

Ko-pengekspresan Reseptor Estrogen beta (ER β) dan Aktin Otot Licin pada Tumor Filodes di Payudara: Suatu Kajian Tisu Mikroarai

(The Co-expression of Estrogen Receptor beta (ER β) and Smooth Muscle Actin in Phyllodes Tumour of Breast: A Tissue Microarray Study)

NURHAYATI H. MUNAWER, SITI-AISHAH MD ALI*, REENA MD ZIN & ROHAIZAK MUHAMMAD

ABSTRAK

Proliferasi tumor filodes tertumpu terutama pada bahagian stroma yang dianggap sebagai komponen neoplastik bagi tumor filodes. Reseptor Estrogen (ER) yang memainkan peranan dalam payudara neoplastik juga terlibat dalam perkembangan tumor filodes. ER β adalah satu jenis klon ER yang dilaporkan hadir pada stroma tumor payudara manakala pengekspresan aktin otot licin (SMA) di stroma dapat membandingkan gred histologi tumor filodes. Kami membandingkan pengekspresan ER β dengan SMA pada komponen stroma tumor filodes menggunakan teknik tisu mikroarai (TMA). TMA dibentuk ke atas 77 kes tumor filodes (46 benigna, 17 pinggiran dan 14 malignan) menggunakan jarum berdiameter 0.6 mm (Alphelys Plaisir, Perancis) dan pewarnaan imunohistokimia dijalankan menggunakan penanda molekul ER β dan SMA. Tumor filodes kerap hadir pada wanita berusia lebih daripada 40 tahun dengan tumor filodes benigna menunjukkan median umur pesakit paling rendah ($p=0.017$). Ekspresi ER β dalam komponen stroma meningkat dengan gred histologi tumor. Sementara SMA menunjukkan ekspresi pada 62.8, 41.2 dan 57.1%, masing-masing bagi tumor filodes benigna, pinggiran dan malignan. Kedua-dua ER β ($p=0.024$) dan SMA lebih cenderung hadir pada wanita ≥ 40 tahun. Kajian menunjukkan hubungan signifikan antara ko-pengekspresan ER β dan SMA ($p=0.047$) dan 65.5% daripadanya adalah wanita berumur lebih daripada 40 tahun. Ekspresi SMA yang tinggi pada stroma tumor filodes benigna mungkin menunjukkan potensi proliferasi tumor ini untuk menjadi malignan. Ekspresi tinggi ER β dengan tumor filodes malignan dan hubungannya dengan SMA mencadangkan ko-pengekspresan kedua-dua penanda molekul ini mungkin berperanan dalam tumorigenesis stroma tumor filodes.

Kata kunci: ER β ; SMA; tisu mikroarai; tumor filodes

ABSTRACT

Proliferation of phyllodes tumour is mainly in the stromal that is considered as the neoplastic component of phyllodes tumour. Estrogen Receptor (ER) that plays an important role in breast neoplasm is also involved in progression of phyllodes tumour. ER β is a type of ER which was reported to be expressed in the breast stroma while the expression of smooth muscle actin (SMA) in the stroma may differentiate histological grade of phyllodes tumour. We compared the expression of ER β to SMA in stromal component of phyllodes tumour using tissue microarray (TMA) technique. A TMA was constructed on 77 cases of phyllodes tumour (46 benign, 17 borderline and 14 malignant) using 0.6 mm punch kit (Alphelys Plaisir, France) and immunohistochemical staining was done using ER β and SMA. Phyllodes tumour seen in women aged more than 40 year-old with benign phyllodes tumour showed the lowest median of age ($p=0.017$). ER β expression in stromal component increased with histological grade of the tumour. SMA was positive in 62.8, 41.2 and 57.1% of benign, borderline and malignant phyllodes tumour, respectively. Both ER β ($p=0.024$) and SMA were commonly expressed in women aged ≥ 40 years. We found a significant co-expression of ER β and SMA ($p=0.047$) and 65.5% of these cases occurred in women aged more than 40 years-old. The high expression of SMA in stroma of benign phyllodes tumour may demonstrate the potential of proliferation of this tumour to become malignant. High expression of ER β of malignant phyllodes tumour and its significant association with SMA suggests that co-expression of these two markers may play a role in stromal tumorigenesis of phyllodes tumour.

Keywords: ER β ; phyllodes tumour; SMA; tissue microarray

PENGENALAN

Tumor filodes adalah jenis neoplasma payudara yang jarang ditemui melibatkan 0.3-1% daripada keseluruhan kes tumor payudara (Sotheran et al. 2005). Di Singapura, kejadian tumor filodes adalah 6.92% jika dibandingkan dengan keseluruhan kes kanser payudara. Angka ini

merupakan frekuensi yang paling tinggi dalam kalangan wanita Asia (Jara-Lazaro & Tan 2009). Histologinya dicirikan dengan komponen epitelium serta pertumbuhan stroma. Tumor ini dikelaskan kepada tiga kategori iaitu benigna, pinggiran dan malignan berdasarkan pengelasan Organisasi Kesihatan Sedunia (WHO) (Sotheran et al.

2005; Tan et al. 2012a). Ciri komponen stroma menjadi rujukan kepada pengkelasan grad histologi tumor filodes termasuklah kehadiran margin, pleomorfisme selular, selulariti stroma, aktiviti mitotik serta taburan stroma (Chong & Woo 1993; Yonemori et al. 2006).

