

EKSPRESI PROTEIN GEN NM23 PADA KARSINOMA SEL SKUAMOSA LIDAH

Harmas Yazid Yusuf

Bagian Bedah Mulut
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran
Rumah Sakit Perjan Hasan Sadikin Bandung

Harmas Yazid Yusuf: Ekspresi Protein Gen NM23 pada Karsinoma Sel Skuamosa Lidah. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2003; 10(Edisi Khusus): 223-227

Abstract

Tongue squamous cell carcinoma, a relatively frequent malignancy in the oral cavity, has a great tendency to metastasize to regional lymph nodes that worsens the prognosis of the disease. The anti metastasis gene NM23, encodes a 17 KD cytoplasmic and nuclear proteins, has shown controversy behavior as metastatic suppressor in human cancer. An observational study using immunohistochemical staining method with LSAB (-) technique was conducted on 41 paraffin block specimens to show the relationship between significance of the expression of NM23 protein as a marker for cancer metastasis and the staging, cancer grading and the positive regional head and neck lymph nodes. Statistical significance of difference was evaluated using Chi square test ($p < 0.01$). The result showed that there was an inverse relationship between expression of NM23 protein and the cancer grading as well as frequency of the positive regional head and neck lymph nodes, supporting the role of NM23 as metastasis suppressor factor that may be useful for predicting tongue squamous cell carcinoma metastasis.

Key words: NM23 protein; metastasis; squamous cell carcinoma

Pendahuluan

Metastasis ke kelenjar getah bening merupakan faktor yang paling penting dalam menentukan prognosis penderita karsinoma kepala dan leher termasuk karsinoma rongga mulut. Karsinoma lidah mempunyai insidensi bermetastasis ke kelenjar getah bening lebih besar dari karsinoma pada bagian rongga mulut lainnya, karena banyaknya anyaman limfatik dan struktur anatominya, dengan insidensi antara 15 % sampai 75 % bergantung pada perluasan kanker primer.¹ Gen NM23 pertama kali dilaporkan oleh

Steeg et al tahun 1988 sebagai gen penekan metastasis kanker pada *murine melanoma cell lines*.^{2,3,4} Sampai saat ini telah dapat diisolasi sebanyak lima gen NM23 pada manusia, yaitu NM23-H1 sampai NM23-H5.⁴ Gen NM23-H1 dan NM23-H2 yang 88% homolog terdapat pada kromosom 17q21-22.3, gen NM23-H3 dan NM23-H4 yang tidak homolog terdapat pada kromosom 16q13 dan 16p13.3 serta gen NM23-H5 pada kromosom 5q23-31.⁴ Protein produk gen NM23 dikenal dengan beragam sebutan seperti AWD (*abnormal wing disc*) yang ditemukan pada lalat *Drosophila*, faktor I (inhibitor diferensiasi)

dan faktor PuF (faktor transkripsi pada gen *c-myc*), termasuk dalam suatu keluarga besar protein dengan berat molekul 16-20 kD yang mempunyai aktifitas NDPK (*nucleoside diphosphate kinase*), yaitu enzim yang terdapat pada hampir semua bagian sel yang berfungsi mengkatalisis fosforilasi 5' *triphosphate nucleoside* (NTP) menjadi 5' *diphosphate nucleoside* melalui mekanisme bolak balik dengan perantaraan enzim fosforilasi oksidatif berenergi tinggi.⁴ Enzim NDPK berperan pada proses transduksi sinyal dari membran sel ke inti sel melalui jalur aktivasi protein G dan P21 serta berfungsi pada pembelahan sel dan mempertahankan bentuk sel.⁴ Protein produk gen NM23 mempunyai implikasi dalam proliferasi dan diferensiasi sel serta terjadinya kanker.⁴ Fungsi keberadaan gen NM23 dan produk proteinnya pada kanker manusia masih menunjukkan kontroversi, beberapa laporan menunjukkan terdapat kaitan antara tingginya ekspresi gen NM23 dan produk proteinnya dengan rendahnya potensi metastasis kanker, sedangkan laporan lain menunjukkan hasil sebaliknya. Sebab itu penting artinya untuk menentukan ekspresi protein gen NM23 sebagai petanda untuk metastasis penyakit kanker, khususnya karsinoma sel skuamosa lidah.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari ekspresi protein produk gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah dengan metode pulasan imunohistokimia pada jaringan yang dipendam dalam blok parafin.

