

## 유방암에서 호르몬 수용체, PCNA, AgNOR 및 조직학적 소견간의 비교연구\*

계명대학교 의과대학 병리학교실

장은숙·박관규

### A Comparative Study of PCNA Immunostaining, AgNOR Scores Hormone Receptors and Histology in Human Breast Cancer

Eun Sook Chang, M.D. and Kwan Kyu Park, M.D.

Department of Pathology, Keimyung University School of Medicine

This study was performed on 50 cases of primary breast cancer removed surgically during the period 1990~1991 and compared the results of four morphologic methods developed for the detection of estrogen receptors, progesterone receptors, monoclonal antibody PCNA immunoreactivity, and the mean number of argyrophilic nucleolar organizer regions(mAgNORs) to ascertain the prognostic significance and also to detect highly malignant heterogenous cancer. To determine the validity of these measurements, a variance analysis was done with Kruskal-Wallis 1-way ANOVA. The results showed that the significant correlation between histologic grade and ER/PR status( $P=0.005/P=0.015$ ), the borderline significant correlation between mAgNORs and ER/PR status( $P=0.08$ ), and between AgNORs and stage( $P=0.07$ ), PCNA has no correlation with ER/PR status( $P=0.25$ ), clinical stage and histologic grade.

In follow up, four cases of invasive ductal carcinoma with ER/PR, developed early and rapid metastasis within 2 years, three of them were classified as histologic grade 3 and another case was grade 2, whereas two of them were classified as stage III(+) and the rest were in stage IIB(+) and stage IIA(-). The mAgNOR count of these four cases were ranged from 3.32 to 4.29 which were in the aneuploid category most likely. One of them had rather stormy rapid course with multiple organ metastases resulting death within one year.

These results indicated that ductal carcinoma(>2 cm size) with ER-/PR- and high mAgNOR level or high PCNA grade, and high histologic grade had a highly malignant course, marked by rapidly developing metastases. Thus we concluded that the status of ER/PR alone in tumor tissue is an important information for selecting hormone treatment but, for the ultimate prognosis, is a weak indicator. Therefore for early detection of such heterogenous tumor, besides ER/PR, AgNORs or PCNA, histologic grade and tumor size are very useful as biological indicators of prognosis.

The status ER/PR in combination with these indicators are more accurate and provide better basis on which to base a decision for early implementation of chemotherapy from which to give probably benefit by inhibition of rapid progress. (**Korean J Pathol 1993; 27: 605~617**)

**Key Words:** Breast cancer, ER, PR, AgNOR, PCNA

접 수: 1993년 2월 6일, 게재승인: 1993년 7월 20일  
주 소: 대구시 중구 동산동 194번지, 우편번호 700-310  
계명대학교 의과대학 병리학교실, 장은숙

\*이 논문은 1991년도 계명대학교 비사 교수 연구비로 이루어졌음.

## 서 론

유방암은 생물학적 습성이 매우 다양하고 환자의 자연적 병력 또한 현저하게 다르다. 유방암 환자들 중에서 어떤 환자는 무증상이거나 다른 암과 같이 평균 과정을 취하여 임상경과가 느리고 긴 반면 이와는 대조적으로 특정한 환자들은 암의 성장율이 높고 전이가 빨리 생기며 전격적인 신속한 경과를 취하는 경우가 있다<sup>1,2)</sup>. 지금까지 통상적으로 암 환자의 예후를 예견하는데 임상 및 병리학적 판정기준들을 이용하여 왔다. 임상적 병기는 영상기술의 발달로 많이 개선되어 대단히 정확도가 높아졌으나<sup>3)</sup> 병리학적 병기가 아직도 정확하며, 여기에는 종양의 크기, 림프질의 전이 상태 등이 중요하다. 또 조직학적 세포형은 그 형에 따라서 그 악성도를 저, 중 및 고등급으로 나누는데 여기에는 세포의 분화도와 핵 모양이 가장 중요하다<sup>4-7)</sup>. 실제로 조직학적으로 악성도의 등급이 동일한 유방암들 간에서 상기한 바와 같이 임상증상과 병의 경과가 현저히 다른 종양의 이질성이 있어 이 원인을 규명하고자 여러가지 연구가 시도 되어왔다.

에스트로젠 수용체(ER) 및 프로게스테론 수용체(PR)의 유무를 측정하는 것이 또 하나의 유방암의 특성을 판정하는 기준 척도로서 이미 예후판정 및 호르몬 치료대상 선별에 유용하게 사용됨은 주지의 사실이다<sup>8-14)</sup>. 에스트로젠과 프로게스테론은 다른 스테로이드 호르몬들과 같이 세포내에 들어가서 거기의 특수 수용체 단백질과 결합한다. 그 결과 형성된 에스트로젠 수용체 복합체는 여러가지 유전자의 전사가 시작되는 regulatory DNA regions과 연결되고 여기서 일어나는 여러 단백질의 생성은 DNA 합성과 세포성장을 조절하는데 관여한다<sup>15)</sup>. 에스트로젠은 2차 전령(second messengers)으로서 성장인자들을 통해 종양 증식을 자극한다<sup>16)</sup>. 프로게스테론은 세포의 분화에 관여한다. 프로게스테론 합성은 에스트로젠의 자극에 의존하며 프로게스테론 측정은 표적세포에 대한 에스테로젠 기능의 한 표식자로 사용할 수 있다. 최근에 면역세포화학적 검사(ICA) 방법의 개발로 ER과 PR이 각각 한 종양내에서 양성과 음성이 공존하는 종양 이질성이 명백하여졌다.

종양세포의 증식력은 또 하나의 생물학적 특성으로서 이는 또 다른 부가적 예후 판정 척도로 사용할 수 있다고 생각된다. 유방암의 증식력은 여러가지 방법으로 측정을 시도하여왔다. Thymidine labeling index<sup>17)</sup>, 유세포 측정법(flow cytometry)<sup>18-20)</sup>, image DNA analysis system<sup>21)</sup> 등이 있고 그중에서 면역조직학적 방법으로 monoclonal antibody인 proliferating cell nuclear antigen(PCNA)을 감지하는 새로운 방법은 통상 고정 조직으로도 가능하고<sup>22-24)</sup> 또 다른 한가지는 간단하면서도 유용한 일단계

염색방법이다. 이는 nucleolar organizer region (NOR)에 관련된 단백질의 은기호성을 이용해서 염색을 하여 나타나는 AgNOR(argyrophilic NOR)가 세포의 활동성을 암시함을 활용한 것이다<sup>25)</sup>. 즉 악성 종양의 악성도에 따라 AgNOR의 수가 증가하고, 그 모양이 불규칙해지고 또 그 크기가 증가한다<sup>25-29)</sup>.

PCNA의 발현과 AgNOR의 수와 모양, 그리고 크기가 유방암의 증식력을 시사한다고 생각되어 이들을 이용하여 ER과 PR, 조직학적 등급 및 종양형, 그리고 임상병기 등과 전반적인 상호관계를 비교 연구하여 예후인자들간의 상호 호환성 관계를 알아보고 또 특별히 고도의 악성 유방암 규명에 어느 예후인자가 유용한지 비교 판별하여 통상 예들과 달리 신속한 진행경과를 취하는 고도의 악성 유방암을 조기에 색출하는데 기여하고자 이 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 연구재료

1990년 12월부터 1991년 12월까지 13개월간 계명대학교 동산병원 병리과에서 검색된 외과적 절제된 원발성 유방암 중에서 50예를 선택하여 대상으로 하였다.

### 2. 연구방법

1) **임상기록 재검토:** 연구대상 환자들의 임상기록과 병리진단지 등을 재검토하여 성별, 연령, 임상적 병기 및 수술후의 병의 진행과정(전이여부), 치료방법(수술 외의 항암화학요법 및 방사선 치료의 여부) 및 생존기간을 추적 조사하였다.

2) **병리조직학적 검색:** 절제된 유방 검체를 통상 검색 방법으로 검사하고 특히 종양의 크기, 전이된 액와 림프질의 유무 및 수에 유념하였고 10% 포르말린에 고정 후 통상 H&E염색하고 한편 절제된 조직 중에서 암조직 일부는 즉시 -70°C에 급냉동 보관하여 1주 이내에 ER 및 PR검색을 하였다. 조직학적 등급은 Bloom과 Richardson<sup>30)</sup> 기준에 준하여 하였다.