Reseptor Estrogen (ER) memainkan peranan penting dalam modulasi tumorigenesis payudara (Shaaban et al. 2003). Penilaian reseptor hormon ini bertindak sebagai peramal tindak balas terhadap terapi endokrin dan sebagai indeks prognostik bagi kanser payudara (Tse et al. 2002; Wittliff et al. 1998). Walau bagaimanapun, fungsi penentuannya pada tumor filodes tidak diketahui. Kajian lepas beranggapan ER mungkin mempunyai potensi yang sama sebagai penanda prognosis dan terapeutik terhadap tumor filodes (Tse et al. 2002). Terdapat dua jenis klon ER iaitu alfa ($ER\alpha$) dan beta ($ER\beta$) (Scobie et al. 2002; Speirs et al. 2002). Namun, hanya $ER\beta$ dilaporkan hadir pada komponen stroma tumor filodes (Sapino et al. 2006). Peranan SMA yang merangsang pembezaan sel di stroma tumor filodes (Sapino et al. 2006) dan menentukan peningkatan malignansi tumor ini (Tsai et al. 2006) mendorong kami untuk mengkaji hubungan ekspresinya dengan $ER\beta$ pada stroma tumor filodes. Hubungan antara kedua penanda molekul ini mungkin berguna untuk meramal tumorigenesis tumor benigna kepada malignan. Setakat ini, tiada kajian tempatan yang dijalankan untuk mengkaji hubungan kedua-dua penanda molekul ini pada tumor filodes.

BAHAN DAN KAEDAH

Kajian dijalankan setelah mendapat kelulusan etika daripada Jawatankuasa Etika Penyelidikan Perubatan, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM 1.5.3.5/244/SPP3). Sebanyak 77 sampel tumor filodes iaitu 46 kes tumor filodes benigna, 17 kes pinggir dan 14 kes malignan diperoleh dari Unit Histopatologi, Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia (PPUKM) dari tahun 1990 sehingga 2008.

PEMBINAAN BLOK TISU MIKROARAI

Blok tisu mikroarai diselenggara dengan menggunakan *MTA Booster* (Plaisir, Perancis) dan kesemua kes disusun menggunakan perisian *ALPHELYS TMA Designer* versi 1.6.3 (Plaisir, Perancis). Slaid pewarnaan hematoksilin dan eosin (H&E) diperhatikan di bawah mikroskop untuk mengesan sel tumor yang mempunyai komponen epitelium dan stroma. Kawasan tumor akan ditanda dengan pen. Empat silinder (bintik/spot) tisu yang berdiameter 0.6 mm ditebuk dari kawasan berlainan dari satu blok sampel yang sama dan dipindahkan ke dalam blok parafin kosong yang berlainan (Bubendorf et al. 2001; Munirah et al. 2011; Nurhayati et al. 2012). Blok yang menggabungkan lebih daripada satu sampel ini dipanggil blok tisu mikroarai.

PEWARNAAN IMUNOHISTOKIMIA

Protokol imunohistokimia dijalankan seperti kajian lepas (Munirah et al. 2011; Noranizah et al. 2010; Nurhayati et al. 2012). Hirisan tisu blok mikroarai setebal 3 μ m dilekatkan pada slaid bersalut salin dan diletakkan pada plat pemanas slaid bersuhu 70°C sebelum pewarnaan dimulakan. Slaid dinyahparafin dan direhidrasi dengan xilena, diikuti larutan alkohol dengan grad menurun iaitu 100, 90, 80 dan 70% sebelum dibasuh dengan air mengalir. Slaid dipindahkan ke dalam larutan sitrat, pH6 ($ER\beta$) dan larutan rawatan pH9 (SMA) dalam takungan air bersuhu 98°C selama 40 min. Seterusnya, slaid dibiarkan sejuk pada suhu bilik selama 20 min dan diinkubasi dengan agen penyekat hidrogen peroksida selama 10 min diikuti eraman penanda molekul $ER\beta$ (Serotec, klon PPG5/10, pencairan; 1:10) dan SMA (ThermoScientific, Ab-4, pencairan 1:200) serta antibodi sekunder (*Real[™] EnVision[™] /HRP, Rabbit/Mouse*) selama 30 min setiap satu. Selepas dibilas, larutan substrat-kromogen *DAB* pula ditambah selama 7 min sebelum dibilas dengan air mengalir. Kemudian slaid dibilas balas dengan larutan hematoksilin dan dilakukan proses dehidrasi. Akhirnya, proses pelekapan dilakukan dengan *DPX* dan boleh diamati di bawah mikroskop cahaya. Slaid kawalan positif yang digunakan adalah tisu endometrium bagi $ER\beta$ dan tonsil bagi SMA, mengikut cadangan tisu kawalan oleh pembekal (Serotec/ThermoScientific), sementara kawalan negatif adalah dengan meninggalkan inkubasi antibodi primer.

