

Ekspresi produk gen laten virus epstein-barr pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut

(The expressions of latent gene product of epstein-barr virus in oral squamous cell carcinoma)

Theresia Indah Budhy S

Bagian Biologi Oral
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Surabaya - Indonesia

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is a type of cancer often found in oral cavity and the area of head and neck at about 90%. Based on the geographical incidence oral SCC (OSCC) has many types of different emerging. This case probably has connection with ethnic group, habit and social and economical condition. In East Java, the incidence is about 2.64% and it increases every year. The virus is known as one of the main factors that result in this disease. Epstein-Barr virus (EBV) has potential capability of carcinogenesis. EBV is the family of herpesviridae that can infect cell through the linking of CD 21 receptor of the epithel with glycol protein 350/220 of the virus capsule. After primary infection, the virus will form latent-gene in human cell. Periodically, the latent-gene product can disturb proliferation and apoptotic regulator. In Indonesia, the expression of EBV latent geneproduct in the OSCC has not been reported yet. This study wanted to know the expression of EBV latent gene product found in the OSCC. This study found 25 cases of OSCC in which 17 were infected by EBV. Detection of EBV infection could be done by insitu hybridization to identify RNA EBV (EBER). To find the expression of EBV latent gene product, immunohistochemical analysis was done. The conclusion was that the emerging of expression of EBV latent gene product in OSCC were latent membrane protein-1 (LMP-1), EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1) and RNA EBV (EBER). They were 28.28%, 25.26% and 46.47%. It was suggested to do the following research on OSCC infected by EBV and the emerging of expression of EBV latent gene product with regulator gene of proliferation and apoptotic in OSCC.

Key words: epstein-barr virus (EBV), oral squamous cell carcinoma, LMP-1, EBNA-1, EBER

Korespondensi (correspondence): Theresia Indah Budhy S, Bagian Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Jln. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 47 Surabaya 60132, Indonesia.

PENDAHULUAN

Epstein-barr virus (EBV) merupakan herpes virus *gamma* yang termasuk dalam famili *herpesviridae* dengan besar genom 172 kb. Dari seluruh gen yang ada 9 gen di antaranya diekspresikan pada limfosit B yang terinfeksi. Virus ini sering dikaitkan dengan karsinoma nasofaring, *Burkitt's lymphoma*. Pada karsinoma tersebut akan diekspresikan berbagai gen laten. Produk gen laten yang diekspresikan dapat mempengaruhi gen pengatur pada proliferasi dan apoptosis sel.¹

Di rongga mulut kanker yang sering didapatkan adalah jenis karsinoma. Menurut Higa *et al.*² karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terjadi pada penduduk Okinawa Jepang terkait dengan infeksi *EBV*. Sejauh ini di Indonesia belum ada laporan produk gen laten *EBV* yang diekspresikan pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM). Mengingat hal tersebut, maka peneliti ingin mengkaji ekspresi gen laten *EBV* pada KSSRM di Jawa Timur.

Epstein-barr virus (EBV) yang telah menginfeksi epitel akan menetap secara laten dan secara periodik menjadi aktif. Hal ini didukung peneliti terdahulu Hu and Li³ bahwa pada *Hairy leukoplakia* ditemukan partikel *EBV* pada

hampir 100%. Genom *EBV* yang berada pada sel inang berbentuk *latent episome*.⁴ *Latent episome* ini terdiri dari beberapa produk gen yang akan diekspresikan. Produk gen tersebut akan direplikasikan selama pembelahan sel inang. Mengingat hal tersebut, maka gen *EBV* akan menyebabkan *EBV* persisten di dalam sel. Hal tersebut mempengaruhi sistem pembelahan sel. Bila keadaan ini berlanjut terus tanpa ada mekanisme protektif dan preventif maka menyebabkan progresivitas kanker semakin cepat.

Pada *latent episome EBV* terdapat berbagai gen antara lain *latent membrane protein (LMP) 1, 2A, 2B, EBV nuclear antigen (EBNA) 1, 2, 3, 4, 5, 6, LP* dan *EBV-RNA (EBER) 1, 2*. Pada jenis kanker yang berbeda biasanya akan diekspresikan gen *EBV* yang berbeda. Dilaporkan oleh Shimakage *et al.*⁵ bahwa EBER banyak terkait dengan keganasan karena dapat menghambat apoptosis. Sebelumnya dilaporkan oleh Nicholson *et al.*,⁶ bahwa ekspresi LMP-1 pada *human cell line* menyebabkan transformasi sel, sedangkan Middeldorp *et al.*¹ mengatakan bahwa EBNA-1 banyak terkait dengan keganasan karena dapat meningkatkan aktivitas faktor transkripsi.