① 세관형성의 결여로 가능하는 역분화(dedifferentiation)의 정도

② 핵의 크기, 모양 및 염색성의 변화

③ 과염색성과 유사분열의 빈도를 경, 중, 강의 정도로 구분하여 총점수가 3에서 9까지 산출되도록 하고 3, 4, 5는 1등급(저악성), 6, 7은 2등급(중간악성), 8, 9는 3등급(고악성)으로 구분하였다.

수양암은 조직학적 등급에서 예외적이다. 왜냐하면 분화가 나쁜 핵을 가진 수양암은 그 종양세포의 생물학적 습성이 상반되기 때문이다.

3) **면역세포화학적 검색(Immunocytochemical Assay, ICA):** 급 냉동시킨 유방암 조직을 4~6 μm 두께로 동결절편하여 ER은 ICA kit(Abbott Labo-

ratories)를 사용하였고 PR(BioGenex Laboratories)은 ABC kit(Lipshaw)를 사용하여 시행하였다.

**(1) Estrogen receptor(ER) 측정;** 동결절편을 즉시 10분동안 formaldehyde-phosphate buffered 식염수에 고정시킨 후 phosphate buffered saline (PBS)에 다시 씻은 뒤 냉 메타놀과 냉 아세톤에 각각 5분과 3분 동안 고정시켰다. PBS에 철저히 씻은 후 kit blocking agent와 함께 15분동안 moist chamber에 incubation하였다. Primary antibody를 30분 동안 반응시키고 다시 secondary antibody로 30분 반응, incubation시킨 후 PAP complex(peroxidase antiperoxidase)속에서 30분 incubation시켰다. 각각의 antibody에 반응시킨 후 PBS에 씻었다. 6분 동안 발색시약인 chromogen substrate solution속에 절편을 incubation 함으로서 반응을 유발시켰다. 그 다음 증류수에 씻은 후 alum haematoxylin으로 간단히 대조염색한 후 탈수시키고 cover glass로 mount 후 현미경으로 관찰하였다.

**(2) Progesterone receptor(PR) 측정;** ER 측정과 비슷하나 고정액으로 10% neutral buffered formalin을 사용하고, blocking reagent로 protein blocking agent를 사용하여 secondary antibody를 가한 후 peroxidase reagent를 가하고 chromogen substrate로 AEC를 사용하였다.

**판정:** 광학현미경으로 400배 배율에서 암세포 핵이 갈색으로 염색되면 ER 및 PR 양성으로 판정하였고, 염색정도가 아주 희미하면 ±, 보통이면 1+, 강하면 2+로 표시하고 임의로 대표적인 부위에서 선택하여 200개 세포를 세어서 양성세포의 백분율을 내어 표시하였고, 1+이상 강도로 염색된 세포가 20%이상이면 양성으로 간주하였다.

**(3) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA);** PCNA의 면역반응을 발현시키기 위해 가장 적합한 파라핀 블록을 골라서 avidin/biotin immunoperoxidase staining system를 사용하여 시행하였다. 유방암 조직 블록을 4µm 두께로 절편하여 슬라이드에 부착시켜 60°C에 1시간 incubation시킨 후 절편을 xylene과 알코올을 사용하여 탈파라핀 및 합수를 시키고 0.1M PBS에 10분 둔 뒤에 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가한 후 PBS에 씻고 protein brocking agent를 가한 후 primary antibody(PCNA; Dakopatts)를 가하여 1시간 incubation시켰다. 계속하여 PBS로 씻은 뒤 secondary antibody를 가하고 다시 PBS로 씻고 peroxidase reagent를 가한 후 PBS로 씻고 chromogen solution(AEC)을 가하여 발색시킨 후 Mayer hematoxylin으로 대조염색을 하고 흐르는 물에 잘 씻은 후 봉입하였다.

**판정:** 광학현미경 100배 배율로 이질성이 있는 경우를 감안하여 임의로 대표적인 8시야를 골라서 400배 배율로 100개이상 종양세포를 세어 그들의 핵이

갈색으로 염색된 세포를 양성으로 간주하고 이 세포들의 100분율을 계산해서 표시하였다. 종양세포의 50% 이상이 양성으로 염색되면 고 PCNA등급(high PCNA grade), 50% 이하이면 저 PCNA등급(low PCNA grade)로 분류하였다<sup>31)</sup>.

**(4) 은염색법;** H&E 염색한 슬라이드들 중에서 가장 적합한 것을 골라 그 파라핀 블록을 사용하여 colloidal silver-stain<sup>32)</sup>하였다. 파라핀 블록을 3µm 두께로 절편하여 xylene으로 탈 파라핀 시킨 후 에탄올과 증류수로 합수시켰다. 슬라이드에 은교질 용액을 도포한 후 빛을 차단하고 뚜껑을 덮어 45분간 반응시킨 후 증류수로 은교질 용액을 철저히 세척하였다. 5% sodium thiosulfate 용액으로 5분간 반응시킨 후 증류수로 다시 수세하고 이어서 계열 에탄올로 탈수한 후 canada balsam으로 봉입하였다.

**판정:** 광학현미경으로 대표적인 시야에서 1000배 배율에서 최소 100개 이상의 세포의 핵에 검은색으로 염색된 AgNOR의 수를 세어 핵당 평균 AgNORs (mAgNORs)의 수로 표시하였다. 그리고 각 종양별로 AgNOR의 모양, 즉 크기 및 불규칙성을 비교하였다.

**(5) 통계학적 분석(Statistical analysis);** 연구 결과 얻어진 성적들을 Kruskal-Wallis 1-way

**Table 1.** Relationship of age to hormone receptors and PCNA

Age(yr)	No(%)	ER +/-	PR +/-	PCNA +/-
20~29	2 (4.0)	1/1	1/1	2/0
30~39	10(20.0)	3/7	2/8	9/1
40~49	13(26.0)	9/4	7/6	9/3
50~59	13(26.0)	10/3	5/8	10/4
60~69	9(18.0)	1/8	1/8	7/2
70~79	3(6.0)	1/2	0/3	3/0
	(n=50)	25/25 +50%	16/34 +32%	40/10

**Table 2.** Classification according to tumor size and lymph node status

Stage	Size(cm)	Node status	No(%)
I	<2	negative	2 (4)
IIA	2~5	negative	12(24)
	<2	positive	3 (6)
IIB	>5	negative	7(14)
	2~5	positive	19(38)
III	>5	positive	7(14)

ANOVA<sup>33)</sup>로 분석하고 평균 AgNOR치 및 PCNA치와 ER, PR상태와의 관계, 그리고 조직학적 등급 및 병기와의 관계 등을 분석하였다.

## 결 과

### 1. 임상소견

연령 분포는 28세에서 72세로서 평균 49.5세였고 40~50대가 52%로서 과반수를 차지하였다(Table 1). 검색된 50예 전부의 임상기록을 1993년 5월까지 재검사 추적하여 액와 림프절, 그리고 원위 림프절 및 장기 전이와 사망 여부를 추적 조사하였다. 동측 쇄골상 림프절에 전이가 간 경우가 2예, 또 다른 2예에서는 간과 뼈와 뇌에, 그리고 폐에 각각 전이가 1~2년 사이에 발생했고 특히 그 중 한 침윤성 도관암 환자는 6개월 지나서 간과 뼈에, 그리고 뇌에 전이되는 급격한 경과로 진행하여 1년내에 사망하였다. 이상의 원위 전이 및 사망한 4예의 유방암은 모두 ER-/PR-이었고 mAgNOR가 4.32~4.29로 높았다. 병기 I군에 속한 예에서는 재발이 없었다.

### 2. 병리학적 검색

**1) 육안적 소견:** 유방암의 육안적 분류는 종양의 크기(장경)와 액와 림프절의 전이 유무를 기준으로 하여 분류하였다(Table 2). 종양의 크기는 장경이 1.0 cm~13.5 cm로 다양하였고 액와 림프절의 전이는 32개 중에 21개가 전이된 것이 최고이었다. 액와 림프절 전이를 동반한 종양크기가 2~5 cm인 병기(stage) IIB (+)군이 전체의 38%(19예)를 차지하여 가장 많았다.