Pengekspresan positif $ER\beta$ dikelaskan kepada tiga kumpulan iaitu tahap rendah (0-5% sel yang menunjukkan pewarnaan positif), tahap sederhana (6-30%) dan tahap tinggi (31-100%) (Sapino et al. 2006). SMA dianggap positif apabila >10% daripada keseluruhan sel dengan keamatan pewarnaan sekurang-kurangnya keamatan pewarnaan sederhana (2+) (Clark et al. 2011).

ANALISIS STATISTIK

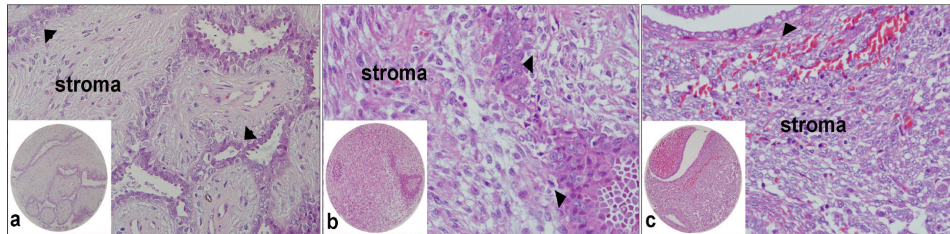
Analisis statistik menggunakan ujian khi kuasa dua (χ^2) dijalankan untuk menentukan hubungan ekspresi penanda molekul dengan grad histologi. Hubungan antara kedua-dua penanda molekul dianalisis menggunakan ujian McNemar. Nilai $p < 0.05$ menunjukkan data mempunyai perbezaan yang signifikan, menggunakan perisian *Statistical Packages for Social Sciences (SPSS)* versi 20 (IBM® SPSS Statistics, New York, USA).

HASIL DAN PERBINCANGAN

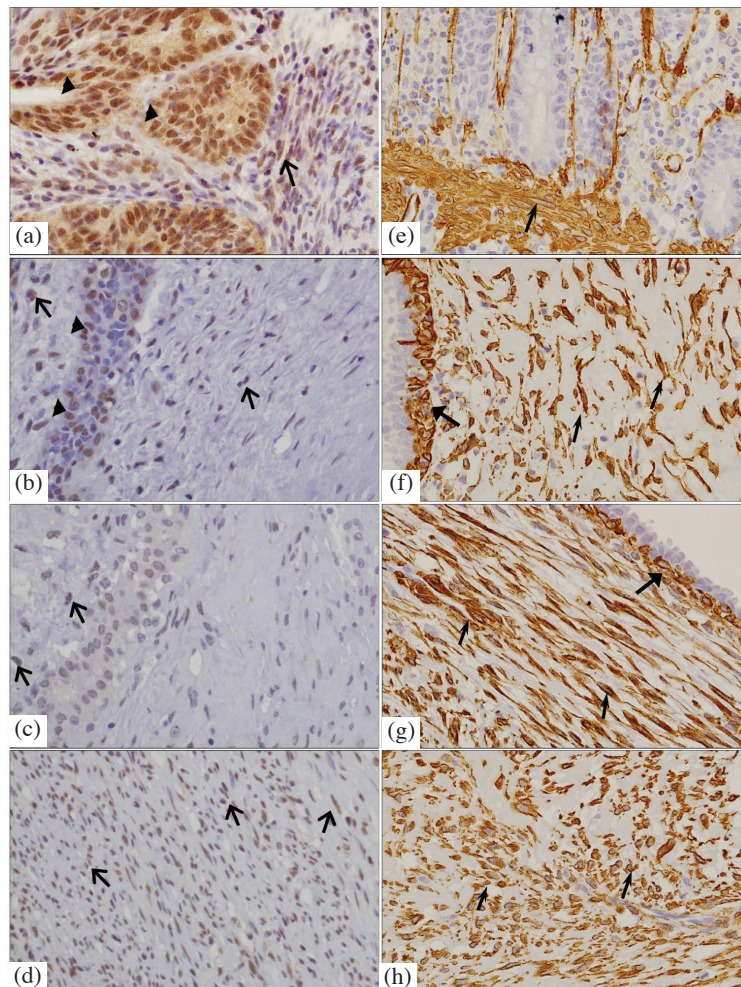
Tumor filodes adalah neoplasma yang terdiri daripada dua komponen iaitu epitelium dan stroma. Namun, bahagian stroma adalah tumpuan yang membezakan tahap keterukan atau malignansi tumor filodes dengan tumor filodes malignan lebih hiperselular (banyak sel) berbanding tumor filodes benigna. Oleh itu, bahagian stroma merupakan komponen yang lebih bersifat neoplastik yang membezakan tahap neoplasma tumor filodes berbanding epitelium (Feakins et al. 1999;

Kuijper et al. 2002). Komponen stroma tumor filodes menunjukkan keadaan yang selular dengan ciri sel gelendong dan kepadatan sel ini meningkat dengan tahap malignansi, seperti yang ditunjukkan dalam pewarnaan hematoxilin dan eosin (H&E) pada Rajah 1. Rajah 2(a) menunjukkan kawalan positif bagi penanda molekul

ER β menggunakan tisu endometrium. Rajah 2(b)-2(d) menunjukkan ekspresi ER β pada tumor filodes benigna (b), pinggir (c) dan malignan (d). Tisu tonsil digunakan sebagai kawalan positif bagi SMA (Rajah 2(e)) dengan SMA menunjukkan positiviti pada sel mioepitelium dan stroma tumor filodes (Rajah 2(f)-2(h)).



