

Artikel Penelitian

Hubungan Ekspresi miR-21 dan miR-200c dengan Respons Terapi Sistemik Neoajuvan Pasien Kanker Payudara Stadium Lanjut

Sonar S. Panigoro,^{1*} Muchlis Ramli,¹ Ramadhan Karsono,² Lenny Sari²

¹Departemen Ilmu Bedah, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia-
RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta, Indonesia

²Rumah Sakit Kanker Dharmais, Jakarta, Indonesia

*Penulis Korespondensi : sonapanigoro@gmail.com

Disetujui: 29 Maret 2020

DOI: 10.23886/ejki.8.11716.

Abstrak

Kegagalan terapi pada kanker payudara stadium lanjut dihubungkan dengan ekspresi mikroRNA antara lain miR-21 dan miR-200c. Untuk mengetahui hubungan respons terapi sistemik neoajuvan serta ekspresi miR-21 dan miR-200c pada pasien kanker payudara, dilakukan studi potong lintang di RS Kanker Dharmais dan RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo (RSUPNCM) pada bulan Juli 2015 hingga April 2016. Subjek yang memiliki spesimen jaringan segar dan blok parafin serta telah mendapat pengobatan adekuat, dilakukan pengukuran miR-21 dan miR-200c dengan qRT-PCR. Hasil dinyatakan sebagai perbedaan cycle thresholds (ΔCt) terhadap U6 snRNA. Ekspresi relatif dihitung sebagai perbedaan dua nilai ΔCt ($\Delta \Delta Ct$) dan fold change ($2^{-\Delta \Delta Ct}$). Sebanyak 31 dari 60 subjek mendapat kemoterapi dan 29 mendapat terapi hormonal. Setelah terapi neoajuvan, hanya 46 orang subjek yang dapat menjalani mastektomi. Respons terapi dinilai dengan kriteria Miller Payne dari sediaan operasi. Sebanyak 23 (50%) subjek tidak respons (Miller Payne grade 1). ΔCt miR-21 dan ΔCt miR-200c tidak berbeda bermakna pada subjek yang responsif dan tidak responsif, namun subjek yang tidak responsif memperlihatkan peningkatan ekspresi miR-200c ($FC=2,375$). Berdasarkan jenis terapi neoajuvan ekspresi miR21 maupun miR-200c lebih tinggi pada kelompok tidak respons dengan kemoterapi, sedang pada pemberian hormonal ekspresi miR-21 lebih rendah dan miR-200c cenderung lebih tinggi. Disimpulkan ekspresi miR-21 dan miR-200c tidak dapat digunakan untuk memprediksi respons terapi.

Kata kunci: kanker payudara, miR-21, miR-200c, terapi sistemik neoajuvan.

Association of Expression of miR-21, miR-200c and response of Neoadjuvant Systemic Therapy in Patients with Breast Cancer

Abstract

Treatment failure in advanced stage breast cancer has been associated with expression of microRNA e.g. miR-21 and miR-200c. To know the association between response neoadjuvant systemic therapy and the expressions of miR-21 and miR-200c in breast cancer patient, a cross-sectional study has been conducted in Dharmais Cancer Hospital and dr. Cipto Mangunkusumo Hospital National (CMHN) from July 2015 to April 2016. Patients had fresh and paraffin-embedded tissues from biopsy specimens and have been treated adequately. MiR-21 and miR-200c were measured using qRT-PCR on fresh tissues. Results were expressed as cycle thresholds difference (ΔCt) against U6 snRNA. Relative expression was calculated as difference of two ΔCt values ($\Delta \Delta Ct$) and fold change ($2^{-\Delta \Delta Ct}$). Treatment response was evaluated histopathologically using Miller-Payne criteria on mastectomy specimens. A total of 60 patients were enrolled, 31 had chemotherapy and 29 had hormonal therapy. After treatment, only 46 patients were eligible for mastectomy. Twenty-three (50%) patients showed no response (Miller-Payne grade 1) after treatment. ΔCt miR-21 and ΔCt miR-200c were not significantly different between responsive and not responsive patients. However, patients with no response showed increased expression of miR-200c ($FC=2.375$). Based on type of neoadjuvant, in chemotherapy group expression of miR-21 and miR-200c were high ($FC=3.67$ and 6.16 respectively) but in hormonal group expression miR-21 $FC=0.11$ and miR-200c $FC=1.25$. In conclusion, expressions of miR-21 and miR-200c cannot be used to predict treatment response.

Keywords: breast cancer, miR-21, miR-200c, neoadjuvant systemic therapy.

Pendahuluan

Kanker payudara menempati urutan pertama pasien rawat inap di Indonesia yaitu 8082 orang (18,4%) dan merupakan kanker paling banyak yang diderita perempuan. Sebanyak 75% pasien kanker payudara datang ke rumah sakit pada stadium lanjut sehingga memengaruhi prognosis dan tingkat kesembuhan. Tingkat ketahanan hidup pasien kanker payudara menurun drastis dengan meningkatnya stadium saat didiagnosis. Jika sel tumor masih terlokalisasi di jaringan payudara, tingkat ketahanan hidup lima tahun 97%, namun angka tersebut akan menurun drastis hingga 23% bila sel tumor telah bermetastasis ke organ lain. Mortalitas kanker payudara umumnya disebabkan metastasis dan resistensi kanker terhadap kemoterapi.