### 2) 조직학적 소견:

**종양형:** 연구대상 유방암 50예중 39예(78%)가 침윤성 도관암이고 나머지는 특수형이었다.

**종양등급:** 유방암의 조직학적 등급에 따라 분류하니 특수형 중에서 수양암은 전부 등급 3에 분류되었는데 이는 통상예후와 비교하여 예외적이었다(Table 3).

### 3. ER과 PR의 발현 결과

ER 및 PR의 발현과 연령과의 관계는 50대 13예 중 ER+10예(76.92%), 그리고 PR+는 40대 13예중 7예(53.84%)로 양성율이 가장 높았고 반면 ER-/PR-는 60대 9예중에서 8예(88%)로 음성율이 가장 높았다(Table 1). 침윤성 도관암 39예 중 19예(48%)가 ER-/PR-이었고 13예(33%)가 ER+/PR+이었다. 나머지 7예가 ER+/PR-이었다. 조직학적 등급 1에 속한 분화도가 좋은 도관암 10예 중 ER+/PR+ 6예, ER+/PR- 2예로 ER+이 8예(80%)였고 그외 특수형인 유두상암 1예와 혼합소엽도관암 1예는 모두 ER+/PR-이었고 도관상피내암 1예는 ER-/PR-이었다. 1등급에 속한 13예 중에 10예(76.92%)가 ER+이었다. 조직학적 등급 2에 속한 중등도의 분화를 보이는 도관암은 ER+/PR+ 7예, ER+/PR- 5예 그리고 ER-/PR- 7예로서 ER+이 12예(52.3%)였고 그외 특수형인 점액암 1예는 ER-/PR-, 소엽암 3예중 2예는 ER+/PR+이었고 1예는 ER-/PR+였다. 2등급에 속한 23예 중 14예(60.86%)가 ER+이었다. 조직학적 등급 3에 속한 분화도가 나쁜 도관암 10예와 수양암 4예는 모두 ER-/PR-이었다(Table 3). 총괄적으로 ER+ 24

**Table 3.** Classification according to histologic grade\* and ER status

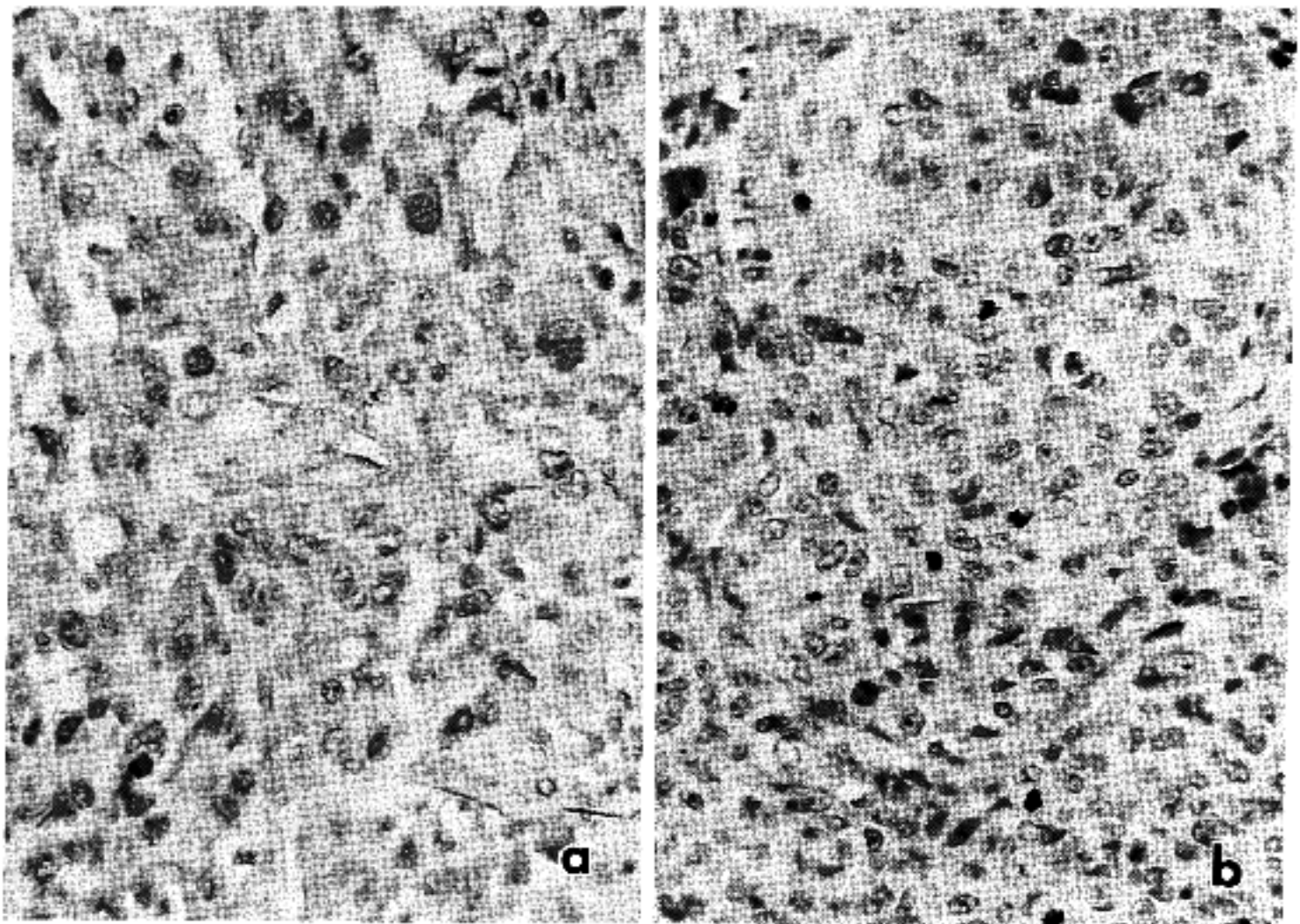
Grade	Histologic type	ER status +/-	ER positive(%)
I	Ductal carcinoma (n=10)	8/2	80
	Intraductal carcinoma (n= 1)	0/1	
	Papillary carcinoma (n= 1)	1/0	
	Mixed lobular and ductal carcinoma (n= 1)	1/0	
	Total (n=13)	10/3	
II	Ductal carcinoma (n=19)	12/7	63.15
	Mucinous carcinoma (n= 1)	0/1	
	Lobular carcinoma (n= 3)	2/1	
	Total (n=23)	14/9	
III	Ductal carcinoma (n=10)	0/10	0
	Medullary carcinoma (n= 4)	0/ 4	
	Total (n=14)	0/14	

\*graded with modified criteria by Bloom and Richardson



**Table 4.** Relationship between histologic type and hormone receptors

	ER +/PR +	ER -/PR -	ER -/PR +	ER +/PR -
Ductal Ca (n=39)	13	7	•	19
Medullary Ca (n=4)	•	•	•	4
Lobular Ca (n=3)	2	•	1	•
Mixed lobular and ductal Ca (n=1)	•	1	•	•
Mucinous Ca (n=1)	•	•	•	1
Papillary Ca (n=1)	•	1	•	•
Intraductal Ca (n=1)	•	•	•	1
<b>Total (n=50)</b>	<b>15</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>25</b>



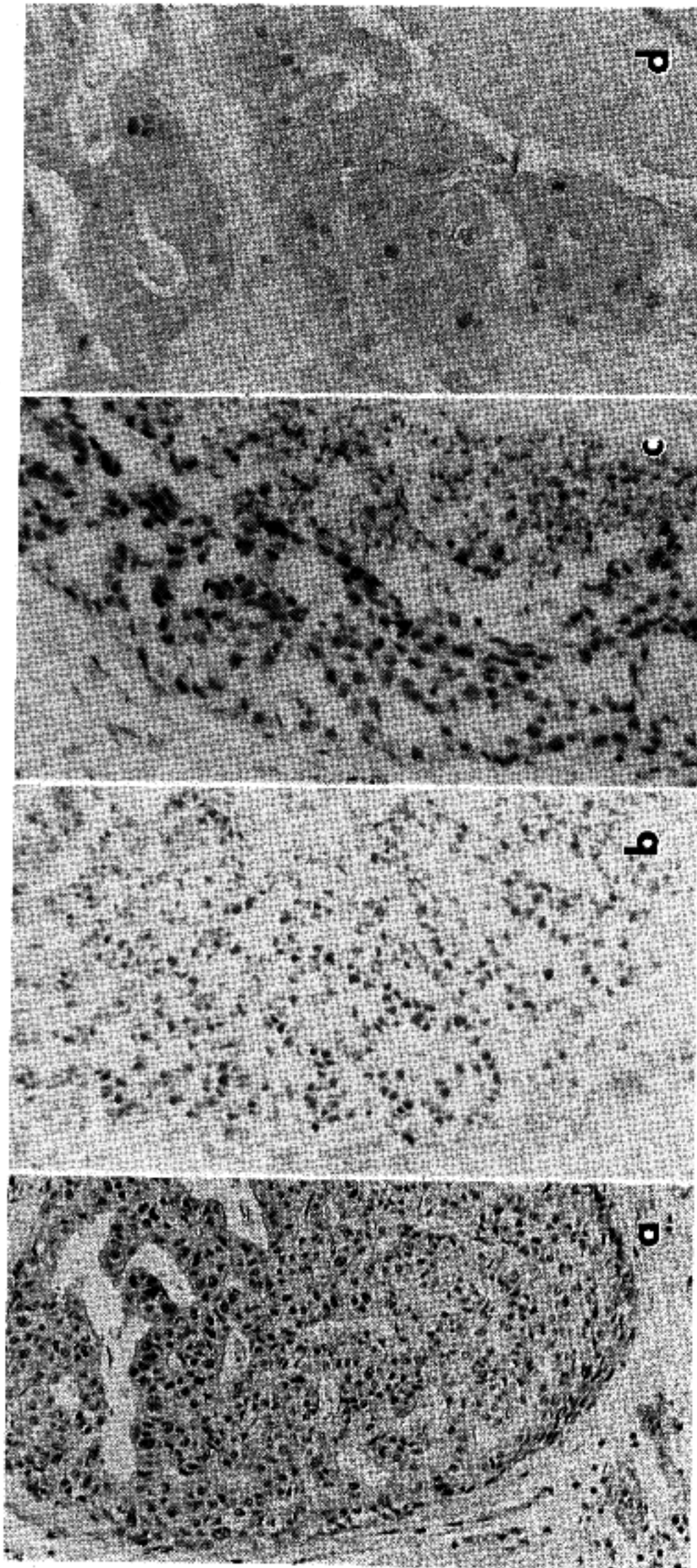
**Fig. 1.** Infiltrating ductal carcinoma in 38-year-old patient, stage IIA without lymph node metastasis, ER -/PR -, histologic grade 3. (a) PCNA immunostaining shows strong positive reaction(85% positive)(ABC with hematoxylin counter stain). (b) Corresponding H&E section shows sheets of tumor cells with marked nuclear variations; coarse chromatin, prominent nucleoli and frequent mitotic figures.