Bahan dan Cara Kerja

Sebanyak 41 jaringan blok parafin karsinoma sel skuamosa lidah yang diperoleh dari Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran/RS Perjan dr Hasan Sadikin Bandung antara tahun 1990-2000 melalui teknik *purposive sampling* berdasarkan kriteria kelengkapan dan kelaikan jaringan blok parafin maupun kelengkapan formulir rujukan ke bagian Patologi Anatomi diikut sertakan dalam penelitian ini. Dari blok

parafin yang representatif kemudian dibuat tiga sediaan baru, satu sediaan untuk pulasan hematoksilin eosin, yaitu untuk penilaian ulang diagnosis histopatologis, satu sediaan untuk pulasan imunohistokimia terhadap protein gen NM23 serta satu sediaan untuk kontrol negatif. Data perluasan anatomi kanker primer (TNM) dan positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher yang diperoleh dari data rekam medis. Stadium kanker diklasifikasikan berdasarkan sistem TNM dari *American Joint Committee on Cancer/AJCC*⁵, dan gradasi karsinoma sel skuamosa lidah dibagi menjadi gradasi I (berdiferensiasi baik), gradasi II (berdiferensiasi sedang) dan gradasi III (berdiferensiasi buruk) menggunakan klasifikasi diferensiasi histologis dari *World Health Organisation/WHO*.⁶

Ekspresi protein gen NM23 pada jaringan karsinoma sel skuamosa lidah dievaluasi melalui pulasan imunohistokimia dengan metode *labeled streptavidine biotin plus* (LSAB® plus) (Dako Corp. Denmark). Blok parafin tiap sampel dipotong dengan ketebalan 4 mikron ditempatkan pada *silane slides*, kemudian dilakukan deparafinisasi dalam larutan *xylene*. Prosedur *antigen retrieval* dilakukan melalui pemanasan preparat di dalam *oven microwave* dengan suhu 60⁰C selama 20 menit dalam medium *buffer* AlCl₃ 4%. Untuk menghilangkan peroksidase endogen, sediaan direndam dalam H₂O₂ 3% selama 5 menit. Antibodi primer monoklonal NM23-H1 (NM301 Santa Cruz Biotech. Inc, CA, USA) diencerkan 1:50 dan sediaan diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 60 menit. Kemudian sediaan diinkubasikan dalam *biotin labelled swine anti rabbit Ig antibody* dengan pengenceran 1:300 selama 45 menit pada suhu kamar. Tahap selanjutnya, sediaan diinkubasikan dalam streptavidin dengan pengenceran 1:500 selama 30 menit pada suhu kamar dan akhirnya diaplikasikan 0,05% DAB(3,3' *diaminobenzidine tetrachloride*) dengan pulasan pembanding (*counter staining*) hematoksilin Mayer. Kontrol positif adalah jaringan karsinoma payudara dan kontrol

negatif adalah dengan mensubstitusi antibodi primer dengan larutan *phosphate buffer saline*/PBS. Evaluasi ekspresi protein NM23 dilakukan secara semikuantitatif dengan penilaian sebagai berikut, yaitu ekspresi negatif (0%), jika tidak ada sel jaringan karsinoma sel skuamosa lidah yang imunopositif; ekspresi fokal (+1), jika kurang dari 20% sel jaringan karsinoma sel skuamosa lidah yang imunopositif; ekspresi heterogen (+2), jika 20-50% sel karsinoma sel skuamosa lidah yang imunopositif dan ekspresi difus (+3), jika lebih dari 50% sel karsinoma sel skuamosa lidah yang imunopositif. Persentase sel kanker yang imunoreaktifitas positif dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 200x dari seluruh sediaan karsinoma sel skuamosa lidah sampai cmendapat 500 sel. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji Kai kuadrat dengan $p < 0,01$.

Hasil

Ekspresi protein gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah teramati secara difus terutama pada sitoplasma sel dan sebagian inti sel (Gambar 1).