Pada kanker payudara, resistensi terhadap terapi dihubungkan dengan *microRNA* (miRNA) karena dapat meningkatkan sensitivitas atau resistensi terhadap pengobatan bergantung pada *messenger RNA* (mRNA) yang menjadi target. Disregulasi miR-21 dan keluarga miR-200 berperan terhadap respons kemoterapi dengan memengaruhi sensitivitas sel tumor. Perubahan ekspresi miRNA diduga berperan dalam mekanisme resistensi sel kanker terhadap obat.

Terdapat lebih dari 1.000 jenis miRNA yang meregulasi sepertiga gen yang menyandi sintesis protein. MiRNA menurunkan ekspresi protein produk gen target dengan menekan translasi atau mendegradasi mRNA. Sel kanker mengalami perubahan ekspresi miRNA dengan mendorong gen yang berperan pada kesintasan sel kanker dibandingkan gen yang menginduksi apoptosis. Pada sel kanker yang telah kebal terhadap kemoterapi, miRNA diekspresikan untuk mendorong ekspresi gen yang berperan pada resistensi obat. Dengan memodifikasi ekspresi miRNA, sel kanker yang resisten terhadap suatu obat menjadi sensitif kembali.

Jenis miRNA yang berhubungan dengan resistensi kanker payudara terhadap obat adalah miR-19a, miR-21, miR-125b, famili miR-200, miR-205, miR-221, miR-222, dan miR-451, namun miRNA yang memberikan dampak terhadap respons kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin adalah miR-21 dan famili miR-200.

Berdasarkan potensi miRNA perlu dilakukan penelitian mengenai ekspresi miR-21 dan miR-200 pada subjek yang akan diberikan kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin atau takson untuk mengetahui hubungan respons terapi sistemik

neoajuan dengan ekspresi miR-21, dan miR-200c pada sel kanker payudara.

Metode

Penelitian ini menggunakan desain potong lintang; dilakukan di Rumah Sakit Kanker Dharmas (RSKD) dan RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo (RSUPNKM) pada bulan Juli 2015 sampai April 2016. Subjek penelitian adalah pasien kanker payudara stadium lanjut (stadium III-IV) yang mendapat kemoterapi neoajuan dan direkrut secara *consecutive sampling* hingga mencapai target besar sampel. Besar sampel minimum dihitung dengan rumus perbedaan dua proporsi:

$$n = \frac{(p_1 q_1) + (p_2 q_2)}{(p_2 - p_1)^2} \times f(\alpha, \text{power})$$

p_1 = proporsi kelompok 1; $q_1 = 1 - p_1$

p_2 = proporsi kelompok 2; $q_2 = 1 - p_2$

α = tingkat kemaknaan ditetapkan 5% dan *power* 80% sehingga pada $\alpha = 0,05$ dan *power* = 0,8 diperoleh $f = 7,9$

Untuk miR-21 dengan proporsi ekspresi tinggi 79% diperlukan:

$$n = (0,32 \times 0,68) + (0,21 \times 0,79) / (0,32 - 0,21)^2 \times 7,9 = 18 \times 2 = 36 \text{ subjek}$$

Untuk miR-200 dengan proporsi ekspresi tinggi 45% diperlukan:

$$n = (0,68 \times 0,32) + (0,45 \times 0,55) / (0,68 - 0,45)^2 \times 7,9 = 16 \times 2 = 32 \text{ subjek}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, maka dipilih n yang lebih besar yaitu minimal 36 subjek.

Kriteria Penelitian

Kriteria inklusi adalah pasien kanker payudara stadium III-IV yang akan menjalani kemoterapi neoajuan berbasis antrasiklin atau takson dan bersedia diikutsertakan dalam penelitian. Subjek tidak diikutsertakan jika berusia <18 tahun, memiliki riwayat keganasan selain kanker payudara, pernah atau sedang menjalani kemoterapi atau tidak dapat menjalani kemoterapi.

Sampel penelitian adalah jaringan kanker payudara yang diambil dengan biopsi terbuka oleh dokter spesialis bedah onkologi. Selanjutnya jaringan disimpan beku dalam nitrogen cair pada suhu -80°C sampai dilakukan pemeriksaan. Ekspresi miRNA diukur dengan RT-PCR yang prinsipnya adalah variasi dari pemeriksaan PCR yang untai RNA ditranskrip balik menjadi cDNA kemudian digandakan seperti PCR.

Cara Kerja

Isolasi miRNA dilakukan dengan cara berikut. Sampel jaringan yang telah diberi RNA *later* dan disimpan beku diekstraksi menggunakan miRCURY RNA Isolation Kit (Exiqon). Konsentrasi RNA diukur dengan NanoDrop2000.

