

PGV-1 menurunkan ekspresi faktor angiogenesis (VEGF dan COX-2) pada sel T47D terinduksi estrogen

PGV-1 decreases angiogenic factor (VEGF and COX-2) expression on T47D cell induced by estrogen

Edy Meiyanto ¹⁾, Rosita Melannisa ²⁾ dan Muhammad Da'i ²⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada Jogjakarta

²⁾ Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

Abstrak

Kanker payudara banyak diderita kaum wanita di Indonesia setelah kanker leher rahim. Metastasis tumor merupakan penyebab kematian utama pada penderitanya. Angiogenesis diperlukan oleh sel tumor untuk dapat bermetastasis secara efektif. Senyawa 17 β -estradiol diketahui dapat menstimulasi proliferasi dan angiogenesis pada sel kanker payudara yang mengekspresikan reseptor estrogen (ER), T47D (sel kanker payudara). Pentagamavunon-1 atau PGV-1 [2,5-*bis*(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin) siklopentanon] merupakan analog kurkumin [1,7-*bis*-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,6-heptadiena-3,5-dion]. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek sitotoksik dan antiangiogenik PGV-1 dibandingkan dengan kurkumin pada sel T47D yang diinduksi 17 β -estradiol 10^{-8} M. Hasil penelitian menunjukkan nilai IC_{50} PGV-1 adalah 3,16 μ M lebih bersifat sitotoksik dibanding kurkumin (IC_{50} = 19,05 μ M). Ekspresi protein diamati menggunakan metode imunositokimia. PGV-1 5 μ M dan kurkumin 20 μ M menurunkan ekspresi VEGF dan COX-2. Hasil tersebut membuktikan bahwa PGV-1 memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai senyawa antiangiogenesis.

Kata kunci : PGV-1, kurkumin, 17 β -estradiol, angiogenesis

Abstract

Breast cancer is the most common cancer occurring in women after cervix cancer in Indonesia. Tumor metastasis is the major cause of mortality in breast cancer. For a tumor cell to metastasize effectively, it must induce angiogenesis. 17 β -estradiol has been shown to stimulate the proliferation and angiogenesis of breast cancer cells which express estrogen receptor (ER), T47D (human breast cancer cell line). In the present study Pentagamavunon-1 or PGV-1 [2,5-*bis*-(4'-hydroxy-3',5'-dimethylbenzylidene)-cyclopentanone], an analogue of curcumin [1,7-*bis*-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione], were tested on their cytotoxicity and suppression effect on angiogenic factors (i.e. VEGF and COX-2) on the breast cancer cell lines (T47D) induced by 17 β -estradiol 10^{-8} M. The results showed that PGV-1 performed cytotoxicity effect againsts T47D cells with IC_{50} values 3,16 μ M. This was more potent than curcumin (IC_{50} = 19,05 μ M). PGV-1 5 μ M and curcumin 20 μ M decrease VEGF and COX-2 expression. These results suggest both compounds possessed antiangiogenic potential.

Key words : PGV-1, curcumin, 17 β -estradiol, angiogenesis

Pendahuluan

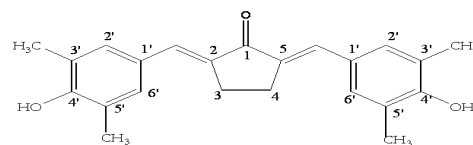
Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita di berbagai belahan dunia. Kebanyakan penderita kanker payudara (60-70%) terlambat mendapat pengobatan sehingga mengakibatkan kematian. Penyebab utama kematian tersebut adalah metastasis tumor. Angiogenesis merupakan salah satu tahap penting pada proses metastasis (Klauber-DeMore *et al.*, 2001). Angiogenesis memerlukan stimulasi sel-sel endotelial pembuluh darah oleh faktor angiogenik di antaranya *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang paling poten (Sledge and Miller, 2003).

Terdapat hubungan antara resiko kanker payudara dengan paparan estrogen. Beberapa bukti menunjukkan adanya implikasi estrogen endogen dan eksogen terhadap patogenesis kanker payudara. Estrogen yang paling poten dan paling banyak jumlahnya dalam tubuh adalah 17β -estradiol (E2). Estrogen adalah stimulator poten pada proliferasi sel-sel epitel payudara. Estrogen berikatan dengan reseptor estrogen dan mengaktifasi gen-gen yang responsif terhadap estrogen. Kira-kira dua per tiga kanker payudara mengekspresi reseptor estrogen (ER) pada level yang cukup tinggi dan setengahnya responsif terhadap manipulasi hormonal. (Clemons and Goss, 2001). Estrogen dapat memacu terjadinya angiogenesis pada payudara. Buteau-Lozano *et al.* (2002) meneliti E2 meningkatkan ekspresi VEGF pada sel MCF-7.

