

Eksresi Faktor Antiangiogenesis Thrombospondin-1 (TSP-1) dan Angiostatin Kanker Payudara Invasif

Ambar Mudigdo, Dyah Ratna Budiani, Riza Novierti Pesik, Novan Adi Setyawan

Bagian/Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret
Surakarta

ABSTRAK

Latar belakang

Angiogenesis merupakan salah satu karakter sel kanker ganas. Aktivitas angiogenesis banyak dipertimbangkan sebagai salah satu penentu prognosis kanker payudara invasif. Tubuh memiliki faktor-faktor endogen yang berperan sebagai antiangiogenesis, seperti thrombospondin-1 (TSP1) dan angiostatin. TSP1 adalah faktor antiangiogenesis yang *dependent* pada p53 *wild type*. Ekspresi TSP-1 diinduksi oleh faktor transkripsi P53 WT. Pada beberapa malignansi mammae terjadi mutasi pada gen p53, sehingga TSP1 tidak dapat diekspresikan. Ketidakhadiran TSP1 diduga akan memunculkan prognosis yang lebih buruk. Kajian ekspresi protein antiangiogenesis ini diharapkan dapat digunakan sebagai salah satu indikator prognosis pada kanker payudara *invasive ductal carcinoma mammae* yang terbagi dalam 4 sub-tipe: Luminal A; Luminal B; Her2 (*over expression*) dan *Triple negative/Basal-like*. Tujuan penelitian ini menganalisis ekspresi faktor antiangiogenesis thrombospondin-1 (TSP-1) dan angiostatin kanker payudara invasif.

Metode

Sebanyak 20 blok parafin jaringan kanker payudara *invasive ductal carcinoma* dari Bagian Patologi Anatomi RS Dr. Moewardi tahun 2013 dibagi ke dalam empat kelompok berdasarkan status ekspresi estrogen receptor, progesteron receptor dan Her2/neu sebagai berikut: sub tipe *Luminal A* (ER+/PR+/Her2 negatif); sub tipe Luminal B (ER-/PR dan Her2 positif); Sub tipe *Her2 over expression* (ER-/PR-/Her2+ over ekspresi); serta sub tipe *Triple negatif (basal-like tumor)*. Teknik imunohistokimia sistem ABC (avidin biotin-complex) digunakan dalam pewarnaan khusus untuk mengukur ekspresi TSP-1 dan Angiostatin, menggunakan anti bodi monoclonal anti-human TSP-1 dan anti-human Angiostatin. Nilai ekspresi dinyatakan dalam skala IDS, dengan rentang nilai=0 s.d. 300 IDS. Analisis data yang digunakan adalah uji beda berpasangan antar kelompok ($p<0,05$).

Hasil

Analisa statistik ekspresi antara TSP-1 sub-tipe *Triple negative basal-like* dan sub-tipe luminal A menunjukkan perbedaan bermakna, serta antara luminal A dengan sub tipe Her2 dan ekspresi TSP-1 tertinggi adalah sub tipe luminal A dengan nilai=236,0 IDS; ekspresi TSP-1 terendah adalah sub tipe *triple negatif*=57,6 IDS. Ekspresi angiostatin terendah adalah sub tipe Luminal A sebesar=183 IDS dan ekspresi angiostatin tertinggi adalah sub tipe *triple negative*=234,4.

Kesimpulan

Ekspresi TSP-1 mengindikasikan prognosis kanker payudara *invasive*, semakin tinggi nilai ekspresi TSP-1, prognosis kanker payudara invasif semakin baik. Ekspresi Angiostatin tidak mengindikasikan prognosis kanker payudara invasif.

Kata kunci : angiostatin, ER-PR & Her-2, *invasive ductal carcinoma mammae*, thrombospondin-1, *triple negative*.