Reverse transcription untuk sintesis cDNA menggunakan kit komersial (Universal cDNA Synthesis Kit II, No. Katalog #203301, Exiqon, USA). Sampel cDNA dapat langsung digunakan atau disimpan pada suhu -20°C . Proses *real-time* PCR menggunakan kit komersial (*ExiLent SYBR Green Master Mix*, 2,5 mL, No. Katalog #203402, Exiqon, USA).

Pemeriksaan miR-21 menggunakan miRCURY LNATM Universal RT miRNA PCR LNATM PCR primers set (No. Katalog #202007) nama produk: hsa-miR-21 dan target sekuens 5'-3': UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA.

Pemeriksaan miR-200c dengan miRCURY LNATM Universal RT miRNA PCR LNATM PCR primers set (No. Katalog #202238) nama produk hsa-miR-200c dan target sekuens 5'-3': UAAUACUGCCGGGUAUAUGAUGGA.

Ekspresi miR-21 dan miR-200 dinyatakan sebagai *threshold cycle* (Ct) yaitu jumlah siklus fraksional pada saat intensitas *fluorescence* melewati ambang tertentu. Gen U6 *small nuclear* (sn) RNA digunakan sebagai kontrol internal. Ekspresi relatif miR-21 dan miR-200 dinormalkan dengan ekspresi U6 snRNA dan dinyatakan sebagai delta Ct (ΔCt) yaitu perbedaan nilai Ct antara miR yang diperiksa dengan nilai Ct U6 snRNA sebagai kontrol.

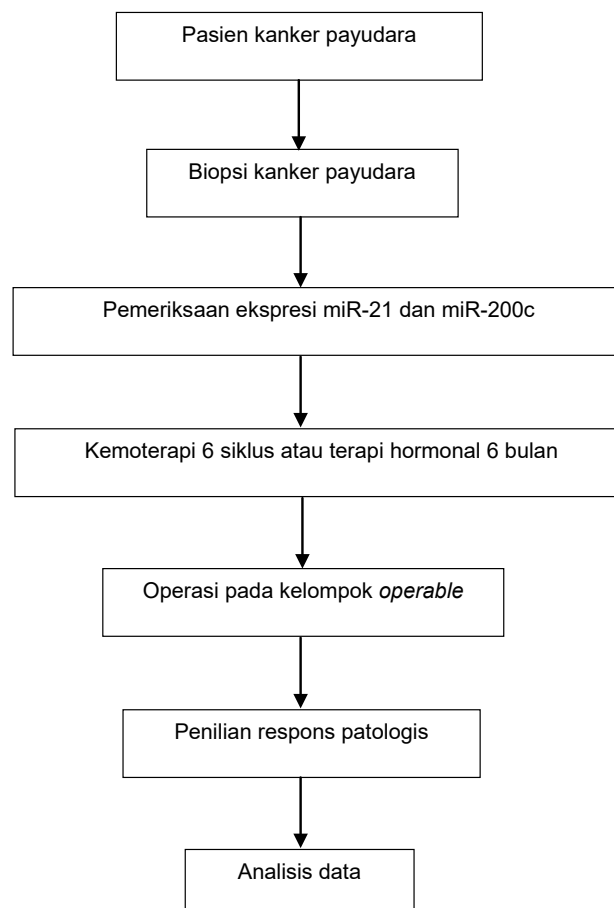
Ekspresi relatif miR-21 adalah $\Delta\text{Ct}_{\text{miR-21}} = \text{Ct}_{\text{miR-21}} - \text{Ct}_{\text{U6snRNA}}$ dan ekspresi relatif miR-200 adalah $\Delta\text{Ct}_{\text{miR-200}} = \text{Ct}_{\text{miR-200}} - \text{Ct}_{\text{U6snRNA}}$. Tingkat ekspresi miR dinyatakan sebagai *fold changes* (FC) yang dihitung relatif terhadap rerata ekspresi grup uji dan pembanding ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{uji}} - \Delta\text{Ct}_{\text{pembanding}}$). FC dihitung menggunakan rumus $\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ dengan interpretasi nilai $\text{FC} > 1,0$ menunjukkan ekspresi lebih tinggi sedangkan $\text{FC} < 1,0$ menunjukkan ekspresi lebih rendah.

Analisis terapi dinyatakan dengan kriteria respons Miller-Payne yang dibagi dua kelompok berdasarkan ada tidaknya respons, yaitu *no response* (kriteria Miller-Payne 1) dan *complete* atau *partial response* (kriteria Miller-Payne 2-5).

Data diolah dengan perangkat lunak SPSS versi 20. Data numerik dianalisis dengan uji-t berpasangan atau uji Mann-Whitney sebagai alternatif bila distribusi data tidak normal.

Persetujuan etik telah didapat dari Komite Etik Penelitian Kesehatan FKUI dengan Keterangan Lolos Kaji Etik No. 574/UN2.F1/ETIK/2015. Subjek dijelaskan tujuan penelitian dan dimintakan persetujuannya secara tertulis. Semua data rekam medis yang digunakan dijaga kerahasiaannya.