A

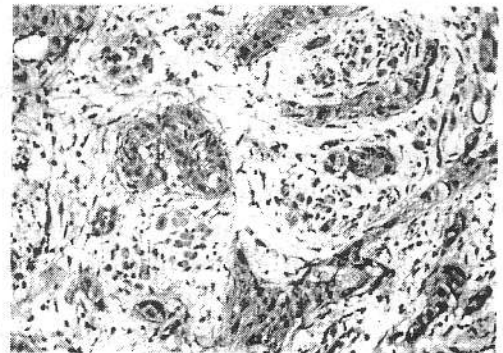
Gambar 1. Imunopositifitas ekspresi protein gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah

A. Sel-sel karsinoma menunjukkan imunopositifitas kuat terhadap protein NM23 (Pembesaran 100 x)

Persentase ekspresi protein gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah lebih dominan pada ekspresi fokal dan negatif, masing-masing sebanyak 31,7%. Sedangkan persentase ekspresi difus sebanyak 14,6% dan ekspresi heterogen sebanyak 22% (Tabel 1).

Positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher pada karsinoma sel skuamosa lidah ditemukan sebanyak 21 kasus (51,3%), yaitu sebanyak 2 kasus (4,9%) pada ekspresi protein gen NM23 heterogen, 9 kasus (22%) pada ekspresi fokal, 10 kasus (24,4%) pada ekspresi negatif serta tidak ditemukan pada ekspresi NM23 difus (Tabel 1).

Uji Kai kuadrat menunjukkan adanya kemaknaan hubungan antara ekspresi protein gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah dengan gradasi kanker dan positifitas kelenjar getah bening regional ($p < 0,01$) sedangkan dengan stadium tidak ditemukan hubungan bermakna ($p > 0,01$).



B

B. Imunopositifitas kuat terhadap protein NM23 terutama pada sitoplasma dan inti sel karsinoma (Pembesaran 200 x)

Tabel 1. Hubungan ekspresi protein gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah dengan stadium, gradasi dan positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher

Protein terkait kanker	Ekspresi	Frekuensi (%)	Stadium ($p > 0,01$)				Gradasi ($p < 0,01$)			Positifitas KGB regional kepala dan leher ($p < 0,01$)	
			I	II	III	IV	I	II	III	Positif	Negatif
NM23	Difus	6 (14,6%)	2	3	1	0	6	0	0	0	6
	Heterogen	9 (22%)	1	3	4	1	6	3	0	2	7
	Fokal	13(31,7%)	0	3	6	4	3	7	3	9	4
	Negatif	13(31,7%)	0	2	8	3	0	4	9	10	3
Jumlah		41(100%)	3	11	19	8	15	14	12	21	20

Pembahasan

Perkembangan kanker dan progresinya menjadi fenotip metastatik berkaitan dengan rangkaian kejadian genetik yang menyangkut aktivasi onkogen seluler dan inaktivasi gen penekan kanker. Gen NM23 merupakan suatu gen yang menunjukkan aktifitas penekanan metastasis kanker dan ekspresinya menunjukkan korelasi terbalik dengan potensi metastatik pada sejumlah kanker manusia.⁷ Peran gen NM23 yang kompleks pada proses metastasis ditandai oleh beragamnya dan bertolak belakangnya beberapa penelitian pada kanker manusia. Protein gen NM23 seringkali mengalami peningkatan ekspresi pada kanker primer bila dibandingkan dengan jaringan normal sekitarnya^{8,9}, yang kemungkinan disebabkan oleh aktivasi pada tahap awal karsinogenesis karena imortalisasi pada sel kanker akan menginduksi peningkatan ekspresi gen NM23.⁴ Dengan berlanjutnya proses atau tahapan karsinogenesis, maka akan terjadi penurunan ekspresi gen NM23.⁴ Peran anti metastasis gen NM23 dapat berasal dari terjadinya disregulasi proses apoptosis pada jaringan kanker.¹⁰