ABSTRACT

Background

Angiogenesis is one of the characteristics of malignant cancer cells. Angiogenesis activity considered as one of many determinants of prognosis of invasive breast cancer. The body has endogenous factors that act as antiangiogenesis, such as thrombospondin-1 (TSP1) and angiostatin. TSP1 is an antiangiogenesis factor that is dependent on wild-type p53. TSP-1 expression is induced by the transcription factor p53 WT. In some breast malignancies occurs mutations in the p53 gene, so TSP1 can not be expressed. The absence of TSP1 expected to bring a worse prognosis. Study of antiangiogenesis protein expression is expected to be used as an indicator of prognosis in breast cancer invasive ductal mammary carcinoma which divided into four sub-types: luminal A; luminal B; Her2 (*over-expression*) and triple negative/basal-like. This study is to analyzed TSP-1 and angiostatin of invasive breast cancer.

Methods

A total of 20 paraffin blocks of breast cancer tissue invasive ductal carcinoma from Pathology Anatomy RS Dr. Moewardi in 2013 were divided into four groups based on the expression status of estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu as follows: luminal A subtype (ER+/PR+/Her2 negative); sub-type luminal B (ER-/PR and Her2 positive); Her2 over expression subtype (ER-/PR-/Her2 over-expression); and triple negative subtypes (basal-like tumors). Technique immunohistochemical ABC (avidin-biotin complex) used in special stains to measure the expression of TSP-1 and angiostatin, using monoclonal antibodies anti-human TSP-1 and anti-human angiostatin. Expression values are expressed in scale IDS, with a value range 0 to IDS 300. Analysis of the data used is difference test paired between groups ($p<0.05$).

Results

Statistic analyses of TSP-1 expression between subtypes triple negative/basal-like with the luminal A subtype showed significant differences, as well as between the luminal A subtype with Her2. The highest TSP-1 expression is an luminal A subtype (236.0 IDS), whilst the lowest expression is on triple negative subtype (57.6 IDS). The lowest angiostatin expression is on luminal A subtype (183 IDS), whilst the highest is on triple negative (234.4 IDS). Statistic analyses of angiostatin expression between luminal A subtype and triple negative subtype showed no significant differences.

Conclusion

Expression of TSP-1 could be used to determined invasive breast cancer prognosis, whilst expression of angiostatin could not be.

Key words : angiostatin, ER-PR & Her-2, *invasive ductal carcinoma mammae*, thrombospondin-1, triple negative.

PENDAHULUAN

Penentuan prognosis dan prediktif kanker payudara dengan dasar analisis makna ekspresi *estrogen receptor* (ER), *progesteron receptor* (PR) dan *epidermal growth factor receptor* (EGFR/HER2/neu/c-erbB2), sudah dilaksanakan di Indonesia setidaknya dalam 1 dasa warsa ini. Klasifikasi kanker payudara invasif berdasarkan ekspresi genomik menjadi 4 sub tipe: a. Luminal A (ER+/PR+/Her2-); b. Luminal B (ER+/PR-/Her2+); c. Her2 positif dan d. Sub tipe Triple Negatif.² Pemeriksaan ER/PR dan Her2 selain bertujuan untuk penentuan jenis terapi yang terarah dapat digunakan sebagai penentu prognosis kanker payudara invasif.^{1,2}

Sebanyak 12% kanker payudara luminal A dilaporkan memiliki mutasi *TP53* sedangkan sub tipe luminal B mengalami inaktivasi *TP53* akibat dari hilangnya *ATM* dan amplifikasi gen *MDM2*.² Kanker payudara *triple negative* (TNBC) atau dikenal sebagai basal like tumor, teridentifikasi sebagai berikut: (1). Gen *BRCA1* mutasi dan mengalami inaktivasi *BRCA1*; (2). Hilangnya gen *RB*; (3). Amplifikasi gen *Cyclin E1*; (4) Ekspresi gen *AKT3* yang berlebihan; (5) Gen *Myc* mengalami amplifikasi dan ekspresinya berlebihan; (6) Frekwensi mutasi *TP53* meningkat.³ Kanker payudara invasif sub tipe: Triple negative memiliki prognostic terburuk, dibandingkan dengan kelompok lain.^{3,4}