Alur Penelitian



Hasil

Karakteristik Subjek Penelitian

Terdapat 60 subjek kanker payudara stadium IIIB dan IV yang menjalani biopsi awal dan kemoterapi neoajuvan. Rerata usia $47,9 \pm 10,25$ tahun dengan rentang 22-70 tahun. Sebanyak 31 (52%) subjek mendapat kemoterapi 6 siklus dengan regimen *5-fluorouracil*, *adriamycin*, dan *cyclophosphamide* (FAC) dan 29 (48%) subjek mendapat terapi hormonal (terapi antihormon dengan salpingo-ooforektomi bilateral atau antiestrogen oral) selama 6 bulan. Setelah terapi selesai, terdapat 46 subjek yang secara klinis dapat menjalani mastektomi, sedangkan subjek lain hanya menjalani biopsi payudara. Analisis statistik dilakukan terhadap sampel yang berasal dari jaringan mastektomi. Dari 46 jaringan yang

dinilai respons terapi dengan kriteria Miller Payne masing masing 23 (50%) yang ada respons atau tidak ada responsnya

Ekspresi miR-21 dan miR-200

Tingkat ekspresi miR-21 dan miR-200 merupakan ekspresi relatif terhadap kontrol internal U6 snRNA dari perbedaan jumlah siklus PCR yang dibutuhkan untuk mengekspresikan miR dan dinyatakan dalam

Δ Ct. Ekspresi miR dianggap meningkat (*upregulation*) jika jumlah Ct miR lebih rendah dari jumlah Ct U6 snRNA dan dianggap menurun (*down regulation*) jika jumlah Ct lebih tinggi dari Ct U6 snRNA.

Hasil analisis menunjukkan ekspresi miR-21 mengalami *upregulation* sedangkan miR-200 hampir sama dengan kontrol U6, namun terdapat variasi rentang yang lebar pada nilai Ct kedua miR tersebut (Tabel 1).

Tabel 1. Sebaran Nilai Δ Ct miR-21 dan miR-200c dari Jaringan Biopsi

Nilai Δ Ct	miR-21	miR-200
Median	-6,8	-0,3
Minimum	-14,8	-5,0
Maksimum	3,0	10,0

Respons Terapi Sistemik Neoajuan

Analisis statistik dilakukan pada 46 sampel yang diperoleh dari subjek yang menjalani mastektomi radikal modifikasi. Analisis ekspresi miR-21 dan miR-200c menunjukkan peningkatan regulasi miR-200c pada subjek yang *no-response*

dibandingkan subjek *complete* atau *partial response* dengan FC 2,375 yang berarti bahwa ekspresi miR-200c pada subjek *no response* ^{22,375} atau 5,188 kali lebih tinggi dibandingkan *complete* atau *partial response* (Tabel 2). Nilai Δ Ct miR-21 (uji t berpasangan, $p=0,98$) dan Δ Ct miR-200c (uji t berpasangan, $p=0,247$) tidak berbeda bermakna.

Tabel 2. Ekspresi miR-21 dan miR-200c Berdasarkan Respons Terapi Sistemik Neoajuan

Δ Ct	NR	CR/PR	$\Delta\Delta$ Ct	FC
miR-21	-6,844	-6,813	-0,031	1,022
miR-200c	-0,888	0,360	-1,248	2,375

NR: *no response*; CR: *complete response*; PR: *partial response*;
 Δ Ct: *delta threshold cycle*; FC: *fold change*, dihitung berdasarkan Δ Ct NR terhadap CR/PR

Pada subjek yang mendapat kemoterapi, ekspresi miR-21 dan miR-200c lebih tinggi pada hasil *no response* dibandingkan *complete* atau *partial response*. Pada subjek yang mendapat

terapi hormonal, ekspresi miR-21 lebih rendah sedangkan ekspresi miR-200c lebih tinggi pada subjek *no response* dibandingkan *complete* atau *partial response* (Tabel 3).

Tabel 3. Hubungan Ekspresi miRNA dan Respons Berdasarkan Terapi Sistemik Neoajuan

Terapi sistemik	NR	CR/PR	$\Delta\Delta$ Ct	Nilai p [#]	FC [*]
Kemoterapi (n=20)					
Δ Ct miR-21	-7,772	-5,896	-1,876	0,205	3,671
Δ Ct miR-200c	-2,245	0,379	-2,624	0,071	6,165
Hormonal (n=9)					
Δ Ct miR-21	-6,248	-9,414	3,166	0,058	0,111
Δ Ct miR-200c	-0,016	0,305	-0,321	0,805	1,249

[#]uji Mann-Whitney; NR: *no response*; CR: *complete response*; PR: *partial response*;
 Δ Ct: *delta threshold cycle*; FC: *fold change*, dihitung berdasarkan Δ Ct NR terhadap CR/PR

Diskusi

Ekspresi miR-21

Tingkat ekspresi miR-21 dari nilai ΔCt hampir sama dengan studi lain yang melaporkan rerata ΔCt -7,04 pada 109 subjek kanker payudara duktal invasif stadium I-III. Perbedaan tersebut bermakna dibandingkan jaringan payudara normal dengan rerata ΔCt 5,32 ($p < 0,001$),¹ namun umumnya dilaporkan tingkat ekspresi miR-21 sebagai FC atau *relative quantity* (RQ).