예, ER - 26예, PR + 16예, PR - 34예였다(Table 4).

#### 4. 종양 증식력 측정(Tumor proliferative fraction)

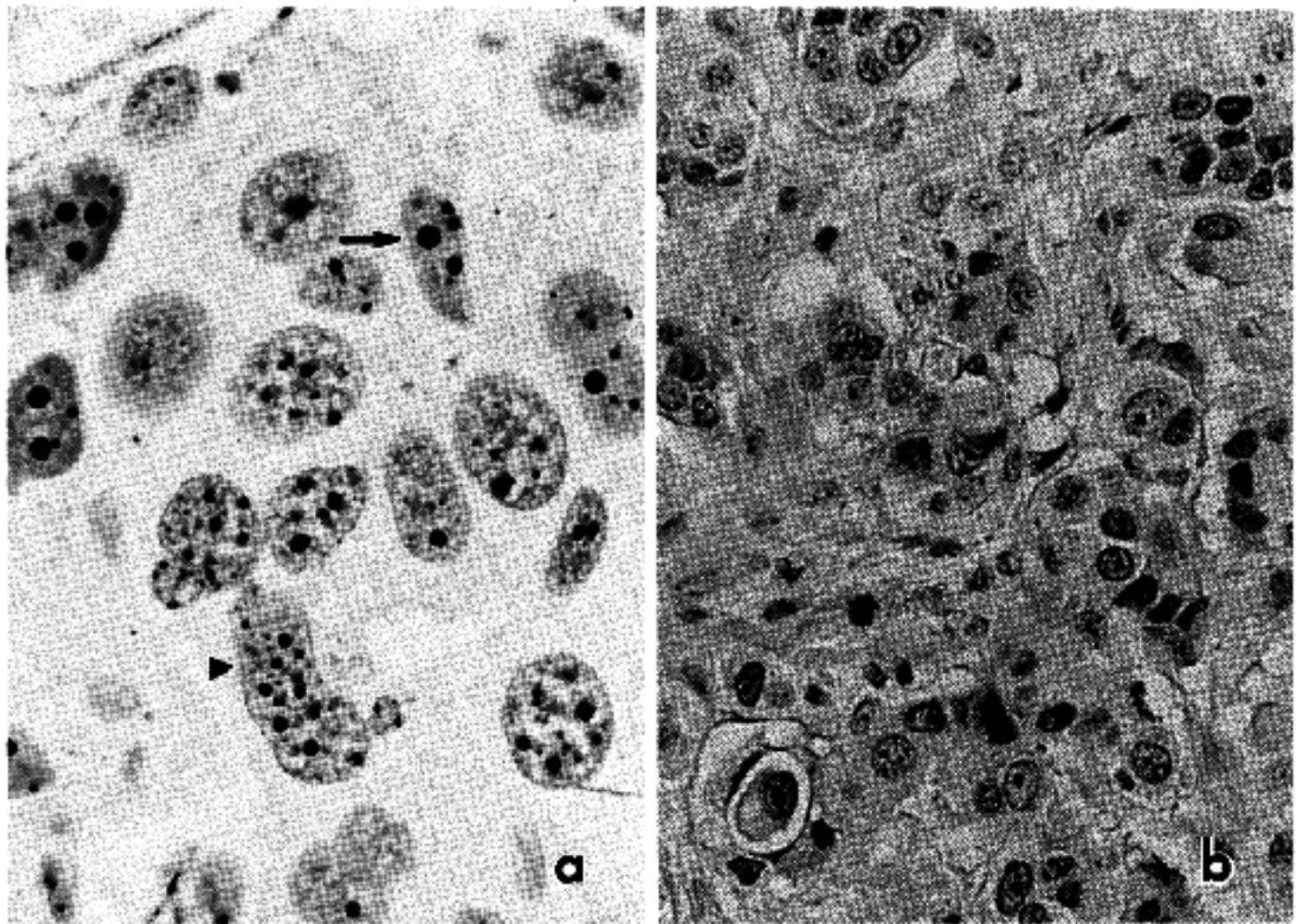
1) PCNA는 검색한 50예중 10예가 음성이고 40예가 양성이었다고 이 중 저PCNA등급은 34예로서 양성

율이 5%~45%(평균 PCNA(mPCNA) 24.4%)였다. 고PCNA등급은 6예로 50%~85%(평균 54.4%)이고 이 중 4예는 모두 ER -/PR -으로 3예의 침윤성 도관암, 1예의 수양암으로 구성되었고, 이들은 모두 조직학적 등급 3으로 분류 되었다. 나머지 2예는 ER +/PR +인 침윤성 도관암 1예와 ER +/PR -인 혼합 소엽도관암이 있었다. 최고 양성율 85%인 예는 병기



**Fig. 2.** Infiltrating ductal carcinoma in 43-year-old patient, stage IIA without lymph node metastasis. ER+/PR+, histologic grade I. (a) Cribriform type with glandular formations(H&E), (b) Immunocytochemical staining of frozen section for estrogen receptor shows strong nuclear positivity, (c) Immunocytochemical staining on frozen section for progesterone receptor shows nuclear positivity of tumor cells, (d) PCNA immunostaining shows scattered nuclei: positivity of tumor cell (22% PCNA positive).





**Fig. 3.** Infiltrating ductal carcinoma in 34-year-old patient, stage III with lymph node metastasis. ER - /PR -, numerous nuclear black dots. Majority of nuclei have more than two AgNORs/nucleus up to ten (arrow head), and large AgNOR (arrow). (b) Corresponding H&E section shows tumor cells with prominent nucleoli, vacuolization of cytoplasm of tumor cells and mitotic figures.

**Table 5.** Relationship of ER and PR, AgNORs and PCNA to stage

Stage	Node Status	ER (+ (-))	PR (+ (-))	AgNOR m ± SD*	PCNA (%) m ± SD*
I	(-)	1 (1)	1 (1)	2.91 ± 0.08	32.5 ± 31.82
IIA	(-)	8 (4)	4 (8)	2.47 ± 0.84	2.29 ± 23.88
	(+)	2 (1)	2 (1)	1.93 ± 0.11	31.7 ± 12.58
IIIB	(-)	3 (4)	2 (5)	2.78 ± 0.53	32.9 ± 20.77
	(+)	8 (11)	5 (14)	2.65 ± 0.95	20.5 ± 20.11
III	(+)	3 (4)	2 (5)	3.29 ± 0.81	20.0 ± 18.86

\*: mean ± standard deviation (-): negative  
(+): positive

IIA(-)의 침윤성 도관암으로 조직학적 등급 3으로 분화도가 낮고 유사 핵분열이 고배율 시야(400×)당 4~8개로 왕성한 증식상을 보였다(Fig. 1). 두번째로 높은 양성률 72%인 예는 병기 IIB(-)의 수양암으로 이상 2예 모두는 ER - /PR - 이었다. 상기한 바와 같이 분화도가 높고 ER + /PR + 인 예(Fig. 2)에서 대체

로 저PCNA 증급이었으나 단 1예는 PCNA 55% 양성율로서 ER + /PR + 인 15예 중 유일하게 고PCNA 등급에 속했다.

2) Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) 수는 정상세포나 양성종양과 비교하여 현저히 증가했고 mAgNORs가 1.18~4.80으로 환자미

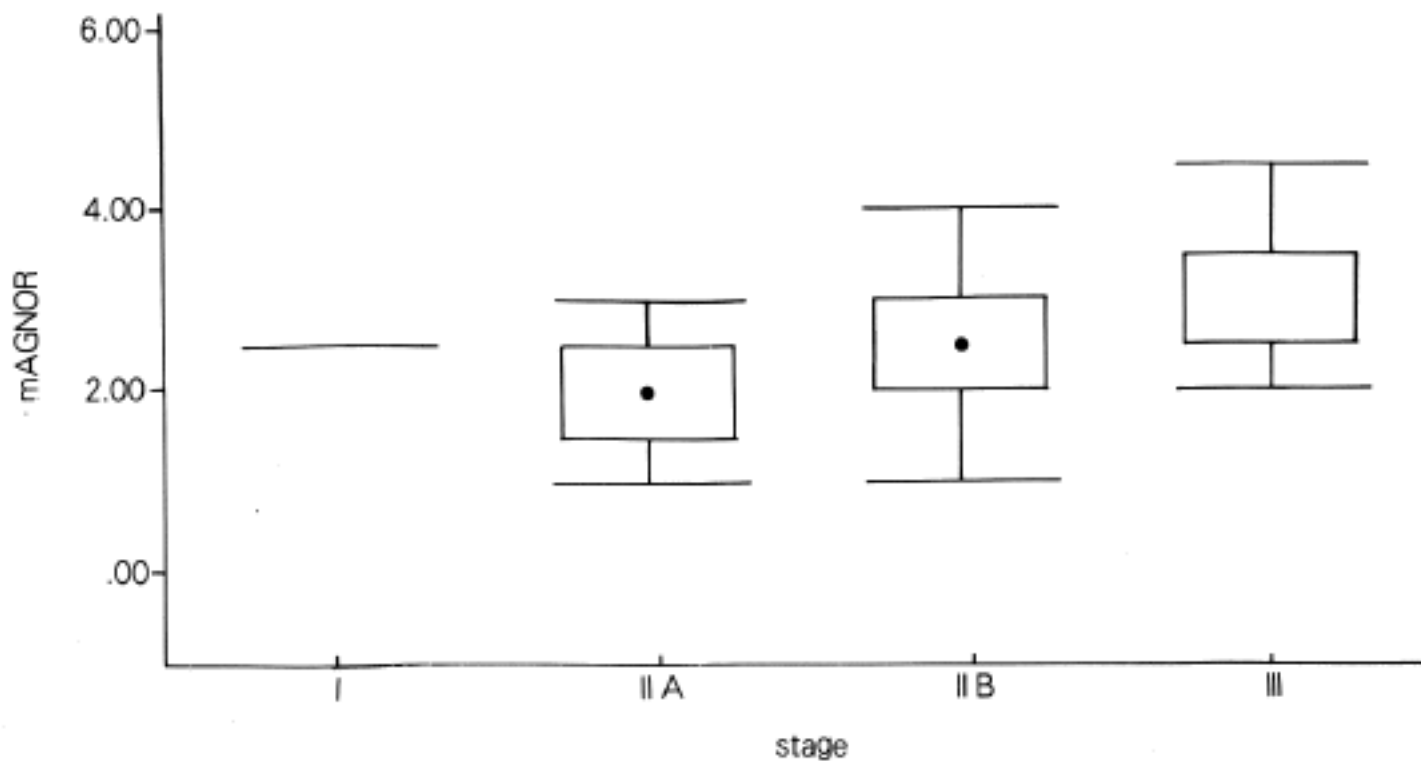


Fig. 4. Box and whisker plots for mAgNOR in tumor stages.

Table 6. Mean and standard deviation of AgNORs and PCNA by ER and PR status

	mAgNOR <sup>1</sup> m±SD	PCNA(%) <sup>2</sup> m±SD
ER+/PR+	2.31±0.85	20.00±20.73
ER+/PR-	2.54±0.75	17.89±18.04
ER-/PR-	2.95±0.91	28.96±22.81

1.  $P=0.08$  by Kruskal-Wallis Statistic ( $P=0.02$  by linearity test)
2.  $P=0.25$  by Kruskal-Wallis Statistic ( $P=0.13$  by linearity test)

다 차이가 있었다. 침윤성 소엽암 2예는 각각 1.18과 1.57로서 다른 종양형보다 현저히 낮았다. 또 침윤성 도관암에서도 분화가 좋고 PCNA가 음성인 예는 mAgNORs가 1.69로 낮았으나 같은 종양형이라도 분화도가 낮은 종양은 AgNOR의 크기가 크고 수도 증가하였다(mAgNORs 3.87)(Fig. 3). 병기별로 보면 병기 III이 mAgNORs 3.29로 제일 높았다(Table 5). 조직학적 등급과 비교 통계처리하니 mAgNORs는 등급 1이 2.33(±0.54 SD), 등급 2가 2.87(±0.74 SD) 그리고 등급 3이 3.46(±1.01 SD)로 분화도가 낮은 등급 3은 분화도가 좋은 등급 1보다 증가한 것이 통계학적 유의성이 있었다( $P<0.05$ ).

#### 5. 통계학적 분석(Statistical analysis)

유방암의 ER, PR 상태와 mAgNORs 및 PCNA

와의 통계학적 관계는 AgNOR와는 경계선 유의성이 있고( $P=0.08$  Kruskal-Wallis 1-Way ANOVA에 의해) 그리고 PCNA와는 유의성은 없으나 경향은 있다( $P=0.13$  linearity test에 의해)고 분석되었다(Table 6). AgNOR과 병기와의 관계는 병기를 림프절의 전이 유무를 나누지 않고 통괄적으로 병기를 4로 나누어서 고찰하니 병기 I을 제외하고 병기 IIA, IIB, III에서는 증가하는 경향이 있었다(Fig. 4). PCNA와 병기와의 관계는 유의성이 없었다. 한편 조직학적 등급별로 ER, PR 상태와의 관계는 통계학적 유의성이 있고( $P=0.005$ ,  $P=0.015$ (Chi Square test에 의해)) 또 AgNOR수와의 관계는 등급 1과 등급 3을 비교하여 통계학적 유의성이 있다고 분석하였다. PCNA와 등급과의 관계는 유의성이 없었다.

#### 고 찰

악성종양의 증식을 측정은 종양성장의 믿을만한 표식자가 될 수 있다. 근래에 세포성장주기와 관계있는 PCNA의 개발로 다른 생물학적 표식자와 더불어 사용하기에 이르렀다. PCNA는 핵에 DNA중합효소(polymerase  $\delta$ )의 보조단백질로서 정상적으로도 소량 존재하지만<sup>34-36</sup> 암세포 내에서 다량 검출된다고 한다. 이는 PCNA가 핵내 DNA합성에 보조인자로서의 정상적 기능 외에 비계획성 DNA합성에도 역시 관여되기 때문이다<sup>37,38</sup>. 세포성장주기 중에 총 PCNA치는 2~3배 정도의 작은 변동이 생기나 특별히 S기(DNA합성기)에 복제터(replication site)들에 비례하여 극적인 변동이 생긴다<sup>39</sup>. 실제 DNA합성에 요구되는 양



