 단백질의 과표현에 대해 연구한 문헌들이 있는데, Umekita 등(14)은 관상피내암 57명의 환자 중 41명(72%)에서, PIC(predominantly intraductal carcinoma) 44명 중 22명(50%), 침윤성관암(invasive ductal carcinoma) 92명 중 40명(43%)에서 cyclin D1의 과표현을 보고하였고 비정형성 과형성(ADH, atypical ductal hyperplasia)나 UDH (usual ductal

hyperplasia)에서는 cyclin D1의 표현이 나타나지 않았음을 보고하였다. 그리고 관상피내암에서 조직학적 등급과 에스트로겐 수용체와는 의미 있는 상관 관계가 없다고 하였다. 결과적으로 cyclin D1의 과표현은 암 발병 초기 단계에서 중요한 역할을 하며 저 등급의 관상피내암(low-grade DCIS)과 비정형성 과형성(ADH)을 감별하는데 도움이 될 것이라 보고하였다.(15) 또, Gillett 등(16)도 관상피내암 36명 중 23명(64%)에서 cyclin D1이 과표현되었고 침습성 암과는 달리 조직학적 분화도나 에스트로겐 수용체 표현과는 연관성이 없음을 보고하였다. 비정형성 과형성 9명 중 1명에서만 cyclin D1의 과표현이 확인되었는데, 이 또한 cyclin D1의 과표현은 암 발병 초기에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. Vos 등(17)의 문헌에서도 관상피내암에서 cyclin D1의 과표현에 대한 비슷한 결과를 보고하였다.(18)

Cyclin D1과 p53 표현과의 연관성에 대해서는 Michalides 등(19)과 Bukholm 등(20)이 연구하였는데 cyclin D1과 표현이 wild type p53 종양과 연관성이 있으며 cyclin D1 유전자 증폭과 p53의 표현과는 연관성이 없다고 하였다. (21) 그리고 이전에 보고된 바와 같이 분화가 좋지 않은 조직학적 등급(undifferentiated histology)과 에스트로겐 수용체 음성과는 p53이 연관성이 있다고 하였다.

Cyclin D1의 예후적 중요성에 대하여 Pelosio 등(22)은 액와임프절 양성이고 수술 후 보조적 치료를 받은 180명의 유방암 환자를 장기간 추적 관찰하여 CDS-6 monoclonal Ab로 면역 조직 화학 검사를 시행하였는데 70.1%에서 cyclin D1 핵염색을 확인하였고 호르몬 수용체 모두와 의미 있는 연관성을 확인하였다. 그리고 이러한 cyclin D1 핵염색 양성도가 6년간의 재발 없는 생존율(relapse-free survival, RFS)의 향상과 연관성이 있으나 총 생존율(overall survival, OS)과는 무관하다고 보고하였다. 즉, 무병생존율에 있어서는 cyclin D1의 표현이 액와임프절 수, 종양의 크기와 더불어 중요한 예후인자이나 총 생존율에서는 액와임프절 수만이 예후적 인자로 중요하다고 하였다.

또, Gillett 등(23)이 345명의 유방암 환자를 대상으로 한 연구 결과 50%에서 cyclin D1의 과표현을 나타냈고 중등도 이상의 염색 강도를 가진 종양이 양성/음성 염색의 종양보다 무병생존율과 총 생존율이 더 좋은 것으로 보고하였다. 반대로 염색 음성이면서 ER 음성은 더욱 좋지 않은 예후를 나타냈고 이는 cyclin D1이 비정상적으로 낮은 경우에 pRb 같은 다른 유전자의 지속적인 돌연변이가 있으며, 이러한 것이 생존율에 중요하다고 보고하였다.

결 론

Cyclin D1의 과표현과 에스트로겐 수용체 양성률과는 의미 있는 연관성이 있으며 반대로 종양 세포의 조직학적 등급과는 역상관 관계를 보인다. 그러나 cyclin D1의 과표

현이 원발 종양의 크기나 액와림프절 전이여부 등과는 관련이 없는 것으로 사료된다. Cyclin D1의 예후인자적 가치에 대해서는 여러 이론이 있으며 결론을 내리기는 어렵다. 저자 등은 유방암에서 cyclin D1의 과표현이 갖는 임상적, 조직학적 분석을 통하여 기존의 보고들과 유사한 결과를 확인할 수 있었으며 향후 보다 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