Pada 113 subjek kanker payudara stadium I-III, tingkat ekspresi miR-21 yang lebih tinggi berhubungan dengan stadium yang lebih tinggi (III vs I-II) dan penyebaran ke kelenjar getah bening (KGB). Penelitian tersebut tidak melibatkan subjek stadium IV atau metastasis jauh. Dengan RT-PCR dan kontrol internal gen U6, miR-21 terdeteksi pada semua jaringan payudara. Petrovic et al² melaporkan tingkat ekspresi miR-21 tertinggi pada tumor derajat II dibandingkan derajat I dan III, namun tidak terdapat hubungan antara miR-21 dan metastasis KGB.

Zhang et al³ meneliti 30 spesimen kanker payudara dan melaporkan bahwa ekspresi miR-21 lebih tinggi di jaringan tumor dibandingkan jaringan sehat sekitarnya. Eksperimen *in vitro* menunjukkan bahwa miR-21 mengatur proliferasi dan migrasi sel kanker payudara, namun mekanisme pasti bagaimana miR-21 berperan pada proliferasi dan potensi metastasis kanker payudara belum sepenuhnya dipahami.

Al khanbashi et al⁴ memeriksa profil miRNA pada 27 subjek kanker payudara stadium lanjut lokal yang menjalani kemoterapi neoajuvan, terdiri atas 9 (33,3%) stadium II, 14 (51,9%) stadium III dan 4 (14,8%) stadium IV. Respons terapi dinilai secara klinis dengan *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST). Hasilnya menunjukkan lebih dari 100 miRNA berbeda ekspresinya antara jaringan kanker dan jaringan normal dengan rentang 2-32 kali lipat, termasuk miR-21 dengan FC >0. Penelitian tersebut tidak merinci miR-21 berdasarkan stadium, tetapi mendapatkan bahwa ekspresi miR-21 berhubungan dengan rekurensi.

Penelitian berbasis *real-time* RT-PCR pada 40 subjek kanker payudara stadium I-III menunjukkan ekspresi miR-21 lebih tinggi secara bermakna di jaringan tumor dibandingkan non-tumor ($p < 0,001$). Peningkatan ekspresi miR-21 berkorelasi negatif dengan KGB positif ($p = 0,01$), indeks proliferasi Ki-67 lebih tinggi ($p = 0,03$) dan stadium TNM juga lebih tinggi ($p = 0,021$).⁵

Hasil studi di atas memberi kesan bahwa dalam perjalanan kanker payudara, miR-21 berhubungan

dengan perburukan penyakit dan stadium kanker payudara yang lebih lanjut. Tingkat ekspresi miR-21 berhubungan dengan sifat sel punca kanker dan ekspresi miR-21 yang lebih tinggi tercermin pada perburukan kanker payudara, migrasi sel, invasi, serta metastasis.⁶

Dengan perkembangan ilmu, miR-21 dapat diperiksa melalui serum bukan hanya jaringan sehingga memudahkan diagnostik dan pemantauan terapi. Studi di Cina melibatkan 326 subjek kanker payudara duktal invasif dan 223 kontrol tanpa kanker untuk mengetahui hubungan ekspresi miR-21 di serum dengan sub tipe kanker payudara. Subjek terdiri atas 34% stadium I, 46% stadium II, dan 20% stadium III. Nilai FC miR-21 serum lebih tinggi secara bermakna pada subjek kanker payudara dibandingkan orang sehat yaitu $9,12 \pm 3,43$ vs $2,96 \pm 0,73$. Analisis multivariat dengan *cox proportional hazards model* menunjukkan ekspresi miR-21 serum yang lebih tinggi dapat menjadi faktor prognostik independen untuk kekambuhan (HR = 2,942; interval kepercayaan [IK] 95% = 1,420-8,325; $p = 0,008$) dan ketahanan hidup bebas penyakit yang lebih pendek (HR = 2,732; IK95% = 1,038-7,273; $p = 0,003$).⁷

Ekspresi miR-21 serum berbeda bermakna antara subjek kanker payudara dan orang sehat. Studi dengan metode RT-qPCR yang mengukur miR-21 dalam serum tanpa ekstraksi RNA mendapatkan median ΔCt miR-21 pada orang sehat 2,2 (rentang 1,5-3,1), sedangkan pada subjek kanker payudara median ΔCt miR-21 adalah 4,1 (rentang: 2,1-5,7) pada stadium I; 3,8 (2,2- 4,7) pada stadium II; 3,3 (2,7-4,4) pada stadium III; dan 5,0 (3,2-6,6) pada stadium IV. Subjek dengan metastasis visceral juga memiliki rerata ΔCt miR-21 lebih tinggi dibandingkan tanpa metastasis visceral ($5,9 \pm 1,5$ vs $3,9 \pm 1,6$; $p < 0,001$). Pada analisis multivariat didapatkan konsentrasi miR-21 serum berkorelasi dengan stadium kanker dan tidak bergantung pada status ER atau usia.⁸ Hasil tersebut sesuai dengan laporan Qian et al⁹ bahwa ekspresi miR-21 berhubungan dengan stadium penyakit, metastasis KGB dan prognosis buruk