보다 훨씬 더 많은 양의 PCNA가 주기세포(cycling cell)의 핵에 나타난다. Frierson<sup>40)</sup>은 DNA 함량은 종양의 조직학적 등급과 강한 관련성이 있고 DNA diploid carcinoma는 특징적으로 S기 분획이 aneuploid carcinoma보다 낮고 또 S기 분획이 조직학적 등급과 호르몬 상태와 상호관련이 있다고 보고했다. 즉 ER+ 종양은 DNA diploid인 경향이 있고 반면 ER- 암종은 더 흔히 DNA aneuploid이라고 했다. 본 연구에서도 고PCNA등급에 속한 6예 중 4예는 ER-/PR-로서 모두 조직학적 등급 3에 속했는데 이 중 3예는 침윤성 도관암, 1예는 수양암이었다. 반면 조직학적 등급 1에 속하고 저PCNA 등급인 침윤성 도관암 9예 중 5예는 ER+/PR+이고 2예는 ER+/PR-로 9예 중 7예(77.77%)가 ER+이고 2예는 ER-/PR-였다. Ballare등<sup>41)</sup>은 ① 대부분의 증식 세포들은 ER을 발현하지 않으며 그 결과 PR도 발현하지 않고 PR의 차단작용에 불감응상태로 남아 있게 된다. ② 중등도 분화된 ER+/PR- 종양에서 종양간세포(tumor stem cell)들은 첫단계 분화만 할 뿐 PR발현 결여로 더 높은 증식율을 나타낸다. ③ ER-/PR- 종양은 ER발현 결여와 그 결과로 PR 발현 결여로 된다. 그래서 종양간세포들은 분화하는데 저지 당하지 않고 종양성장은 억제되지 않는다고 했다. 단 병기 I의 조직학적 등급 1인 침윤성 도관암 1예는 ER+/PR+인데도 고PCNA 등급을 나타내 주목을 끌었다. 이는 종양세포들 중 ER- 종양세포들이 증식한 것으로 생각된다. Ballare등<sup>42)</sup>이 ER+ 종양에서 가장 원시적인 종양간세포들은 ER을 발현하지 않고 또 주기세포들의 대부분(69.1%)이 ER-이라는 중요한 관찰을 했다. 즉 ER+ 유방암에서 DNA 합성은 ER- 종양세포에서 선택적으로 이루어진다는 사실을 thymidine labeling index로 규명했고 또 정상 유방조직에서 ER의 증가가 세포성장 1~2주기 후에 세포분열을 정지하게 하는 것과 같이 유방암에서도 ER의 발현이 같은 작용을 할 가능성을 고려할 수 있다고 했다. 따라서 ER+ 종양이 ER- 종양보다 예후가 좋고 재발이 없으며 분화도가 좋은 이유와 관계 있다고 본다고 했다<sup>6)</sup>.

Nucleolar organizer region(NOR)은 ribosomal RNA를 생산하는 DNA고리로서 분열중기(meta-phase)에 5쌍의 선단부 부착 염색체 즉 13, 14, 15, 21, 22번 염색체의 단완에, 그리고 세포분열간기(interphase)에 핵소체 부위에서 나타난다<sup>39, 43-45)</sup>고 알려져 있다. NOR의 구성은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만 RNA 중합효소 I, 110 KD의 C<sub>23</sub>단백, 37 KD의 B<sub>23</sub>단백, 36 KD인 Ag-NORs단백 등으로 구성되어 있다<sup>42, 44, 46)</sup>고 알려졌고, 이의 기능은 r-RNA의 전사를 조절한다고 추측한다. 실제 NOR의 수는 ① 증식성 혹은 종양성 병변에서와 같이 핵소체 활동이 많아질 때, ② 전사능이 증가할 때, 그리고 ③ 배수성이 증가

하여 염색체 수가 많아질 때에 증가한다<sup>32)</sup>고 알려졌다. 이런 NOR의 특성을 이용하여 종양세포의 증식율과 악성도를 측정할 수 있어 종양의 예후 판정에 사용하게 되었다.

정상 휴식 이배체세포(resting diploid cell)들에서 AgNORs의 총 수는 핵당 1~2개이다<sup>47)</sup>. AgNOR수가 평균 2개 이상으로 증가하면 이는 부착염색체들의 수가 증가하거나 또 DNA 총량이나 혹은 이수성(aneuploidy)의 증가함을 시사한다. 세포분열간기 AgNORs량은 세포중복율과 엄격하게 관련된다고 본다. 즉 세포증식이 빠를수록 세포분열간기 AgNORs 양이 많아진다<sup>48)</sup>. 고등급과 저등급 비 호스킨스 림프종에서 세포분열간기 AgNOR 수는 DNA 유세포측정법으로 측정한 S기 세포들의 핵분율과의 사이에 선상관계에 있음이 관찰됐다<sup>49)</sup>. 악성유방 종양에서는 양성체에 비해 유의하게 총 AgNOR수가 증가한다<sup>50)</sup>. mAgNORs치는 DNA 덩어리나 DNA 배수성(ploidy)과 가장 잘 관련되어 있고 높은 AgNOR 수를 가진 세포가 흔한 것은 그 세포의 증식력 혹은 S기 분획을 가장 잘 반영한다<sup>32, 51, 52)</sup>. Mourad등<sup>32)</sup>은 DNA 유세포측정법으로 AgNORs와의 비교 연구에서 이수성 종양은 mAgNOR치가 핵당 2.4~4.6으로 평균 2.97(±0.59SD)이라고 보고했다. 윤등<sup>33)</sup>도 이수성을 보인 암종은 2.69(±0.27)이고 정배수성(euploidy)인 암종은 2.38(±0.39)로서 이수성 암종에서 유의하게 증가하였다(P<0.05)고 했다. 본 연구에서 조직학적 등급 1인 침윤성 도관암들의 mAgNOR치의 평균이 2.33, 등급 2인 예들은 2.87 그리고 등급 3인 경우 3.09로서 분화도가 낮을수록 mAgNOR치가 유의하게 높았고(P<0.05) 특히 AgNORs수의 증가 뿐 아니라 크기도 증가하였다(Fig. 3-a). 그리고 특수종양형 중에서 침윤성 소엽암은 특별히 mAgNOR치가 낮아, 3예가 각각 1.18, 1.57, 2.81로서 평균 mAgNOR치가 1.85이었다. 또 ER/PR 상태와의 관계를 볼 때 mAgNORs는 ER+/PR+인 경우 2.31, ER+/PR-인 경우 2.54이고 ER-/PR-인 경우 2.95인 것은 주목할 만하였다. AgNOR 수의 증가는 세포의 증식력 즉 S기 분획의 증가를 의미한다고 볼 때, S기 분획은 조직학적 등급과 호르몬 수용체와 상관관계가 있다고 한 보고<sup>54)</sup>와 우리의 결과와 부합된다.

Larsimont등<sup>55)</sup>은 유방암에서 에스트로젠 함량과 세포형태학적 변수(cytomorphonuclear parameter)(핵의 크기, 모양, DNA함량, 염색체 양상)와의 관계를 알아보기 위하여 DCC방법(dextran-coated charcoal assay)으로 ER을 측정하여 ER- 유방암에서는 ER+ 유방암과 비교해서 핵이 크고 DNA함량이 많았고 또 염색체 양상도 유의하게 더 농축되었으며 증식지수도 높게 나타났다고 보고했다. Reiner등<sup>56)</sup>은 유방암의 조직학적 등급과 ER-ICA 치와는 유의하게 상관관계가 있고 또 세관 형성이 잘된 종양은

ER양성율이 높고, 반대로 ER- 종양에서 세관 형성이 결여된 것은 조직학적 위험인자로 가장 중요한 것이며 또 유사분열의 수도 ER 상태와 관계가 있다고 했다.

위에서 기술한 3예의 침윤성 소엽암 중 2예는 ER+/PR+이었고 1예는 ER-/PR-로 ER+/PR+인 예가 많았는데 이는 보고<sup>56)</sup>된 바와 부합했다. 침윤성 도관암은 33%가 ER+/PR+이고 48%가 ER-/PR-이었다. ER+/PR+ 종양세포의 분포는 분화가 좋은 유방암에서 흔히 보였고 한 종양에서도 분화도가 좋은 세포에서 양성반응이 많은 경향을 보였다. 조직학적 등급 3에 속한 침윤성 도관암 10예와 수양암 4예는 모두 ER-/PR-로서 이는 ER상태가 명백히 종양의 조직학적 등급과 관계가 있다고 한 것<sup>5,57,58)</sup>과 부합하였다. 수양암은 모두 ER-/PR-이었고 점액암이 역시 음성인 것은 이미 보고<sup>36)</sup>된 바와 부합하였다.

본 연구대상 50예중에 4환자는 수술 후 1~2년 사이에 쇠골상 림프절 그리고 폐에 전이가 생겼고 이중 한 환자는 간과 뼈 그리고 뇌에 전이가 생겨 급격히 1년내에 사망하였다. 이 4예 모두가 ER-/PR-이었던 것은 주목할 만하다. 또 이들의 mAgNOR은 각각 3.32, 3.87, 4.20 및 4.29로서 첫번째 예(mAgNOR 3.32)는 등급 2, 병기 III(+ )이었고, 그리고 나머지는 모두 등급 3으로, 병기는 순서대로 병기 III(+), 병기 IIB(+ ) 그리고 병기 IIA(-)였다. 이들은 Mourad등<sup>32)</sup>과 윤등<sup>53)</sup>의 연구에 근거하여 mAgNOR치가 해당 2.4~4.6, 또는 2.69 이상이면 모두 이수성 종양 범주에 속함을 알 수 있었다. 또 이들은 ER-/PR-에서 재발이 많이 생긴다는 보고들<sup>5~8,42,39)</sup>과 부합하였다.