Kurkumin (1,7-*bis*(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,6-heptadiena-3,5-dion) yang merupakan komponen aktif dari rhizoma *Curcuma longa* L. menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis di antaranya sebagai antiinflamasi, antikarsinogenik, dan antiinfeksi. Bukti lain menunjukkan kurkumin dapat menghambat inisiasi, promosi, dan metastasis tumor. Kurkumin memberikan efek antiproliferasi pada berbagai sel kanker termasuk sel kanker payudara sehingga potensial dikembangkan sebagai antikanker. Kurkumin aman untuk digunakan. Berdasarkan uji klinis pada manusia, kurkumin memperlihatkan keamanan hingga dosis 10 g/hari (Mehta *et al.*, 1997). Kurkumin telah diteliti dan berpotensi sebagai antiangiogenesis (Gururaj *et al.*, 2002). Kemampuan kurkumin sebagai

antikanker kemungkinan dikaitkan dengan sifat antistrogenik kurkumin (Shao *et al.*, 2002)

Pengembangan studi hubungan struktur dan aktivitas kurkumin yang dilakukan oleh Tim Molnas Fakultas Farmasi UGM memperoleh senyawa analog kurkumin antara lain PGV-1 (pentagamavunon-1) atau 2,5-*bis*(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin)siklopentanon (No. Paten: US 6,777,477 B2) (Gambar 1B).



Gambar 1. Struktur pentagamavunon-1 (PGV-1) 2,5-*bis*(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin)siklopentanon

PGV-1 telah diteliti memiliki aktivitas antioksidan. Penghambatan siklooksigenase (COX) mendukung aktivitas antiinflamasinya (Tim Molnas Fak. Farmasi UGM, 2001). PGV-1 mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan mekanisme kematian kemungkinan melalui apoptosis (Data Belum dipublikasi). Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan PGV-1 memiliki aktivitas yang mirip bahkan beberapa lebih baik dibanding kurkumin dan analog kurkumin lainnya. Berdasarkan informasi-informasi di atas, aktivitas PGV-1 sebagai antikanker perlu dibuktikan pada sel kanker payudara T47D yang diinduksi E2 secara *in vitro* sebagai upaya untuk menemukan obat baru untuk kanker payudara.

Metode Penelitian

Bahan

Senyawa uji

Senyawa uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah PGV-1 (No. Paten: US 6,777,477 B2) dan kurkumin yang diperoleh dari Dr. Supardjan A.M., M.S., Apt. (Tim Molnas Fakultas Farmasi UGM). Untuk induksi estrogen digunakan 17β -estradiol (Sigma).

Uji Sitotoksitas

Cell line T47D (diperoleh dari Prof. Tatsuo Takea, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang), medium RPMI 1640, medium PRF (*phenol red free*) RPMI 1640 (GIBCO), medium

penumbuh mengandung *growth factor* 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) - 0,5 % fungison - 2 % antibiotik penisilin dan streptomisin (GIBCO).

Cara penelitian Uji sitotoksitas

Suspensi sel dalam medium PRF RPMI 1640 sebanyak 100 μ l (kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran (Nunc) berbeda dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% (Nuair IR autoflow). Medium diganti dengan medium yang telah ditambah E2 sehingga konsentrasi akhir E2 pada sumuran adalah 10^{-8} M kecuali pada kontrol sel. Kemudian ditambahkan sampel 100 μ l dalam medium pada tiap sumuran yang berbeda sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi kadar tertentu (PGV-1: 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 μ M dan kurkumin: 50; 25; 15; 10; 5; 2,5 μ M), seri kadar dibuat dari *stock* larutan dengan pelarut DMSO kadar 50 mM (Sigma). Selanjutnya *plate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% selama 48 jam pada suhu 37° C. Pada akhir inkubasi, medium pada masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan PBS, kemudian ditambahkan 100 μ l medium baru dan 15 μ l MTT 0,5 % dalam PBS. *Plate* diinkubasi lagi selama 6 jam pada suhu 37° C. Sel hidup akan bereaksi dengan MTT (Sigma) membentuk formazan yang berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam larutan SDS 10% dalam HCl 0,1 N (E.Merck), lalu diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan ELISA reader (SLT 240 ATC) pada panjang gelombang 550 nm. Persentase sel hidup dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ sel hidup} = (\text{abs p} - \text{abs m}) / (\text{abs k} - \text{abs m}) \times 100\%$$