Pada penelitian lain dilaporkan bahwa subtype Her2 positif (*over ekspresi*) dan tipe luminal ER positif lebih berpeluang berkembang menjadi *subtype Basal-Like* (*triple negative*).⁴

Penentuan prognostic dan prediktif kanker payudara invasif dapat juga dilaksanakan dengan mengkaji faktor antiangiogenesis seperti Angiostatin dan Trombospondin-1 (TSP-1), karena peningkatan aktivitas angiogenesis atau neovaskularisasi merupakan salah satu ciri keganasan yang dimiliki oleh sel kanker. Angiogenesis berperan penting dalam pertumbuhan tumor dan metastasis. Meningkatnya sensitivitas sel tumor terhadap faktor-faktor pro-angiogenik menunjukkan prognosis penyakit yang memburuk. TSP-1 adalah inhibitor angiogenesis poten, penurunan regulasi ekspresi TSP-1 mengindikasikan adanya pertumbuhan tumor yang di modulasi angiogenesis pada beberapa variasi subtipe tumor. Ekspresi TSP-1 diinduksi oleh P53, regulasi negatif ekspresi TSP-1 diperankan onkogen seperti *Myc* dan Ras. TSP-1 dihasilkan oleh sel-sel stromal

fibroblast, sel endothelial dan sel imunosupresif. TSP-1 menghambat angiogenesis dengan cara menghambat migrasi sel dan proliferasi endothelial, dan memacu apoptosis sel ini. Namun pada sisi yang lainnya aktivasi TSP-1 terhadap TGFβ justru akan memacu progresi tumor.^{5,6}

Oleh karena itu dilakukan penelitian untuk menganalisis ekspresi faktor antiangiogenesis thrombospondin-1 (TSP-1) dan angiostatin kanker payudara invasif.

METODE PENELITIAN

Sebanyak 20 (dua puluh) blok parafin jaringan kanker payudara invasif dari pasien Rumah Sakit Dr. Muwardi, Surakarta dibedakan ke dalam 4 kelompok sebagai berikut :

Kelompok I : Luminal A

Kelompok II : Luminal B.

Kelompok III : Her2 *over-expression*

Kelompok IV : *Triple-negative/Basal-like*.

Penentuan kelompok tersebut didasarkan pada hasil analisis Immunohistokimia dengan menggunakan monoclonal antibody (MoAb) anti-Human Estrogen receptor (Biocare, dilusi 1:200); MoAb Anti human-Progesteron Receptor (Biocare, dilusi 1:200), dan MoAb Anti human-Her2/c-erbB2 (Santa Cruz 1:100), dengan sistem deteksi Avidin-Biotin Complex (Startrek universal Biocare). Ekspresi TSP1 dan Angiostatin dilaksanakan juga dengan teknik immunohistokimia dengan sistem deteksi yang sama. Penentuan ekspresi kedua faktor anti-angiogenik ini dilakukan dengan MoAb human anti-TSP1 (Santa Cruz, dilusi 1:100) dan MoAb anti-Angiostatin (Santa Cruz, dilusi 1:100). Interpretasi hasil ekspresi dituangkan dalam skala numerik *intensity distribution score* (IDS). Yang didapatkan dari formula sebagai berikut :

$$IDS = (%K \times 3) + (%S \times 2) + (%L \times 1) + (%N \times 0)$$

Di mana:

% K = persentase sel positif kuat

% S = persentase sel positif sedang

% L = persentase sel positif lemah

% N = persentase sel negatif

Nilai IDS = 0 s.d. 300.¹¹

Hasil pengamatan ditabulasikan dan dianalisis dengan uji beda berpasangan antar kelompok dengan p=0,05, menggunakan *soft ware* SPSS versi 20.