Berdasar permasalahan tersebut maka didapatkan suatu konsep bahwa di rongga mulut keganasan yang paling

sering dijumpai adalah karsinoma sel skuamosa. Terkait dengan infeksi *EBV*, yang terdapat pada karsinoma rongga mulut akan diekspresikan berbagai produk gen laten antara lain *EBER*, *LMP-1* dan *EBNA-1*. Dengan mengkaji keragaman ekspresi gen *EBV* pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut diharapkan dapat digunakan sebagai upaya pencegahan dini.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksploratif dengan menggunakan penderita karsinoma sel skuamosa rongga mulut (KSSRM) sebagai obyek penelitian. Pada penelitian ini diperiksa sebagai variabel adalah ekspresi produk gen laten virus *Epstein-Barr* yaitu: *latent membrane protein-1 (LMP-1)*, *EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1)* dan *EBV RNA (EBER)*. Untuk mendapatkan sampel dilakukan secara *purposive*, didasarkan pada kriteria klinis dan hasil pemeriksaan histopatologis dengan diagnosis karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

Penentuan ekspresi *EBER* dengan menggunakan metode insitu hibridisasi. Penentuan ekspresi *Latent Membrane Protein-1 (LMP-1)* dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal *LMP-1* produksi Novo, ekspresi *EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1)* dengan metode imunohistokimia menggunakan antibodi monoklonal *EBNA-1* produksi Novo.

Penelitian ini dilakukan di RSUD. Dr. Soetomo Surabaya Jawa Timur sebagai sentra Rumah Sakit di Indonesia Bagian Timur, Laboratorium Histopatologi di Bagian Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unair untuk pemeriksaan histopatologi dengan pengecatan Hematoksin Eosin guna menentukan diagnosis karsinoma sel skuamosa rongga mulut, Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSUD. Dr. Soetomo untuk melakukan biopsi operasi, Laboratorium Patobiologi di Gramik Fakultas Kedokteran Unair untuk penyimpanan jaringan segar dengan nitrogen cair dan pemeriksaan imunohistokimia. Pemeriksaan insitu hibridisasi dilakukan di laboratorium biomolekuler histologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Semua penderita yang memenuhi kriteria sebagai karsinoma sel skuamosa rongga mulut diikutsertakan dalam penelitian. Penderita kemudian dilakukan biopsi operasi oleh ahli bedah kanker. Semua penderita yang dilakukan biopsi operasi telah menandatangani lembar persetujuan (*informed consent*). Unit analisis penelitian berupa jaringan hasil biopsi operasi dengan ukuran volume sampel minimal $1 \times 1 \times 1$ mm.

Kriteria sampel: 1) umur antara 30–70 tahun; 2) bangsa Indonesia suku Jawa; 3) tidak menderita tumor dan keganasan lain; 4) secara klinis tidak menderita infeksi dan kondisi umum baik; 5) penderita dari instalasi Bedah Onkologi Kepala Leher RSUD. Dr. Soetomo yang datang untuk pertama kali dengan diagnosa karsinoma sel skuamosa rongga mulut.

Cara kerja: pengambilan spesimen biopsi kanker

rongga mulut dilakukan di gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSUD. Dr. Soetomo Surabaya, oleh tim dokter bedah kepala dan leher yang diberi wewenang membantu penelitian. Hasil biopsi segera dimasukkan ke dalam nitrogen cair dengan suhu -170° C dan menunggu proses pemeriksaan. Pewarnaan imunohistokimia: 1) spesimen biopsi mukosa rongga mulut setelah difiksasi dengan *buffer* formalin selanjutnya dilakukan dehidrasi dan pembuatan blok parafin menggunakan metode baku. Selanjutnya disiapkan kaca obyek yang telah dilapisi poli L lisin, pemotongan blok parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan $5 \mu\text{m}$, potongan jaringan ditebarkan atau diapungkan pada permukaan bak pemanas berisi air hangat, selanjutnya jaringan yang telah menempel pada *slide* dilakukan deparafinisasi dan sediaan siap untuk dilakukan pewarnaan; 2) pewarnaan dilakukan dengan menggunakan antibodi monoklonal *LMP-1* dan *EBNA-1* dengan teknik *Avidin Biotin Complex* (Novo Castra Biotin System), bertujuan supaya hasil pewarnaan menjadi lebih kuat dan jelas karena telah teramplifikasi. Teknik insitu hibridisasi sesuai dengan metode yang dipublikasikan oleh DAKO, untuk menganalisis RNA. Teknik produk DAKO yaitu menggunakan *probe peptida nucleic acid (PNA)* *EBV-RNA (EBER)* yang telah dicoba dengan jaringan atau sel yang berisi *EBV*, *CMV*, *HHV*, *HSV*, *VZV*, *HBV* namun hanya positif pada jaringan yang terinfeksi *EBV*. Pembuatan *slide* preparat berasal dari jaringan segar, dicelupkan dalam *cryomatrix*, kemudian dilakukan potong beku setebal $5 \mu\text{m}$. Teknik ini didasarkan pada pembentukan dupleks antara dua untai asam nukleat yang komplementer, kemudian terjadi pasangan secara tepat antara dua untai DNA RNA yang komplementer. Ada 3 unsur yang penting yaitu: DNA pelacak, DNA target dan deteksi *signal*. Langkah kerja: 1) denaturasi fragmen DNA sehingga menjadi rantai tunggal dengan memberi $150 \mu\text{l}$ proteinase K terlarut TBS; 2) kemudian dilakukan hibridisasi dengan memberi *fluorescent conjugated PNA probe* maka DNA pelacak mencari pasangannya yang komplementer, dengan memasukkan *slide* dalam inkubator temperatur 55° C selama 1,5 jam; 3) tahap berikutnya adalah deteksi *signal*, sebelumnya harus dicuci dengan *astringent wash solution* selama 25 menit pada suhu 55° C, deteksi *signal* ini dengan memberi enzim biotin-fosfatase (anti FITC/AP). AP ini yang akan mengubah substrat menjadi senyawa yang memancarkan sinar yang tidak larut dan tetap ada pada tempat DNA hibrid. Hasil hibridisasi ini dapat stabil selama 1 tahun pada suhu kamar, selain itu dapat dihitung perubahan warna atau sinar yang terpancar dalam beberapa jam. Teknik ini sangat peka oleh karena hanya bereaksi pada DNA target saja. Penilaian hasil pewarnaan secara mikroskopis dilakukan secara kualitatif dengan melihat intensitas penyerapan warna, serta secara kuantitatif dengan menghitung jumlah sel yang positif menyerap warna. Setelah pemeriksaan mikroskopis, selanjutnya dilakukan pengambilan dokumentasi mikrofoto dengan kamera digital Pentax Optio 230 2.0 mega pixel, film Kodak Asa 200 dicetak pada kertas dengan pantulan cahaya minimal.