Ekspresi miR-200c

Pada penelitian ini, ekspresi miR-200c tidak banyak berbeda dibandingkan kontrol internal U6 yang memberi kesan bahwa ekspresi miR-200c mengalami penekanan pada tumor stadium lanjut yang akan atau sedang bermetastasis. Ekspresi famili miR-200 pada tumor epitelial memang

menurun saat proses EMT berlangsung, tetapi dibutuhkan kembali di lokasi metastasis untuk memunculkan fenotip epitelial.

Studi di jaringan kanker payudara dan sel kultur mendapatkan bahwa ekspresi miR-200c mengalami penurunan regulasi. Ekspresi miR-200c menghambat jalur sinyal PI3/AKT dan ERK dengan menargetkan KRAS. Penurunan KRAS menekan proliferasi sel kanker payudara *in vitro* dan *in vivo* sehingga miR-200c dianggap sebagai *tumor suppressor*.¹⁰

Ekspresi miR-21 dan miR-200c jelas terlibat dalam mekanisme resistensi obat akibat proses EMT, namun EMT bukan satu-satunya cara sel kanker bertahan menghadapi obat antikanker. Selain itu, setiap jenis obat antikanker, baik kemoterapi, terapi hormonal maupun terapi target mengakibatkan resistensi dengan mekanisme berbeda dan melibatkan miRNA yang berbeda pula.¹¹ Diperlukan studi lebih lanjut terhadap obat antikanker yang spesifik untuk mengevaluasi peran miR-21 atau miR-200c sebagai faktor prediktor kemoterapi neoajuan.

Respons Kemoterapi Neoajuan Berdasarkan Ekspresi miR

Rekomendasi kemoterapi neoajuan melibatkan kemoterapi dan terapi hormonal untuk subjek sub tipe luminal. Studi *in vitro* mendapatkan peningkatan miR-21 dan miR-141 (anggota famili miR-200 yang berada satu kluster dengan miR-200c) pada kultur sel kanker payudara yang resisten trastuzumab. Jika ekspresi miR-21 dihentikan dengan *antisense*-nya, sel resisten kembali sensitif terhadap trastuzumab. Ekspresi miR-21 dievaluasi secara *in vivo* pada 32 subjek yang menerima trastuzumab kemudian respons terapi dinilai dengan RECIST. Hasilnya memperlihatkan ekspresi miR-21 di jaringan biopsi tumor sebelum terapi 2,7 kali lipat lebih tinggi pada tumor resisten dibandingkan sensitif trastuzumab ($p < 0,01$).¹² Penekanan ekspresi miR-21 meningkatkan sensitivitas sel kanker payudara terhadap terapi 5-FU dan paklitaksel.^{13,14}

Resistensi terhadap terapi hormonal pada awalnya bermanfaat secara klinis, tetapi lama kelamaan terjadi resistensi hormonal. Ekspresi miR-21 diduga berperan pada resistensi terapi hormonal. Studi pada sel kanker payudara ER+ menunjukkan bahwa penekanan miR-21 dapat menimbulkan sensitivitas sel terhadap tamoksifen atau *fulvestrant* sehingga mengalami apoptosis.¹⁵ Hasil penelitian ini berbeda dari studi *in vitro*

tersebut karena ekspresi miR-21 yang rendah justru berperan pada kegagalan terapi hormonal pada subjek stadium IIIB.

Analisis berbasis *microarray study* pada sel kanker payudara yang sensitif tamoksifen MCF-7 dan resisten tamoksifen (LY2) memperlihatkan perbedaan pola ekspresi miRNA.¹⁶ Pada sel yang sensitif tamoksifen, miR-21 (FC=5,26) dan miR-200c (FC=13,02) mengalami peningkatan ekspresi dibandingkan sel resisten tamoksifen. Studi selanjutnya mendapatkan ekspresi famili miR-200, termasuk miR-200c, turun secara progresif pada sel resisten tamoksifen yang diikuti peningkatan ekspresi mRNA ZEB1. Peningkatan ekspresi miR-200b atau miR-200c pada sel LY2 dapat mengubah morfologi sel ke arah epitelial dan menurunkan kemampuan migrasi sel. Peningkatan ekspresi miR-200b dan miR-200c juga mensensitisasi sel LY2 terhadap hambatan pertumbuhan oleh antagonis ER (tamoksifen atau *fulvestrant*).¹⁷

Famili miR-200 termasuk miR-200c berperan pada resistensi kemoterapi. Sebagai contoh, studi yang menggunakan sampel jaringan kanker esofagus pada subjek yang mendapat kemoterapi neoajuan memperlihatkan korelasi terbalik antara ekspresi miR-200c dan sensitivitas kemoterapi yang mungkin disebabkan oleh jalur aktivasi PI3K/Akt.¹⁸