HASIL

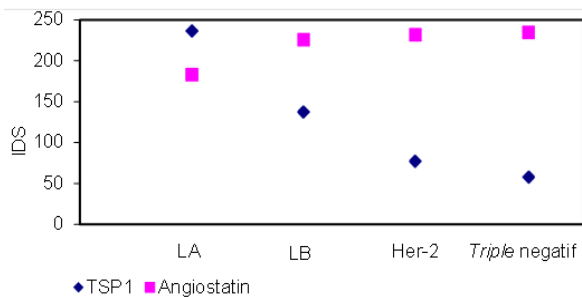
Penentuan nilai ekspresi TSP-1 pada 4 subtipe kanker payudara invasif yang diuji adalah seba-

gai berikut:

Tabel 1. Nilai IDS TSP-1 dan angiostatin kanker payudara invasif.

	Lum.A	Lum. B	Her-2	Triple negative Basal-like
TSP1	236 ^a	137.6 ^{a, b}	77 ^{b, c}	57.6 ^{b, c}
Angiostatin	183 ^a	225.6 ^a	231.6 ^a	234.4 ^a

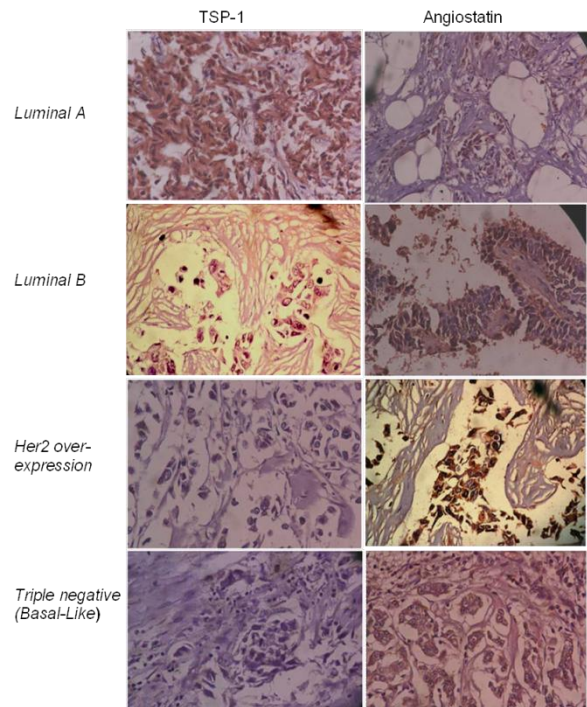
Profil IDS TSP-1 dan angiostatin pada 4 (empat) sub tipe kanker payudara invasif digambarkan dengan grafik berikut ini :



Gambar 1. Profil IDS TSP-1 dan angiostatin pada 4 sub tipe kanker payudara invasif: LA (Luminal A), LB (Luminal B), Her-2 (Her-2 over expression) dan triple negatif.

Nilai IDS yang didapatkan berdasarkan perhitungan sel positif TSP-1 (sitoplasmik) dengan warna coklat tua (kategori positif kuat), coklat muda (katategori positif sedang) dan kuning keemasan (kategori positif lemah). Sel negatif yang dihitung adalah sel yang tidak menunjukkan ekspresi warna kecoklatan dan hanya biru dan keunguan. Persentase nilai positif didapatkan dengan memperhitungkannya pada 9 (sembilan) lapang pandang searah jarum jam untuk setiap sediaan. Nilai IDS ditabulasikan dan dianalisis dengan uji t. Jarak perbedaan antar kelompok diuji dengan uji beda berpasangan antar kelompok (Tabel 1). Huruf indeks yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan nilai ekspresi antar kelompok yang diuji. Sedangkan huruf indeks yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p > 0,5$). Pada Tabel 1 dijelaskan bahwa nilai IDS angiostatin tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antar kelompok. Sebaliknya nilai IDS TSP1 menunjukkan perbedaan antara kelompok Luminal A dengan kelompok triple negatif ($p = 0,016$); dan antara luminal A dengan kelompok Her2 over ekspresi ($p = 0,014$). Hasil pewarnaan Immunohistokimia

dirangkum dalam Tabel 2 yang diabadikan pada skala perbesaran 400x.