Keterangan :

abs : absorbansi, p : perlakuan sampel, k : kontrol, m : media

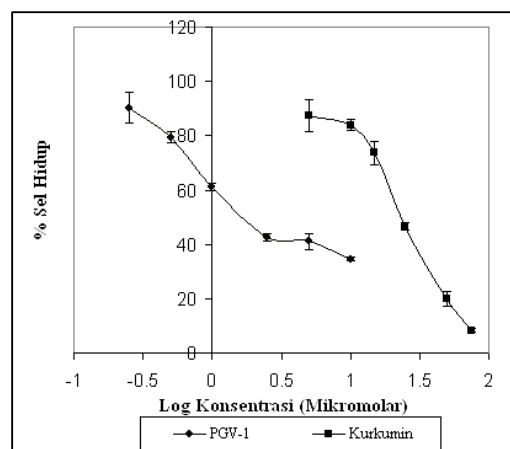
Uji Immunositokimia

Sel (kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran) ditanam pada *plate* 24 sampai 80 % konfluen. Sehari sebelum perlakuan medium diganti dengan medium PRF RPMI 1640. Setelah itu diinkubasi dengan senyawa uji (PGV-1 5 μ M dan kurkumin 20 μ M) selama 24 jam. Sel yang telah diinkubasi dipanen dan dibuat apusan pada gelas obyek (*poly-L-lysine slide*). Preparat difiksasi dengan aseton (E.Merck). Preparat diletakkan dalam *normal mouse serum* (1:50) selama 15 menit. Dibuang (tanpa cuci), lalu ditetesi dengan Primer Antibodi Monoklonal anti COX-2 (Nova Castra) dan VEGF (Santa Cruz) (pengenceran 1:50) selama 60 menit dan dicuci dalam PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dalam biotin selama 10

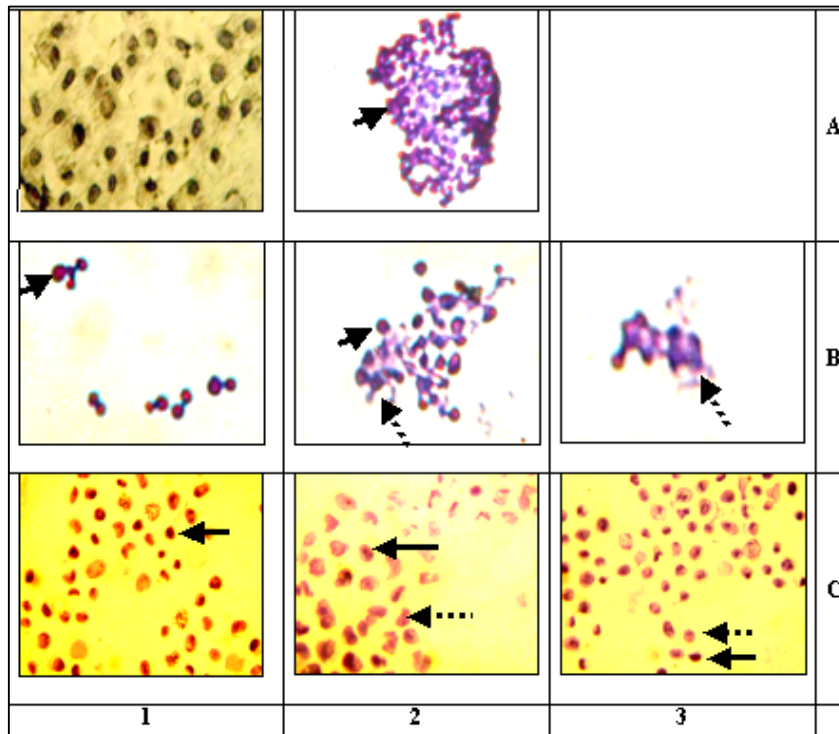
menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit. Kemudian preparat diinkubasi dalam *streptavidin-peroksidase* (Lab Vision) selama 10 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak 2 kali selama 5 menit. Selanjutnya, preparat diinkubasi dalam kromogen 3,3-diaminobenzidin/ DAB (Lab Vision) selama 3-8 menit dan dicuci dengan akuades. Preparat direndam dalam hematoksin (Dako) selama 3-4 menit untuk *counterstain* dan dicuci dengan akuades. Ekspresi protein diamati menggunakan mikroskop cahaya. Sel yang mengekspresikan protein tertentu akan memberikan warna coklat/gelap, sedangkan yang tidak memberikan warna ungu. Kuantifikasi dilakukan dengan mengamati sel yang mengekspresi protein (+) setiap 100 sel yang diamati.