Pada studi *in vitro*, pemberian doksorubisin pada sel kanker yang heterogen menyebabkan evolusi klonal dan seleksi sel dengan ekspresi miR-200c rendah. Akibatnya, terjadi peningkatan regulasi gen target termasuk penekan proses EMT (ZEB1 dan ZEB2) dan faktor pemicu kemoresistensi seperti TrkB atau BMI1 sehingga memicu aktivasi jalur sinyal ketahanan hidup. Hal itu menunjukkan penekanan miR-200c meningkatkan resistensi terhadap doksorubisin.¹⁹

Masih banyak faktor yang berperan pada resistensi kemoterapi neoajuan pada kanker payudara stadium lanjut, terutama resistensi terhadap terapi hormonal yang berperan cukup besar. Resistensi terhadap terapi hormonal dapat terjadi pada semua stadium, tetapi yang paling sulit adalah pada *setting* kekambuhan. Meskipun resistensi sudah ada pada separuh subjek sebelum terapi mulai, sebagian lain terjadi selama terapi berlangsung.²⁰

Beberapa mekanisme terlibat dalam resistensi terapi endokrin, seperti mutasi gen ER (ESR1), aberasi epigenetik, atau *signaling crosstalk*.²¹ Kompleksitas sel kanker dan lingkungan mikro tumor memberi kesan bahwa masih ada faktor-faktor molekular yang belum ditemukan. Mutasi

ESR1, terutama di lokasi *ligand-binding domain* (LBD), adalah mekanisme utama resistensi terkait terapi aromatase inhibitor pada kanker payudara metastatik.^{22,23} Resistensi mungkin tidak teridentifikasi sejak awal diagnosis, tetapi muncul karena tekanan selektif terapi endokrin multipel. Selain itu, instabilitas genetik pada stadium lanjut dapat berkontribusi terhadap mutasi, misalnya karena defek mekanisme reparasi DNA yang menetap akibat tekanan tersebut.²⁴

Pada kemoresistensi, perubahan ekspresi gen setelah kemoterapi neoajuan juga berperan penting. Dari sampel blok parafin subjek kanker payudara memperlihatkan 12 gen yang mengalami peningkatan regulasi dan 8 gen turun regulasinya setelah kemoterapi neoajuan-

Kerumitan jejaring regulasi genetik dan epigenetik pada kemoresistensi kini telah terurai. Penelitian dengan *high-throughput sequencing* pada sel kanker payudara MCF-7 yang resisten adriamisin (MCF-7/ADM) dan resisten paklitaksel (MCF-7/PTX) mendapatkan bahwa sel kemoresisten memiliki perubahan ekspresi gen, metilasi gen dan ekspresi miRNA yang masif dibandingkan sel kontrol yang kemosensitif. Analisis lebih mendalam mendapatkan bahwa sejumlah gen diregulasi melalui proses metilasi atau oleh miR dan miR dikontrol ekspresinya oleh metilasi DNA pada sel yang kemoresisten.

Kesimpulan

Ekspresi miR-21 tidak berhubungan dengan respons terapi sistemik neoajuan kanker payudara. Ekspresi miR-200c lebih tinggi pada kanker payudara yang tidak responsif terhadap terapi sistemik neoajuan. Pemeriksaan miR-21 dan miR-200c tidak dapat diterapkan untuk prediksi respons terapi sistemik neoajuan pada semua subjek stadium lanjut. Oleh karena itu, diperlukan studi lebih lanjut terhadap obat antikanker yang spesifik untuk mengevaluasi peran miR-21 atau miR-200c pada respons terapi sistemik neoajuan.

Daftar Pustaka

- DeSantis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics. *Cancer J Clin*. 2011;61:408-18.
- Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2007;608:1-22.
- Kutanzi KR, Yurchenko OV, Beland FA, Checkhun VF, Pogribny IP. MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer. *Clin Epigenetics*. 2011;2:171-85.
- Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, Golubov A, Shpyleva SI, Kovalchuk O. Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer*. 2010;127:1785-94.
- Li H, Yang BB. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34:870-9.
- Li Q, Liu M, Ma F, Luo Y, Cai R, Wang L, et al. Circulating miR-19a and miR-205 in serum may predict the sensitivity of luminal asubtype of breast cancer patients to neoadjuvant chemotherapy with epirubicin plus paclitaxel. *PLoS One*. 2014;9:104870.
- Yan LX, Wu QN, Zhang Y, Li YY, Liao DZ, Hou JH, et al. Knock-down of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R2.
- Wang H, Tan G, Dong L, Cheng L, Li K, Wang Z, et al. Circulating miR-125b as a marker predicting chemoresistance in breast cancer. *PLoS One*. 2012;7.
- Chen Y, Sun Y, Chen L, Xu X, Zhang X, Wang B, et al. MiR-200c increases the sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin through the suppression of E-cadherin-mediated PTEN/Akt signaling. *Mol Med Rep*. 2013;7:1579-84.
- Shah MY, Calin G a. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer. *Genome Med*. 2011;3:56.
- Bergamaschi A, Katzenellenbogen BS. Tamoxifen downregulation of miR451 increases 14-3-3 ζ and promotes breast cancer cell survival and endocrine resistance. *Oncogene*. 2012;31:39-47.
- Mulrane L, Mcgee SF, Gallagher WM, O'Connor DP. miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Res*. 2013;73:6554-63.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method. *Methods*. 2001;25:402.
- Lee JA, Lee HY, Lee ES, Kim I, Bae JW. Prognostic implications of microRNA-21 overexpression in invasive ductal carcinomas of the breast. *Int J Breast Cancer*. 2011;14:269-75.
- Petrović N, Mandušić V, Dimitrijević B, Roganović J, Lukić S, Todorović L, et al. Higher miR-21 expression in invasive breast carcinomas is associated with positive estrogen and progesterone receptor status in patients from Serbia. *Med Oncol*. 2014;31:1-9.
- Zhang C, Liu K, Li T, Fang J, Ding Y, Sun L, et al. miR-21: a gene of dual regulation in breast cancer. *Int J Oncol*. 2016;48:161-72.
- Al-Khanbashi M, Caramuta S, Alajmi AM, Al-Haddabi I, Al-Riyami M, Lui WO, et al. Tissue and serum miRNA profile in locally advanced breast cancer (LABC) in response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) treatment. *PLoS One*. 2016;11:e0152032.

18. Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, et al. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep.* 2009;21:673-9.
19. Han M, Liu M, Wang Y, Mo Z, Bi X, Liu Z, et al. Re-expression of miR-21 contributes to migration and invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell characteristics in MCF-7 cells. *Mol Cell Biochem.* 2012;363:427-36.
20. Wang G, Wang L, Sun S, Wu J, Wang Q. Quantitative measurement of serum microRNA-21 expression in relation to breast cancer metastasis in Chinese females. *Ann Lab Med.* 2015;35:226-32.
21. Asaga S, Kuo C, Nguyen T, Terpenning M, Giuliano AE, Hoon DS. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem.* 2011;57:84-91.
22. Qian B, Katsaros D, Lu L, Preti M, Durando A, Arisio R, et al. High miR-21 expression in breast cancer associated with poor disease-free survival in early stage disease and high TGF-beta1. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;117:131-40.
23. Song C, Liu LZ, Pei XQ, Liu X, Yang L, Ye F, et al. miR-200c inhibits breast cancer proliferation by targeting KRAS. *Oncotarget.* 2015;6:34968-78.
24. Tian W, Chen J, He H, Deng Y. MicroRNAs and drug resistance of breast cancer: basic evidence and clinical applications. *Clin Transl Oncol.* 2013;15:335-42.
25. Gong C, Yao Y, Wang Y, Liu B, Wu W, Chen J, et al. Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer. *J Biol Chem.* 2011;286:19127-37.
26. Mei M, Ren Y, Zhou X, Yuan X-B, Li F, Jiang LH, et al. Suppression of breast cancer cells in vitro by polyamidoamine-dendrimer-mediated 5-fluorouracil chemotherapy combined with antisense micro-RNA 21 gene therapy. *J Appl Polymer Sci.* 2009;114:3760-6.
27. Mei M, Ren Y, Zhou X, Yuan XB, Han L, Wang GX, et al. Downregulation of miR-21 enhances chemotherapeutic effect of taxol in breast carcinoma cells. *Technol Cancer Res Treat.* 2010;9:77-86.
28. Yu X, Li R, Shi W, Jiang T, Wang Y, Li C. Silencing of microRNA-21 confers the sensitivity to tamoxifen and fulvestrant by enhancing autophagic cell death through inhibition of the PI3K-AKT-mTOR pathway in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2016;77:37-44.
29. Manavalan TT, Teng Y, Appana SN, Datta S, Kalbfleisch TS, Li Y, et al. Differential expression of microRNA expression in tamoxifen-sensitive MCF-7 versus tamoxifen-resistant LY2 human breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2011;313:26-43.
30. Manavalan TT, Teng Y, Litchfield LM, Muluwngwi P, Al-Rayyan N, Klinge CM. Reduced expression of miR-200 family members contributes to antiestrogen resistance in LY2 human breast cancer cells. *PLoS One.* 2013;8:e62334.
31. Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Hara J, Moon JH, et al. Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res: Off J Am Assoc Cancer Res.* 2011;17:3029-38.
32. Kopp F, Oak PS, Wagner E, Roidl A. miR-200c sensitizes breast cancer cells to doxorubicin treatment by decreasing TrkB and Bmi1 expression. *PLoS One.* 2012;7:e50469.
33. Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM. Endocrine resistance in breast cancer – an overview and update. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;418:220-34.
34. De Marchi T, Foekens JA, Umar A, Martens JW. Endocrine therapy resistance in estrogen receptor (ER)-positive breast cancer. *Drug Discov Today.* 2016.
35. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet.* 2013;45:1439-45.
36. Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet.* 2013;45:1446-51.
37. Segal CV, Dowsett M. Estrogen receptor mutations in breast cancer – new focus on an old target. *Clin Cancer Res.* 2014;25:1724-6.