RAJAH 1. Histologi tumor filodes benigna (a) dan pinggir (b) terdiri daripada komponen epitelium (▶) dan stroma. Manakala tumor filodes malignan (c) menunjukkan komponen stroma yang lebih padat (H&E; magnifikasi 400 \times ; sisipan 100 \times)



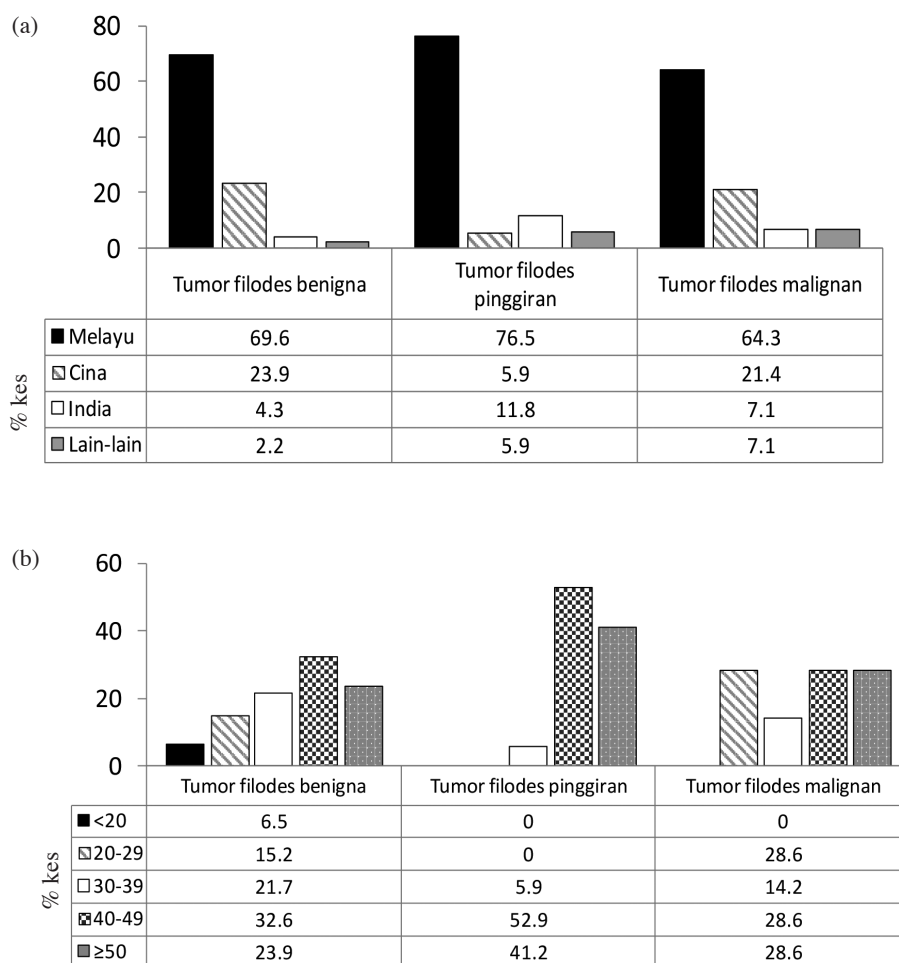
RAJAH 2. (a) Kawalan positif tisu endometrium bagi ER β . Pewarnaan immunohistokimia ER β dikesan pada sel epitelium (▶) dan stroma (→) pada tumor filodes benigna yang menunjukkan ekspresi tahap sederhana (b) dan pinggir (c: ekspresi tahap rendah) serta stroma tumor filodes malignan (d: ekspresi tahap tinggi). (e) Kawalan positif SMA (2+). SMA menunjukkan positiviti (3+) pada sel mioepitelium (→) dan stroma (→) tumor filodes benigna (f), pinggir (g) dan malignan (h) (magnifikasi: 400 \times)

Kajian ini mendapati 59.7% kes adalah tumor filodes benigna, 22.1% tumor filodes pinggiran dan 18.2% kes tumor filodes malignan. Jumlah ini seiring julat kes daripada kajian lepas dari Singapura iaitu 47-83, 5-47.6 dan 9.3-37% masing-masing bagi tumor filodes benigna, pinggiran serta malignan (Ang et al. 2011; Chua et al. 1989; Iau et al. 1998; Tan et al. 2005, 2012b). Peratus kes bagi etnik Melayu adalah paling tinggi bagi ketiga-tiga jenis histologi tumor filodes diikuti oleh etnik Cina, India dan lain-lain etnik (Rajah 3(a)). Hasil ini berbeza dengan peratus kes tumor filodes yang lebih tinggi pada etnik Cina, diikuti oleh Melayu, India dan lain-lain etnik dalam kajian di Singapura (Tan et al. 2012b; Tse et al. 2007). Walau bagaimanapun, taburan kes tumor filodes mengikut etnik dalam kajian ini adalah sama dengan kes kanser payudara dalam kajian tempatan, dengan etnik Melayu mencatat jumlah kes paling tinggi berbanding Cina dan India (Munirah et al. 2011; Zainal & Nor-Saleha 2007).