유방암의 크기, 림프절 전이 유무에 따라 분류<sup>3~5,60)</sup>하여(Table 2) 볼 때 병기 IIB(+ )군이 38%로 제일 다수였다. 병기와 ER/PR 상태와의 관계는 유의할만한 상관관계가 없었다. 종양의 크기, 병기 그리고 림프절 전이와 ER 상태와 상관관계가 없다고 한 보고<sup>57)</sup>와 일치했다. Kruskal-Wallis 1-way ANOVA 통계 처리하여 Fig. 4에서와 같이 Box-whisker plot로 나타내면 병기 I, IIA, IIB, III과 mAgNORs와의 상관관계는 병기 I만 제외하고 상승했는데 경계선 유의성( $P=0.07$ )이 있었고 이 중 병기 III에서 3.29로 월등히 높은 것은 주목할 만하였다. 한편 병기와 PCNA와는 상관관계가 있었다. ER 및 PR과 AgNORs의 상관관계 그리고 PCNA와의 관계(Table 6)에서 mAgNORs는 ER-/PR-인 경우에 증가하고 경계선 유의성이 있고( $P=0.08$ ) PCNA는 ER-/PR-과 유의성은 없으나 경향은 있다고 분석되었다( $P=0.13$ ). PCNA과 조직학적 등급, 종양 크기, 병기 그리고 호르몬 수용체와는 관계가 없다는 보고<sup>22,24)</sup>들과 부합하였다. 그러나 이들 연구에 사용한 단클론 항체의 종류

가 다르기 때문에 일률적으로 평가하기 어려우며, 여하튼 이들과 상반된 보고<sup>51~53)</sup>들이 있어서 이는 본 연구대상 수가 50예 보다 더 많았었으며 ER-/PR- 유방암인 경우 PCNA와의 관계가 경향성 뿐만아니라 경계선 유의성도 있었을 가능성도 배제 못한다고 생각되었다. PCNA는 조직의 고정 시간이 48시간 이상 길어질 때에 반응력이 급격히 떨어진다는 사실을 감안할 때 본 연구대상에도 그런 소인을 완전히 배제 못하였다. 본 연구중에 발견한 예와 같이 조직학적으로 도관암이고 병기 IIA이고 아직 림프절 전이가 없는 상태라도 ER-/PR-이고 고 PCNA등급이거나 또 mAgNORs치가 이수성 종양 범주(>2.69)에 속하면 이질성 고도 악성 유방암으로 간주하고 조기에 화학요법을 병행함이 이들의 이질적인 전격적 고속 파급을 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 본 연구는 추적 기간이 1년 6개월에서 2년 6개월로 길지 않아 차후 더 긴 기간 후에 추적 조사 연구 결과와 비교 검토가 필요하다고 본다.

## 요 약

1990년부터 1991년까지 계명대학교 동산병원 병리과에서 검색된 원발성 유방암 50예를 대상으로 하여 임상경과의 추적조사, 육안적 소견, 현미경적 소견, ER과 PR의 유무 그리고 종양 증식력 측정을 위하여 PCNA의 면역반응을 보기위한 avidin/biotin immunoperoxidase염색을 시행하고 또 은염색을 하여 AgNOR수를 검증하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) ER-/PR-일때에 mAgNORs치의 증가가 경계선 유의성이 있었다( $P=0.08$ ).
- 2) ER-/PR-일때에 PCNA의 증가는 유의성이 거의 없었으나( $P=0.25$ ) 경향은 있었다( $P=0.13$ ).
- 3) ER/PR상태와 조직학적 등급과의 관계는 유의성이 있었다( $P=0.005, P=0.015$ ).
- 4) 침윤성 도관암에서 mAgNORs치와 조직학적 등급과는 등급 1과 등급 3을 비교하여 등급 3에서 유의성있게 상승하였다( $P<0.05$ ). 또 병기와의 관계는 병기 IIA에서 부터 병기 III까지 상승하였는데 경계선 유의성이 있었다( $P=0.07$ ).
- 5) PCNA치는 조직학적 등급 및 병기와의 관계는 유의성이 없었다.
- 6) ER-/PR-이고 조직학적 등급 3이고 고 PCNA등급이거나 또는 mAgNOR치가 높으면(>2.69) 종양증식율이 높아 어느 병기에 상관없이 병의 경과가 신속히 진행되어 예후가 훨씬 나쁘다.

이상의 결과로 유방암의 예후를 판정하는데는 조직학적 등급, 병기 그리고 ER과 PR의 검사외에 종양의 증식력을 측정할 수 있는 AgNORs와 PCNA검사도 동시에 시행하는 것이 예후를 판정하는데 보다 유리하며 특히 유별나게 증식율이 높고 전격적으로 병이 진

행하는 이질성 증양을 가려내어 그 나쁜 예후의 예견 및 치료대책 결정에 매우 중요하게 기여할 수 있다고 생각된다.

### 참 고 문 헌

- 1) Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Monting J, Hellerich U, von Kleist S. *Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. Cancer 1991; 67: 421-8.*
- 2) McGurrin JF, Doria Jr MI, Dawson PJ, Karrison T, Stein HO, Franklin WA. *Assessment of tumor cell kinetics by immunohistochemistry in carcinoma of breast. Cancer 1987; 59: 1744-50.*
- 3) Sadowsky NL, Semine A, Harris JR. *Breast imaging. A clinical aspect of breast conserving treatment. Cancer 1990; 65: 2113-8.*
- 4) Henson DE, Ries L, Freedman LS, Carriaga M. *Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22616 cases of breast cancer. Cancer 1991; 68: 2142-9.*
- 5) Fisher ER, Redmond C, Fisher B, Bass G. *Pathologic findings from the national surgical adjuvant breast and bowel projects(NSABP). Cancer 1990; 65: 2121-8.*
- 6) Parl FF, Schmidt BP, Dupont WD, Wagner RK. *Prognostic significance of estrogen receptor status in breast cancer in relation to tumor stage, axillary node metastasis, and histopathologic grading. Cancer 1984; 54: 2237-42.*
- 7) Gombel C, Faverly D, Silverberg SG. *The breast. In: Silverberg SG. Principles and practice of surgical pathology, Churchill Livingstone Inc, Second edition, 1990, Chapter 11, pp337-62.*
- 8) Vollenweider-Zerargui L, Barrelet L, Wong Y, et al. *The predictive value of estrogen and progesterone receptors' concentrations on the clinical behavior of breast cancer in women. Cancer 1986; 57: 1171-80.*
- 9) Chang ES, Park KK, Kim YS. *Detection of estrogen receptors with monoclonal antibodies in formalin fixed, paraffin-embedded breast cancer tissue(Comparison of immunohistochemical method with ER-D5 antibody and ER-ICA). Keimyung Univ Med J 1990; 9(3): 322-32.*
- 10) Andersen J, Poulsen HS. *Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue: Prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer. Cancer 1989; 64: 1901-8.*
- 11) McCarty Jr KS, McCarty Sr KS. *Steroid hormone receptors in the regulation of differentiation. Am J Pathol 1977; 86(3): 705-44.*
- 12) Williams MR, Todd JH, Ellis IO, et al. *Oestrogen receptors in primary and advanced breast cancer: an eight year review cases. Br J Cancer 1987; 55: 67-73.*
- 13) Vollmer G, Gerdes J, Knuppen R. *Relationship of cytosolic estrogen and progesterone receptor content and the growth fraction in human mammary carcinomas. Research 1989; 49: 4011-4.*
- 14) Anderson TJ, Page DL. *The breast. In: McGee JO'D, Isaacson PG, Wright NA, Oxford Textbook of Pathology, Oxford University Press, 1992, Chapter 22, pp1653-70.*
- 15) Press MF, Greene GL. *Methods in laboratory investigation. An immunocytochemical method for demonstrating estrogen receptor in human uterus using monoclonal antibodies to human estrophilin. Laboratory Investigation 1984; 50(4): 480-6.*
- 16) Henry JA, Angus B, Horne CH. *Oestrogen receptor and oestrogen regulated proteins in human breast cancer. Keio J Med 1989; 38: 241-61.*
- 17) Meyer JS, Province M. *Proliferative index of breast carcinoma by thymidine labeling: Prognostic power independent of stage, estrogen and progesterone receptors. Breast Cancer Res Treat 1988; 12: 191-204.*
- 18) Clark GM, Dressler LG, Owens MA, Pounds G, Oldaker T, McGuire WL. *Prediction of relapse or survival in node negative breast cancer by DNA flow cytometry. N Engl J Med 1989; 320: 627-33.*
- 19) Sigursson H, Baldetorp B, Borg A, Dalberg M, Ferno M, Killander D, Olsson H. *Indicators of prognosis in node-negative breast cancer. N Engl J Med 1990; 322: 1045-53.*
- 20) McGuire WL. *DNA flow cytometry and other prognostic factors in breast carcinoma. Cancer Invest 1990; 8: 245-6.*
- 21) McFadden PW, Clowry LJ, Daehnert K, Hause LL, Koethe SM. *Image analysis confirmation of DNA aneuploidy in flow cytometric distribution having a wide coefficient of variation of the G0/G1 peak. Am J Clin Pathol 1990; 93: 637-42.*
- 22) Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP. *Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J of Pathol 1990; 162: 285-94.*
- 23) Waseem NH, Lane DP. *Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen(PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. J Cell Sci 1990; 96: 124-9.*
- 24) Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA,