Tabel 2. Hasil pengecatan immunohistokimia ekspresi TSP-1 dan angiostatin pada 4 sub tipe kanker payudara invasif (paraffin-embedded tissue). Perbesaran 400x .

DISKUSI

Ekspresi TSP1 pada kelompok luminal A (ER dan PR positif, Her2 negatif) menunjukkan nilai tertinggi 236 (IDS) dan terendah dimiliki oleh kelompok triple negative (ER negatif/PR negatif dan Her2 negatif) sebesar 57.6 (IDS). Hal ini menunjukkan bahwa pada sub tipe luminal A memiliki kemampuan yang baik dalam hal aksi antiangiogenesis yang diperankan oleh TSP1. Peran TSP-1 sebagai anti angiogenesis menurut beberapa sumber adalah sebagai faktor induksi apoptosis, mencegah migrasi dan proliferasi sel endotelial.^{5,6}

TSP-1 adalah protein antiangiogenesis poten yang diinduksi oleh p53WT.⁷ TSP-1 menghambat uptake miristate dengan cara berkompetisi memperebutkan binding-site dengan CD36. Menurunnya jumlah miristate yang berikatan dengan CD36 akan menurunkan recruitment Src ke membran plasma. Meningkatnya Src akan memacu angiogenesis, dengan direbutnya binding-site miristatse oleh TSP-1 akan menurunkan laju angiogenesis. Selain dari

hal tersebut TSP-1 juga akan memacu apoptosis sel endotelial dalam proses neovascularisasi melalui *binding-site* dengan CD36 juga.⁵⁻⁷

Beberapa kejadian malignansi terkait dengan mutasi pada TP53 sehingga faktor transkripsi P53 tidak dapat berperan dalam menginduksi beberapa gen yang termasuk dalam *down-stream effect* P53, seperti: p21, PCNA, PUMA, Noxa, Bax dan TSP-1. Akibatnya jumlah ekspresi gen-gen tersebut akan menurun atau tidak ada sama sekali. Keadaan ini akan mengakibatkan penghambatan 4 (empat) jalur utama fungsi p53, yaitu: penghambatan siklus sel, induksi repair DNA, induksi apoptosis, dan penghambatan angiogenesis. Jadi rendahnya tingkat ekspresi TSP-1 pada sub tipe Her2 dan triple negatif mengindikasikan rendahnya peran P53. Keadaan ini kemungkinan disebabkan oleh adanya mutasi pada *hot spot* gen TP53. Prognosis sub tipe Her2 over ekspresi dan sub tipe triple negatif makin memburuk dengan menurunnya tingkat ekspresi TSP-1. Menurunnya TSP-1 dalam hal ini mengindikasikan terpacunya mekanisme angiogenesis. Hasil analisis uji beda antar kelompok menunjukkan hasil bahwa antara luminal A tidak berbeda nyata dengan luminal B, sub tipe Her2 over ekspresi tidak berbeda nyata dengan sub tipe Triple negatif. Berdasarkan ekspresi TSP-1 maka dapat diramalkan bahwa prognosis terburuk dimiliki oleh sub tipe triple negatif, disusul Her2, luminal B dan prognosis terbaik adalah luminal A (ER dan PR positif, Her2 negatif).⁵⁻⁷