Hasil Dan Pembahasan

Sel T47D mengekspresikan reseptor estrogen dan proliferasinya ditingkatkan oleh estrogen eksogen (Schafer *et al.*, 2000). Hasil pengamatan AgNOR menunjukkan sel yang diinduksi E2 10^{-8} memiliki tingkat proliferasi lebih tinggi dibanding sel kontrol yang tidak diinduksi estrogen (Melannisa, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa E2 dibutuhkan dalam proliferasi sel T47D tetapi hanya dalam jumlah kecil (*trace* E2 dalam serum). Induksi E2 pada sel kanker payudara ZR-75 meningkatkan proliferasinya dan memberikan efek maksimal pada konsentrasi 10^{-10} sampai 10^{-8} M tetapi efek



Gambar 2. Uji Sitotoksitas PGV-1 dan kurkumin pada sel T47D (n=3) Perhitungan dengan menggunakan analisis probit diperoleh nilai IC₅₀ PGV-1 adalah 3,16 μ M dan nilai IC₅₀ kurkumin adalah 19,05 μ M



Gambar 3. Fotomikroskopis hasil immunositokimia ER (A.1) dan VEEGF pada sel T47D (A.2). (B) VEGF pada sel T47D (1) induksi estrogen (2) induksi PGV-1 5 μ M (3) induksi kurkumin 10 μ M. (C) COX-2 pada sel T47D (1) kontrol tanpa perlakuan (2) induksi PGV-1 5 μ M (3) induksi kurkumin 10 μ M

Ekspresi (+): Ekspresi (-):

Tabel I. Ekspresi VEGF pada sel T47D dengan berbagai perlakuan, diamati dengan metode immunositokimia dengan menggunakan kromogen DAB

Ekspresi VEGF (%)	
Kontrol	49
E2	88
PGV-1 5 μ M	26
Kurkumin 20 μ M	51

ini dapat diamati secara reproduibel jika

sebelumnya serum telah diperlakukan dengan *dextran-charcoal* (Dabre *et al.*, 1983). Untuk itu pada uji ini dilakukan induksi estrogen terhadap sel kanker payudara yang diberi perlakuan dengan PGV-1 dan kurkumin.

Pemberian PGV-1 konsentrasi tertinggi (10 μ M) diperoleh nilai rata-rata *viability cells* sebesar 36,02 %. Pada konsentrasi kurkumin tertinggi (75 μ M) diperoleh nilai rata-rata *viability cells* sebesar 8,21 %. Perhitungan dengan menggunakan analisis probit diperoleh nilai IC_{50} PGV-1 adalah 3,16 μ M dan nilai IC_{50} kurkumin adalah 19,05 μ M.

Hasil uji tersebut membuktikan bahwa PGV-1 memiliki potensi lebih besar untuk menghambat proliferasi sel dan menghambat ekspresi-ekspresi protein yang doregulasi oleh estrogen reseptor. Paparan estrogen pada kanker payudara selain meningkatkan aktivitas proliferasi juga meningkatkan angiogenesis

dengan meningkatkan ekspresi VEGF sehingga terapi dengan antiestrogen dapat menghambat angiogenesis dengan menghambat ekspresi VEGF (Buteau-Lozano *et al.*, 2002).

Kurkumin diduga memiliki aktivitas antiestrogen (Shao *et al.*, 2002) sehingga dilakukan uji antiangiogenesis pada sel T47D yang diinduksi estrogen 10^{-8} M akibat perlakuan PGV-1 5 μ M dan kurkumin 20 μ M dengan pengamatan ekspresi VEGF menggunakan metode imunositokimia (Gambar 3; Tabel I).

Konfirmasi ekspresi estrogen reseptor (ER) pada sel T47D dengan imunositokimia menunjukkan ekspresi ER +. Induksi estrogen 10^{-8} M pada sel T47D menunjukkan peningkatan ekspresi VEGF dibandingkan kontrol (Gambar 2 dan Tabel I). Peningkatan ekspresi VEGF kemungkinan disebabkan induksi estrogen melalui jalur ER. Efek ini dihambat akibat perlakuan PGV-1 5 μ M dan kurkumin 20 μ M, sehingga kemungkinan PGV-1 dan kurkumin memiliki aktivitas antiestrogen. Shao *et al.*, 2002 membuktikan kurkumin dapat menghambat estrogen pada interaksinya dengan ER (Gambar 3; Tabel I).