- Perrone G, Scampini S, Palma PD, Barbareschi M. *PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: Correlations with clinical and biological variables. J Clin Pathol* 1992; 45: 416-9.
- 25) Bolognari A, Contini A. *The role of the nucleolus in carcinogenesis. Riv Biol Norm Pathol* 1981; 7: 43-68.
- 26) Derenzini M, Ploton D. *Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. Int Rev Exp Pathol* 1991; 32: 149-92.
- 27) Derenzini M, Betts CM, Trere D, Mambelli V, Millis RR, Cancellieri A, Eusebi V. *Diagnostic value of silver-stained interphase nucleolar organizer regions in breast cancer. Ultrastruct Pathol* 1990; 14: 233-45.
- 28) Dervan PA, Gilmartin LG, Loftus BM, Carney DN. *Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. Am J Clin Pathol* 1989; 92: 401-7.
- 29) Evans AT, Orrell JM, Grant A. *Re-evaluating silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in problematic cutaneous melanocytic lesions: a study with quantitation and pattern analysis. J Pathol* 1991; 165: 61-7.
- 30) Bloom HJG, Richardson WW. *Histological grading and prognosis in breast cancer. Br J Cancer* 1957; 11: 359-77.
- 31) Jain S, Filipe MI, Hall PA, Waseem N, Lane DP, Levison DA. *Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. J Clin Pathol* 1991; 44: 655-9.
- 32) Mourad WA, Erkman-Balis B, Livingston S, et al. *Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Cancer* 1992; 69: 1739-44.
- 33) Kruskal W, Wallis W. *Use of ranks in one-criterion variance analysis. J Am Stat Assoc* 1952; 47: 583-621.
- 34) Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. *An auxiliary protein for DNA polymerase- $\delta$  from foetal calf thymus. J Biol Chem* 1986; 261: 12310-6.
- 35) Prelich G, Tan CK, Kostura M, Mathews MB, So AG, Downey KM, Stillman B. *Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase- $\delta$  auxiliary protein. Nature* 1987; 326: 517-20.
- 36) Bravo R, Frank R, Blundell PA, MacDonald-Bravo H. *Cyclin-PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase  $\delta$ . Nature* 1987; 326: 515-7.
- 37) Celis J, Madson P. *Increased nuclear cyclin PCNA antigen staining of non-S phase transformed human amnion cells engaged in nucleotide excision DNA repair. FEBS Lett* 1986; 209: 277-83.
- 38) Toschi L, Bravo R. *Changes in cyclin PCNA distribution during DNA repair synthesis. J Cell Biol* 1988; 107: 1623-8.
- 39) Morris GF, Mathews MB. *Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. J Cell Biol* 1989; 264: 13856-64.
- 40) Frierson HF Jr. *Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. Am J Surg Pathol* 1991; 15(4): 358-67.
- 41) Ballare C, Bravo AI, Sorin I, Guman N, Schiaffi JA, Yomha R, Bagnati A, Lemia B, Mordoh J. *The expression of progesterone receptors coincides with an arrest of DNA synthesis in human breast cancer. Cancer* 1991; 67: 1352-8.
- 42) Ballare C, Bravo AI, Laucella S, Sorin I, Cerdeiro R, Loza J, Sousa Martinez F, Guman N, Mordoh J. *DNA synthesis in estrogen receptor-positive human breast cancer takes place preferentially in estrogen receptor-negative cells. Cancer* 1989; 64: 842-8.
- 43) Derenzini M, Thiry M, Goessens G. *Ultrastructural cytochemistry of the mammalian cell nucleolus. J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1237-56.
- 44) Underwood JCE, Giri DD. *Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy. J Pathol* 1988; 155: 95-6.
- 45) Rowlands DC. *Nucleolar organizer regions in cervical intraepithelial neoplasia. J Clin Pathol* 1988; 41: 1200-2.
- 46) Lischwe MA, Snetana K, Olson MOH, Busch H. *Protein C<sub>25</sub> and B<sub>25</sub> are the major silver staining proteins. Life Sci* 1979; 25: 701-8.
- 47) Mourad WA, Lavalley-Grey M, Essig YP, Pappenhouse P, Rowlands DT. *The argyrophilic nucleolar organizer regions in Wilms' tumors and related lesions: A histologic and chromosomal correlation. Mod Pathol* 1991; 4: 247-52.
- 48) Trere D, Pession A, Derenzini M. *The silver-stained proteins of interphase nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. Exp Cell Res* 1989; 184: 131-7.
- 49) Crocker J, Egan MJ. *Correlation between NOR sizes and numbers in non-Hodgkin's lymphomas. J Pathol* 1988; 156: 239-9.
- 50) Smith R, Crocker J. *Evaluation of nucleolar organizer region-associated proteins in breast malignancy. Histopathology* 1988; 12: 113-25.
- 51) Raymond WA, Leong AS-Y. *Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. Hum Pathol* 1989; 20: 741-6.
- 52) Derenzini M, Trere D. *Importance of interphase nucleolar organizer regions in tumor pathology. Virchows Archiv B Cell Pathol* 1991; 61: 1-8.
- 53) Yun KJ, Han WC, Choi C, Moon HB. *Comparative*

- study of the breast carcinoma by the measurement of nucleolar organizer regions and the flow cytometric DNA analysis. Korean J Pathol* 1992; 26: 117-24.
- 54) Batsakis JG, Sneige N, El-Naggar AK. *Flow cytometric (DNA content and S-phase fraction) analysis of breast cancer. Cancer* 1993; 71: 2151-3.
- 55) Larsimont D, Kiss R, D'olne D, DE Launoit Y, Mattheiem W, Paridaens R, Pasteels JL, Gompel C. *Correlation between nuclear cytomorphometric parameters and estrogen receptor levels in breast cancer. Cancer* 1989; 63: 2162-8.
- 56) Reiner A, Reiner G, Spona J, Schemper M, Holzner JH. *Histopathologic characterization of human breast cancer in correlation with estrogen receptor status. Cancer* 1988; 61: 1149-54.
- 57) Bishop HM, Blamey RW, Elston CW, Haybittle JL, Nicholson RI, Griffiths K. *Relationship of oestrogen-receptor status to survival in breast cancer. Lancet* 1979; 2: 283-4.
- 58) Maynard PV, Davies CJ, Blamey RW, Elston CW, Johnson J, Griffiths K. *Relationship between oestrogen-receptor content and histological grade in human primary breast tumors. Br J Cancer* 1978; 38: 745-8.
- 59) Dorr FA. *Prognostic factors observed in current clinical trials. Cancer* 1993; 71: 2163-8.
- 60) Kinne DW. *Primary therapy for limited breast cancer. Cancer* 1990; 65: 2129-31.
- 61) Aaltomaa S, Lipponen P, Syrjanen K. *Prognostic value of cell proliferation in breast cancer as determined by proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunostaining. Anticancer-Res* 1992; 12(4): 1281-6.
- 62) Coltrera MD, Gown AM. *PCNA/Cyclin expression and Brd U uptake define different subpopulations in different cell lines. J Histochem Cytochem* 1991; 39: 23-30.
- 63) Dawson AE, Norton JA, Weinberg DS. *Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am J Pathol* 1990; 136: 1115-24.