Rajah 3(b) menunjukkan taburan kelas umur bagi ketiga-tiga tumor filodes. Kajian ini mendapati kes tumor filodes paling kerap berlaku kepada wanita berusia melebihi 40 tahun, seiring kajian lalu (Esposito et al. 2006; Jacobs et al. 2005; Tsai et al. 2006). Kes kanser

payudara meningkat pada wanita >40 tahun atau menopause yang dipengaruhi oleh banyak faktor termasuk status ER, pemeriksaan payudara atau penyusuan anak (Glass et al. 2007; Shantakumar et al. 2007). Namun masih tidak diketahui faktor tumor filodes hadir lebih kerap pada wanita lebih tua. Data juga mendapati peningkatan umur mengikut tahap malignansi dengan min umur bagi sampel tumor filodes benigna, pinggiran dan malignan adalah masing-masing 41 ± 13.8 (median 42; julat 16-74 tahun), 49 ± 10.0 (median 48; julat 30-78 tahun) dan 42 ± 12.3 (median 44.5; julat 25-67 tahun) ($p=0.017$).

Pengekspresan ER β pada bahagian stroma menunjukkan peningkatan ekspresi dengan umur pesakit. Majoriti kes (65.4%) yang berusia <40 tahun menunjukkan tahap ekspresi rendah (0-5%) diikuti 13.3% (ekspresi 6-30%) dan 26.9% ekspresi tinggi (>30%). Sebanyak 34% wanita lebih tua (≥ 40 tahun) menunjukkan ekspresi rendah dan 26% kes menunjukkan ekspresi sederhana. Manakala 40% (20/50) kes wanita berusia ≥ 40 tahun menunjukkan ekspresi tinggi bagi ER β . Keadaan ini berkemungkinan disebabkan oleh penghasilan estrogen daripada tisu lemak dan penukaran androstenedione (sejenis hormon steroid) kepada estrogen pada wanita tua atau menopause (Liporace



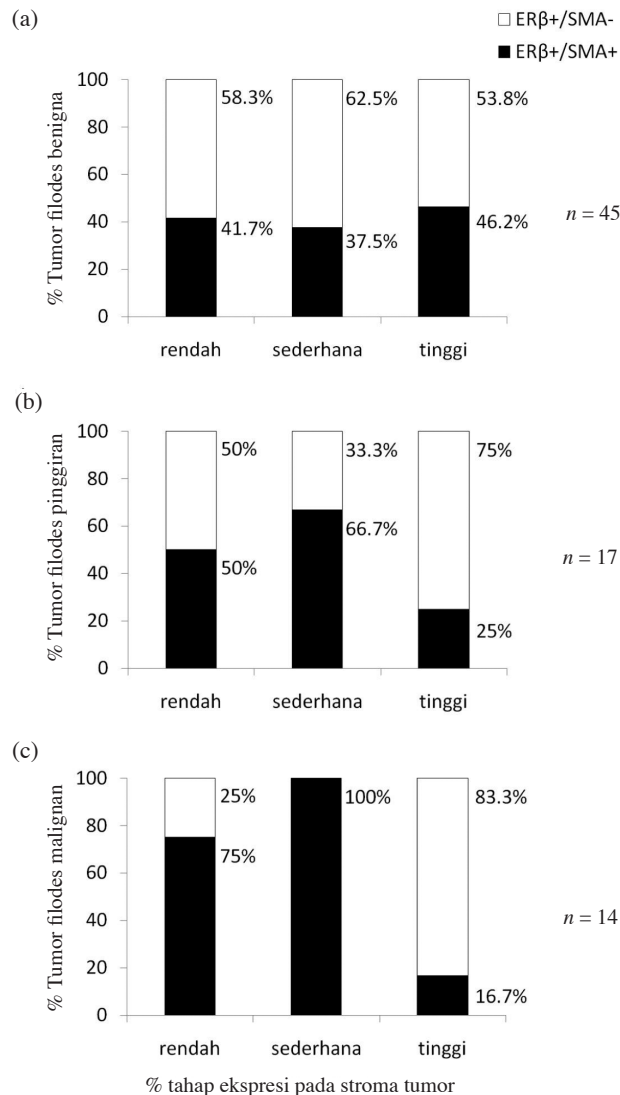
RAJAH 3. Peratus (%) kes kajian mengikut etnik (a) dan kumpulan umur berbeza (b) pada pesakit tumor filodes ($p>0.05$)

et al. 2008). Malah paras androstenedione didapati 1.5 kali lebih tinggi pada wanita tua berbanding wanita muda (Rousseau 2004). Positiviti SMA juga meningkat dengan usia pesakit dengan 61.9% kes SMA positif adalah wanita berusia lebih 40 tahun. Hasil ini seiring kajian lepas yang menunjukkan 77.8-100% tumor yang mengekspreskan SMA terdiri daripada pesakit berusia lebih 40 tahun (Chen et al. 2000; Tsai et al. 2006).