Jalur lain yang memacu terjadinya angiogenesis adalah jalur siklooksigenase

(COX-2) (Gately, 2000). Inhibitor COX-2 dapat menghambat angiogenesis (Vainio, 2003). Aktivitas penghambatan COX-2 oleh PGV-1 dan kurkumin dengan imunositokimia. Hasil pengamatan ekspresi COX-2 (Gambar 2) menunjukkan ekspresi COX-2 akibat perlakuan PGV-1 dan kurkumin menurun dibanding kontrol walaupun tidak terlihat secara nyata. Penurunan ini lebih kuat pada perlakuan PGV-1 dibanding kurkumin sehingga dapat dikatakan PGV-1 lebih kuat menghambat ekspresi COX-2 dibanding kurkumin.

Aktivitas penghambatan ekspresi COX-2 oleh PGV-1 sebagaimana kurkumin kemungkinan disebabkan penghambatan NF- κ B. Kurkumin dapat menghambat NF- κ B dan IkB α . Hal ini berakibat pada penurunan ekspresi COX-2 (Shishodia *et al.*, 2003).

Kesimpulan

PGV-1 menurunkan ekspresi VEGF dan COX-2 pada sel T47D yang diinduksi E2 10^{-8} M lebih kuat dibanding kurkumin sehingga berpotensi sebagai senyawa anti angiogenesis.

Daftar Pustaka

- Buteau-Lozano, H., Ancelin, M., Lardeux, B., Milanini, J., and Perrot-Appanat, M., 2002, Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: A complex interplay between estrogen receptors α and β , *Cancer Res.*, 62, 4977–4984.
- Clemons, M. and Goss, P., 2001, Estrogen and the risk of breast cancer, *N. Engl. J. Med.*, 344(4), 276-285.
- Dabre, P., Yates, J., Curtis, S., and King, R.J., 1983, Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture, *Cancer Res.*, 43, 349-354.
- Gately, S., 2000, The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis, *Cancer & Metastatic Res.*, 19, 19-27.
- Gururaj, A. E., Belakavadi M., Venkatesh, D. A., Marm, D., and Salimatha, B. P., 2002, Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 297, 934–942.
- Klauber-DeMore, N., Zee, K.J.V., Linkov, I., Borgen, P.I., and Gerald, W.L., 2001, Biological behavior of human breast cancer micrometastases, *Clin. Cancer Res.*, 7, 2434-2439
- Mehta, K., Pantazis, P., McQueen, T., and Aggarwal, B.B., 1997, Antiproliferative effect of curcumin (diferuloylmethane) against human breast tumor cell lines, *Anticancer Drugs*, 5, 470-81.
- Melannisa, R., 2004, Pengaruh PGV-1 Pada Sel Kanker Payudara Yang Diinduksi 17 β -Estradiol: Kajian Antiproliferasi, Pemacuan Apoptosis dan Antiangiogenesis, Tesis, Sekolah Pascasarjana, UGM, Yogyakarta

- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and Jordan, V.C., 2000, Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice, *Clin. Cancer Res.*, 6, 4373-4380.
- Shao, Z., Shen, Z., Liu, C., Sartippour, M.R., Go, V.L., Heber, D., and Nguyen, M., 2002, Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells, *Int. J. Cancer*, 98, 234-240.
- Shishodia, S., Potdar, P., Gairola, C.G., and Aggarwal, B.B., 2003, Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates cigarette smoke-induced NF- κ B activation through inhibition of I κ B α kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and cyclin D1, *Carcinogenesis*, 24(7), 1269-1279.
- Sledge Jr., G.W. and Miller, K.D., 2003, Review exploiting the hallmarks of cancer: the future conquest of breast cancer, *Eur. J. Cancer*, 39, 1668-1675.
- Tim Molnas Fak. Farmasi UGM, 2001, *Uji Anti-Inflamasi Senyawa PGV-0, PGV-1 dan HGV-1 Pada Tikus Jantan dan Betina dan Elusidasi Mekanisme Anti-Inflamasi (Uji Inhibisi Siklooksigenase dan Uji Antioksidasi) Senyawa PGV-0, PGV-1 dan HGV-1*, Laporan Penelitian Tim Molnas, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Vainio, H., 2003, Targeting angiogenesis – a novel mode in cancer chemoprevention, *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, 4, 83-86.