Mekanisme antiangiogenesis yang diperantarai angiostatin Kringle (K)1-3, K1-4 dan K1-4,5 diikuti peningkatan ekspresi p53 berikut *down-streams* efekturnya, meningkatkan FasL mediated signaling path-way, dan supresi aktivitas AKT. Setidaknya ada 3 (tiga) reseptor yang mengikuti aksi anti angiogenesis angiostatin seperti: Fas, integrin $\alpha\beta 3$ dan ATP sintase. Reseptor-reseptor ini juga berperan dalam aksi anti angiogenesis yang diperankan oleh molekul angiostatin. Angiostatin K1-3, K1-4 dan K1-4,5 melaksanakan aksi anti-angiogenesisnya melalui: penghambatan proliferasi, penghambatan migrasi, tube formation, dan induksi apoptosis sel endotelial. Dilaporkan juga bahwa mekanisme penghambatan angiogenesis yang diperantarai DAP K1 juga diinduksi oleh kehadiran angiostatin.⁸ Peran Angiostatin seba-

gai faktor anti angiogenesis pada kanker payudara invasif dalam penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antar sub tipe kanker payudara nilai $p > 0.05$. Namun dari semua sub tipe kanker payudara invasif yang diuji menunjukkan nilai IDS ekspresi Angiostatin yang tinggi 183-234.4 (IDS). Hal ini menunjukkan bahwa peran angiostatin sebagai faktor anti angiogenesis masih cukup baik. Angka tertinggi dimiliki oleh kelompok *triple-negatif* (234.4 IDS) dan terendah dimiliki luminal A (183 IDS). Ekspresi angiostatin dalam penelitian ini tidak menggambarkan buruknya prognosis kanker payudara invasif.⁹⁻¹¹

Peneliti terdahulu menyatakan bahwa masih perlu kajian lain digunakan sebagai pendukung seperti: grading histologi, tipe histopatologi, *nottingham prognostic index* (NPI), status ER, PR dan Her2.¹²

KESIMPULAN

Ekspresi TSP-1 mengindikasikan prognosis kanker payudara *invasive*, semakin tinggi nilai ekspresi TSP-1, prognosis kanker payudara invasif semakin baik. Ekspresi Angiostatin tidak mengindikasikan prognosis kanker payudara invasif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Riset ini dibiayai dari dana BOPTN Universitas Sebelas Maret No. kontrak 165/UN27.11/PN/2013. Ucapan Terimakasih dan penghargaan kami sampaikan kepada LPPM Universitas Sebelas Maret Surakarta.

DAFTAR PUSTAKA

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Roes CA *et al.* Molecular portrait of human breast cancer, *Nature*. 2000; 406: 747-52.
2. Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Hirsch JJ, Kela I, Kaminski N *et al.*, DNA microarray identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 2001; 20: 2225-34.
3. Perou CM. Molecular stratification of triple negative breast cancer. *Oncologist*. 2011; 16: 67-70.
4. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of basal-like

- sub-types of invasive breast carcinoma. *J Clin Cancer Res.* 2004;10: 5367-74.
5. Perou CM. The Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive molecular portrait of human breast tumours. *Nature* 2012; 490: 61-70.
 6. Yanagawa M, Ikemot K, Kawauchi S, Furuya T, Yamamoto S, Oka M *et al.* Luminal A, luminal B (Her2 negative) subtypes breast cancer consist of mixture of tumors with diference genotype. Licensee Bio Med Central Ltd. 2012; 5: 375.
 7. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanism, Targets, and Therapeutics.* Oxford: Oxford University Press; 2005.
 8. Chen YH, Wu HL, Li C, Huang YH, Chiang CW, Wu MP, *et al.* Antiangiogenesis mediated by angiostatin K1-3, K1-4 and K1-4.5. Involvement of p53, FasL, AKT and mRNA deregulation. *Thromb Haemost.* 2006; 95: 668-77.
 9. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist.* 2004; 9: 606-16.
 10. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *J Carcinogen* 2000; 21: 505-15.
 11. Winters ZE, Hunt NC, Brandburn MJ, Royds JA, Turley H, Harris AL *et al.* Subcellular localisation of cyclin B, cdc2 and p21, in breast cancer, association with prognosis. *Eur J Cancer.* 2001; 37: 2405-12.
 12. Nahbholtz JM, Tonkin, K Reese DM, Aapro MT, Buzdar AU. *Breast cancer management, 2nd Edition.* Philadelphia: Lipincott William & Wilkins; 2003.