Rajah 4 menunjukkan peratus kes tumor filodes yang menunjukkan pengekspresan bagi ER β dan ko-pengekspresannya dengan SMA di stroma. Peratus pengekspresan ER β menunjukkan pengekspresan lebih tinggi pada tumor filodes pinggir dan malignan berbanding tumor filodes benigna. Sebanyak 47.1 dan 42.9% kes tumor filodes pinggir dan malignan, masing-masing menunjukkan pengekspresan ER β tahap tinggi (>30% sel positif) manakala 28.9% kes tumor filodes benigna menunjukkan tahap ekspresi yang sama. Hasil ini

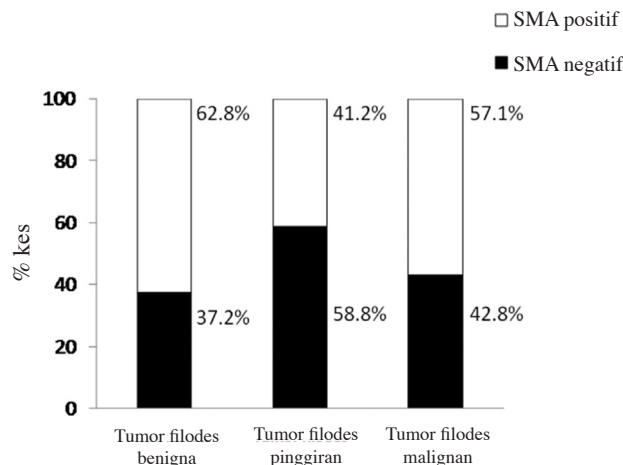
hampir sama dengan kajian Sapino et al. (2006) dengan ekspresi ER β lebih tinggi pada tumor filodes pinggir (100%) dan tumor filodes malignan (57%). Bilangan kes tumor filodes benigna yang menunjukkan ekspresi tinggi adalah paling rendah antara ketiga-tiga jenis histologi iaitu 47% (Sapino et al. 2006).

Pengekspresan SMA pula menunjukkan positiviti paling tinggi pada tumor filodes benigna iaitu sebanyak 62.8% berbanding 41.2% kes tumor filodes pinggir dan 57.1% tumor filodes malignan yang positif SMA ($p>0.05$) (Rajah 5). Kajian lalu berpendapat bahawa peningkatan sel miofibroblas yang positif SMA pada komponen stroma menunjukkan tumorigenesis tumor malignan (Cimpean et al. 2005). Proliferasi dan pembezaan miofibroblas dikawal atur oleh ER melalui aktiviti faktor transkripsi. Hal ini seiring dengan ko-pengekspresan ER β dengan SMA ($p=0.047$) dan peningkatan pengekspresan kedua-duanya dengan gred histologi tumor. Hasil ini mencadangkan



RAJAH 4. Peratus (%) kes ER β positif yang menunjukkan SMA positif (ER β /SMA+) dan negatif (ER β /SMA-). Ko-pengekspresan ER β dan SMA (ER β /SMA+) menunjukkan hubungan signifikan ($p=0.047$).

Nota: Tidak termasuk satu kes tumor filodes benigna disebabkan kehilangan titik tisu TMA



RAJAH 5. Peratus (%) kes yang menunjukkan pengekspresan SMA pada sel stroma tumor filodes benigna, pinggiran dan malignan

bahawa proliferasi sel stroma berlaku melalui aktivasi ER β yang berfungsi sebagai perangsang pembezaan sel stroma. Kajian lepas terhadap protein dan mRNA mendapati ekspresi ER β berhubung kait dengan pembezaan otot licin pada sel stroma dan umur pesakit (Sapino et al. 2006). Hubungan antara ER β dengan SMA dan umur mungkin dipengaruhi oleh tindakan ER β yang mengawal faktor pertumbuhan terbitan platelet (PDGF) (Patrone et al. 2003) yang mengawal atur pertumbuhan invasif serta pembezaan sel otot licin dan fibroblas kepada miofibroblas (Kilariski et al. 2005). Malah, kajian mendapati sitokin PDGF ini berhubung kait dengan peningkatan proliferasi stroma dan grad histologi tumor filodes (Feakins et al. 2000). Oleh itu, tindakan ER β menyumbang kepada permulaan dan perkembangan transformasi neoplasma (Gustafsson et al. 1999) dan mungkin berpotensi bertindak sebagai pilihan terapeutik terutama bagi tumor filodes malignan (Nakopoulou et al. 2004; Sapino et al. 2006).

KESIMPULAN

Peningkatan pengekspresan ER β dan SMA dengan peningkatan usia mencadangkan bahawa kedua-dua penanda molekul ini mungkin berperanan dalam risiko keterukan tumor filodes terutama pada tumor filodes malignan dan pesakit lebih tua.

PENGHARGAAN

Kajian ini telah dibiayai oleh dana dari Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM-GUP-BTK-07-15-195).

RUJUKAN

Ang, M.K., Ooi, A.S., Thike, A.A., Tan, P., Zhang, Z., Dykema, K., Furge, K., Teh, B.T. & Tan, P.H. 2011. Molecular classification of breast phyllodes tumors: Validation of the histologic grading scheme and insights into malignant progression. *Breast Cancer Research Treatment* 129: 319-329.