Gradasi kanker merupakan gambaran histopatologis yang menunjukkan derajat diferensiasi kanker dan menentukan prognosis penyakit.⁶ Terabanya atau

positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher pada kanker kepala dan leher merupakan indikator metastasis (N) ke kelenjar getah bening tersebut.⁵ Penelitian ini menunjukkan adanya hubungan terbalik antara ekspresi protein gen NM23 dengan gradasi kanker dan positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher. Penelitian ini menunjukkan bahwa pada karsinoma sel skuamosa lidah yang menunjukkan ekspresi protein gen NM23 difus, heterogen dan fokal, ternyata mempunyai gradasi kanker yang relatif lebih baik dibandingkan dari karsinoma sel skuamosa lidah yang menunjukkan ekspresi NM23 negatif. Demikian pula pada pengamatan terhadap frekuensi positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher, yang menunjukkan bahwa frekuensi positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher ditemukan lebih tinggi pada karsinoma sel skuamosa lidah yang menunjukkan ekspresi NM23 negatif. Maka dapat dikatakan bahwa penurunan ekspresi protein gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah secara empiris terbukti memperburuk gradasi kanker dan meningkatkan positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher, yang secara klinis merupakan indikator terjadinya metastasis ke kelenjar getah bening. Dengan demikian, maka protein gen NM23 diduga kuat merupakan faktor penekan metastasis yang dapat digunakan

untuk memprediksi metastasis kanker dan prognosis pada karsinoma sel skuamosa lidah. Pada penelitian ini terlihat bahwa penurunan ekspresi protein gen NM23 tidak terjadi pada semua kasus karsinoma sel skuamosa lidah. Hal ini agaknya berkaitan dengan adanya perubahan-perubahan lain pada gen NM23, selain dari penurunan ekspresi protein gen NM23, yang tidak dapat terdeteksi melalui pulasan imunohistokimia. Selain itu, adanya kemungkinan belum terjadinya abnormalitas gen NM23 dan produk proteinnya pada waktu dilakukan tindakan biopsi atau ekresi.

Kesimpulan

Ekspresi protein gen NM23 pada karsinoma sel skuamosa lidah mempunyai hubungan terbalik dengan gradasi kanker dan frekuensi positifitas kelenjar getah bening regional kepala dan leher sehingga dapat digunakan untuk memprediksi potensi metastasis ke kelenjar getah bening regional kepala dan leher.

Daftar Pustaka

- Xin Xie, Clause OPF, De Angelis P and Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, bax, bcl2 and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer* 1999. 86 (6): 913-920.
- Steege PS, Bevilacqua G, Thorgeirsson, UP, Talmadge JE, Liotta LA and Sobel ME. Evidence of novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988. 80 (3): 200-204.
- Lo Muzio L, Mignogna MD, Pannone G, Staibano S, Procaccini M, Serpico R, et al. The NM23 gene and its expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 1999. 6 (4): 747-751.
- Lombardi D, Lacombe M & Paggi MG. Nm23: Unraveling its biological function in cell differentiation. *J Cell Physiol* 2000. 182 (2): 144-149.
- Fleming ID. *The American Joint Committee on Cancer Staging Manual*, Lip and oral cavity. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Raven Pub. 1997. 24-30.
- Wahi PN, Cohen B, Luthra UK and Torloni, UK. Histological typing on oral and oropharyngeal tumors. In Wahi PN. *International histological classification of tumors*. Geneva. 1971: 17-18.
- Lee CS, Redshaw A and Boag GB. Nm23-H1 protein immunoreactivity in laryngeal carcinoma. *Cancer* 1996. 77 (11): 2246-2250.
- Lacombe MI, Sastre-Garau X, Lascu I, Wallet V, Thierry JP and Veron M. Overexpression of nucleoside diphosphate kinase (nm23) in solid tumors. *Eur J Cancer* 1991.27: 1302-1307.
- Martinez JA, Prevot S, Nordlinger B, Nguyen TMA, Lacarriere Y, Munier A, et al. Overexpression of nm23-H1 and nm23-H2 genes in colorectal carcinomas and loss of nm23-H1 expression in advanced tumour stages. *Gut* 1995. 37: 712-720.
- Charpin C, Bouvier C, Garcia S, Martini F, Andrac L, Lavaut MN and Iliasia C. Automated and quantitative immunocytochemical assays of nm23/NDPK protein in breast carcinomas. *Int J Cancer* 1997. 74: 416-420.