REFERENCES

- 1) Takano Y, Takenaka H, Kato Y, Masuda M, Mikami T, Saegusa M, et al. Cyclin D1 overexpression in invasive breast cancers: correlation with cyclin-dependent kinase 4 and oestrogen receptor overexpression, and lack of correlation with mitotic activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:505-12.
- 2) Zukerberg LR, Yang WJ, Gadd M, Thor AD, Koerner FC, Schmidt EV, 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* 1995;8:560-7.
- 3) Barbareschi M, Pelosio P, Caffo O, Buttitta F, Pellegrini S, Barbazza R, et al. Cyclin-D1-gene amplification and expression in breast carcinoma: relation with clinicopathologic characteristics and with retinoblastoma gene product, p53 and p21WAF1 immunohistochemical expression. *Int J Cancer* 1997;74:171-4.
- 4) Dickson C, Fantl V, Gillett C, Brookes S, Bartek J, Smith R, et al. Amplification of chromosome band 11q13 and a role for cyclin D1 in human breast cancer. *Cancer Lett* 1995;90:43-50.
- 5) Zhu XL, Hartwick W, Rohan T, Kandel R. Cyclin D1 gene amplification and protein expression in benign breast disease and breast carcinoma. *Mod Pathol* 1998;11:1082-8.
- 6) Frierson HF Jr, Gaffey MJ, Zukerberg LR, Arnold A, Williams ME. Immunohistochemical detection and gene amplification of cyclin D1 in mammary infiltrating ductal carcinoma. *Mod Pathol* 1996;9:725-30.
- 7) 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.
- 8) Barnes DM. Cyclin D1 in mammary carcinoma. *J Pathol* 1997; 181:267-9.
- 9) Oyama T, Kashiwabara K, Yoshimoto K, Arnold A, Koerner F. Frequent overexpression of the cyclin D1 oncogene in invasive lobular carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1998;58: 2876-80.
- 10) Shoker BS, Jarvis C, Davies MP, Iqbal M, Sibson DR, Sloane JP. Immunodetectable cyclin D(1) is associated with oestrogen receptor but not Ki67 in normal, cancerous and precancerous breast lesions. *Br J Cancer* 2001;84:1064-9.
- 11) Park K, Han S, Kim HY, Ko I. Cytologic evaluation of cyclin

- D1 expression in primary breast carcinoma. *Cancer* 2001; 93:211-5.
- 12) McIntosh GG, Anderson JJ, Milton I, Steward M, Parr AH, Thomas MD, et al. Determination of the prognostic value of cyclin D1 overexpression in breast cancer. *Oncogene* 1995;11: 885-91.
- 13) Zhang SY, Caamano J, Cooper F, Guo X, Klein-Szanto AJ. Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1994;102:695-8.
- 14) Umekita Y, Yoshida H. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma in situ, atypical ductal hyperplasia and usual ductal hyperplasia: an immunohistochemical study. *Pathol Int* 2000; 50:527-30.
- 15) Bartkova J, Lukas J, Muller H, Luthoft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994;57:353-61.
- 16) Gillett CE, Lee AH, Millis RR, Barnes DM. Cyclin D1 and associated proteins in mammary ductal carcinoma in situ and atypical ductal hyperplasia. *J Pathol* 1998;184:396-400.
- 17) Vos CB, Ter Haar NT, Peterse JL, Cornelisse CJ, van de Vijver MJ. Cyclin D1 gene amplification and overexpression are present in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 1999; 187:279-84.
- 18) Alle KM, Henshall SM, Field AS, Sutherland RL. Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 1998;4:847-54.
- 19) Michalides R, Hageman P, van Tinteren H, Houben L, Wientjens E, Klompmaaker R, 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* 1996;73:728-34.
- 20) Bukholm IK, Berner JM, Nesland JM, Borresen-Dale AL. Expression of cyclin Ds in relation to p53 status in human breast carcinomas. *Virchows Arch* 1998;433:223-8.
- 21) Dublin EA, Patel NK, Gillett CE, Smith P, Peters G, Barnes DM. Retinoblastoma and p16 proteins in mammary carcinoma: their relationship to cyclin D1 and histopathological parameters. *Int J Cancer* 1998;79:71-5.
- 22) Pelosio P, Barbareschi M, Bonoldi E, Marchetti A, Verderio P, Caffo O, et al. Clinical significance of cyclin D1 expression in patients with node-positive breast carcinoma treated with adjuvant therapy. *Ann Oncol* 1996;7:695-703.
- 23) Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, et al. Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 1996;69:92-9.
-