- Bubendorf, L., Nocito, A., Moch, H. & Sauter, G. 2001. Tissue microarray (TMA) technology: Miniaturized pathology archives for high-throughput *in situ* studies. *Journal of Pathology* 195: 72-79.
- Chen, C.M., Chen, C.J., Chang, C.L., Shyu, J.S., Hsieh, H.F. & Harn, H.J. 2000. CD34, CD117, and actin expression in phyllodes tumor of the breast. *Journal of Surgical Research* 94: 84-91.
- Chong, J.K. & Woo, H.K. 1993. Patterns of p53 expression in phyllodes tumors of the breast. *Journal of Korean Medical Science* 8(5): 325-328.
- Chua, C.L., Thomas, A. & Ng, B.K. 1989. Cystosarcoma phyllodes: A review of surgical options. *Surgery* 105: 141-147.
- Cimpean, A.M., Raica, M. & Narita, D. 2005. Diagnostic significance of the immunexpression of CD34 and smooth muscle cell actin in benign and malignant tumors of the breast. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 46(2): 123-129.
- Clark, S.E., Warwick, J., Carpenter, R., Bowen, R.L., Duffy, S.W. & Jones, J.L. 2011. Molecular subtyping of DCIS: Heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. *British Journal of Cancer* 104: 120-127.
- Feakins, R.M., Mulcahy, H.E., Nickols, C.D. & Wells, C.A. 1999. p53 expression in phyllodes tumours is associated with histological features of malignancy but does not predict outcome. *Histopathology* 35: 162-169.
- Feakins, R.M., Wells, C.A., Young, K.A. & Sheaff, M.T. 2000. Platelet-derived growth factor expression in phyllodes tumors and fibroadenomas of the breast. *Human Pathology* 31(10): 1214-1222.
- Esposito, N.N., Mohan, D., Brufsky, A., Lin, Y., Kapali, M. & Dabbs, D.J. 2006. Phyllodes tumor. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 30 cases. *Archives Pathology & Laboratory Medicine* 130: 1516-1521.
- Glass, A.G., Lacey Jr., J.V., Carreon, J.D. & Hoover, R.N. 2007. Breast cancer incidence, 1980-2006: Combined roles of menopausal hormone therapy, screening mammography, and estrogen receptor status. *Journal of the National Cancer Institute* 99: 1152-1161.
- Gustafsson, J.A. 1999. Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology* 163: 379-383.

- Iau, P.T., Lim, T.C., Png, D.J. & Tan, W.T. 1998. Phyllodes tumour: An update of 40 cases. *ANNALS Academy of Medicine Singapore* 27(2): 200-203.
- Jacobs, T.W., Chen, Y.Y., Guinee, D.G.Jr., Holden, J.A., Cha, I., Bauermeister, D.E., Hashimoto, B., Wolverson, D. & Hartzog, G. 2005. Fibroepithelial lesions with cellular stroma on breast core needle biopsy: Are there predictors of outcome on surgical excision? *American Journal of Clinical Pathology* 3: 342-354.
- Jara-Lazaro, A.R. & Tan, P.H. 2009. Molecular pathogenesis of progression and recurrence in breast phyllodes tumors. *American Journal of Translational Research* 1(1): 23-34.
- Kilarski, W.W., Jura, N. & Gerwins, P. 2005. An *ex vivo* model for functional studies of myofibroblasts. *Laboratory Investigation* 85(5): 643-654.
- Kuijper, A., Buerger, H., Simon, R., Schaeter, K.L., Croonen, A., Boecker, W., van der Wall, E. & van Diest, P.J. 2002. Analysis of the progression of fibroepithelial tumours of the breast by PCR-based clonality assay. *Journal of Pathology* 197(5): 575-581.
- Liporace, J., Willcox, K. & Thomas, D.A. 2008. Neurologic considerations in the postmenopausal women. Dlm *Clinical Neurology of the Older Adult*. Edisi ke-2, disunting oleh Siven, J.I. & Malamut, B.L. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. hlm. 54-64.
- Munirah, M.A., Siti-Aishah, M.A., Reena, M.Z., Sharifah, N.A., Rohaizak, M., Norlia, A., Rafie, M.K.M., Asimiati, A., Hisham, A., Fuad, I., Shahrin, N.S. & Das, S. 2011. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 52(2): 669-677.
- Nakopoulou, L., Lazaris, A.C., Panayotopoulou, E.G., Giannopoulou, I., Givalos, N., Markaki, S. & Keramopoulos, A. 2004. The favourable prognostic value of estrogen receptor β immunohistochemical expression in breast cancer. *Journal of Clinical Pathology* 57: 523-528.
- Noranizah, W., Siti-Aishah, M.A., Munirah, M.A., Norazlin, M.H., Rohaizak, M., Naqiyah, I., Sharifah, N.A. & Das, S. 2010. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 in breast lesions. *Clinica Terapeutica* 161(2): 129-137.
- Nurhayati, H.M., Reena, M.Z., Siti-Aishah, M.A., Rohaizak, M., Jasmi, A. & Srijit, D. 2012. ER, p53 and MIB-1 are significantly associated with malignant phyllodes tumor. *Biomedical Journal* 35(6): 486-492.
- Patrone, C., Cassel, T.N., Pettersson, K., Piao, Y.S., Cheng, G., Ciana, P., Maggi, A., Warner, M., Gustafsson, J.A. & Nord, M. 2003. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Molecular of Cell Biology* 23(23): 8542-8552.
- Rousseau, M.E. 2004. Health care of midlife and aging women. Dlm *Varney's Midwifery*. Edisi ke-4, disunting oleh Varney, H., Kriebs, J.M. & Geger, C.L. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers.
- Sapino, A., Bosco, M., Cassoni, P., Castellano, I., Arisio, R., Cserni, G., Dei Tos, A.P., Fortunati, N., Catalano, M.G. & Bussolati, G. 2006. Estrogen receptor- β is expressed in stromal cells of fibroadenoma and phyllodes tumors of the breast. *Modern Pathology* 19: 599-606.
- Scobie, G.A., Macpherson, S., Millar, M.R., Groome, N.P., Romana, P.G. & Saunders, P.T.K. 2002. Human oestrogen receptor: Differential expression of Eralpha and beta and the identification of Erbata variants. *Steroids* 67: 985-992.
- Shaaban, A., O'Neill, P.A., Davies, M.P.A., Sibson, R., West, C.R., Paul, H. & Christopher, S. 2003. Declining estrogen receptor-[beta] expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology* 12(27): 1502-1512.
- Shantakumar, S., Terry, M.B., Teitelbaum, S.L., Britton, J.A., Millikan, R.C., Moorman, P.G., Neugut, A.I. & Gammon, M.D. 2007. Reproductive factors and breast cancer risk among older women. *Breast Cancer Research and Treatment* 102: 365-374.
- Sotharan, W., Domjan, J., Jeffrey, M., Wise, M.H. & Perry, P.M. 2005. Phyllodes tumours of the breast- a retrospective study from 1982-2000 of 50 cases in Portsmouth. *Annals of Royal College of Surgeons of England* 87: 339-344.
- Speirs, V., Skliris, G.P., Burdall, S.E. & Carder, P.J. 2002. Distinct expression patterns of ER α and ER β in normal human mammary gland. *Journal of Clinical Pathology* 55: 371-374.
- Tan, P.H., Jayabaskar, T., Chuah, K.L., Lee, H.Y., Tan, Y., Hilmy, M., Hung, H., Selvarajan, S. & Bay, B.H. 2005. Phyllodes tumors of the breast. The role of pathologic parameters. *American Journal of Clinical Pathology* 123: 529-540.
- Tan, P.H., Tse, G., Lee, A., Simpson, J.F. & Hanby, A.M. 2012a. Fibroepithelial tumors. Dlm. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology WHO Classification of Tumours of the Breast* disunting oleh Lakhani, S.R., Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H. & van de Vijver, M.J. Lyon: IARC Press.
- Tan, P.H., Thike, A.A., Tan, W.J., Myint Thu, M.M., Busmanis, I., Li, H., Chay, W.Y., Tan, M.H. & The Phyllodes Tumour Network Singapore. 2012b. Predicting clinical behaviour of breast phyllodes tumours: A nomogram based on histological criteria and surgical margins. *Journal of Clinical Pathology* 65(1): 69-76.
- Tsai, W.C., Jin, J.S., Yu, J.C. & Sheu, L.F. 2006. CD10, Actin, and Vimentin expression in breast phyllodes tumors correlates with tumor grade of WHO grading. *International Journal of Surgical Pathology* 14: 127-131.
- Tse, M.K., Lee, C.S., Kung, Y.L., Scolyer, F., Law, R.A., Bonita, K.B., Lau, T.S. & Putti, T.C. 2002. Hormonal receptors expression in epithelial cells of mammary phyllodes tumors correlates with pathologic grade of the tumor. A multicenter study of 143 cases. *American Journal of Clinical Pathology* 118: 522-526.
- Tse, M.K., Chai, B., Lau, K.M., Scolyer, R., Lee, C.S., Karim, R.Z., Putti, T.C., Law, B.K., Lui, P.C. & Tan, P.H. 2007. Endothelin-1 expression correlates with a typical histological features in mammary phyllodes tumours. *Journal of Clinical Pathology* 60(9): 1051-1056.
- Wittliff, J.L., Pasic, R. & Bland, K.I. 1998. Steroid and peptide hormone receptors: Methods, quality control and clinical use. Dlm *The Breast: Comprehensive Management of Benign and Malignant Diseases*. Edisi pertama, disunting oleh Bland, K.I. & Copeland, E.M. Philadelphia: Elsevier Saunder Publisher.
- Yonemori, K., Hasegawa, T., Shimizu, C., Shibata, T., Matsumoto, K., Kauno, T., Ando, M., Katsumata, N. & Fujiwara, Y. 2006. Correlation of p53 and MIB-1 expression with both the systemic recurrence and survival in cases of phyllodes tumors of the breast. *Pathology, Research & Practice* 202: 705-712.
- Zainal, A.O. & Nor-Saleha, I.T. 2011. *Malaysia Cancer Statistics-Data and Figure*. National Cancer Registry Report. Kuala Lumpur: Ministry of Health Malaysia.

Nurhayati H. Munawar, Siti-Aishah Md Ali* & Reena Md Zin
Jabatan Potologi
Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia (PPUKM)
56000 Kuala Lumpur
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: saishah@ppukm.ukm.edu.my

Diserahkan: 6 Disember 2012

Diterima: 18 Mei 2013

Rohaizak Muhammad
Jabatan Surgeri
Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia (PPUKM)
56000 Kuala Lumpur
Malaysia