Etik penelitian dilaksanakan sesuai dengan kaidah yang berlaku. *Ethical clearance* dari komisi etik yang memenuhi *Declaration of Helsinki*.

HASIL

Mengingat pengambilan sampel secara purposive maka semua kasus yang memenuhi kriteria diikuti dalam penelitian. Didapatkan 25 kasus KSSRM yang terdiri 17 kasus terinfeksi *EBV*, 8 kasus tidak terinfeksi.

Tabel 1. Perbedaan ekspresi *LMP-1*, *EBER* dan *EBNA-1* pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi dan tidak terinfeksi

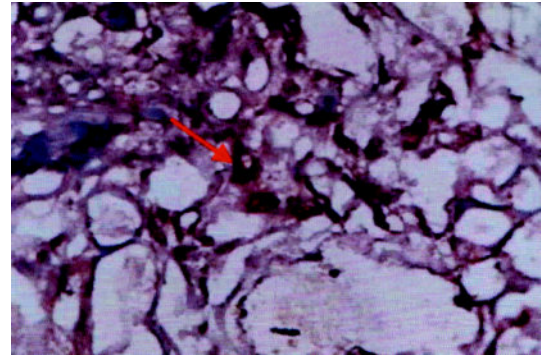
Variabel	Kelompok KSSRM		Karsinoma sel skuamosa rongga mulut	
			Terinfeksi	Tidak terinfeksi
	Jumlah rata-rata	%	Jumlah rata-rata	%
<i>LMP-1</i>	16,47	28,28	0	0
<i>EBER</i>	26,06	46,47	0	0
<i>EBNA-1</i>	14,71	25,26	0	0

Dari hasil penelitian terhadap 17 kasus karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang terinfeksi *EBV*. Ditemukan ekspresi gen *latent membrane protein-1 (LMP-1)* 28,28% (gambar 2), *EBER* (gambar 1) sebesar 46,47% dan *EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1)* 25,26% (gambar 3), dapat dilihat pada tabel 1.

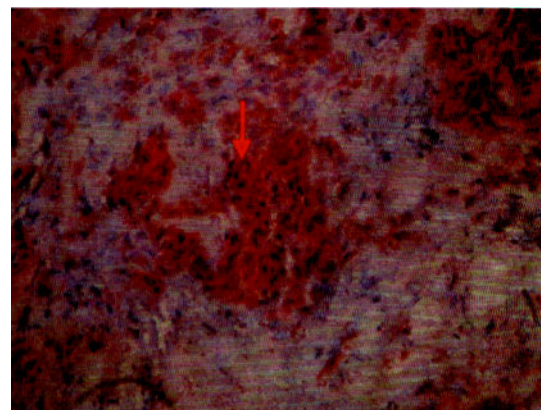
Tabel 2. Jumlah anggota sampel KSSRM dengan ekspresi gen *EBV (LMP-1, EBER dan EBNA-1)*.

No.	KSSRM	Ekspresi gen <i>EBV</i>		
		<i>LMP-1</i>	<i>EBNA-1</i>	<i>EBER</i>
1.	KSSRM	+	+	+
2.	KSSRM	+	+	+
3.	KSSRM	+	+	+
4.	KSSRM	-	-	+
5.	KSSRM	+	-	+
6.	KSSRM	+	+	+
7.	KSSRM	-	-	+
8.	KSSRM	+	-	+
9.	KSSRM	+	+	+
10.	KSSRM	-	-	+
11.	KSSRM	-	-	+
12.	KSSRM	-	-	+
13.	KSSRM	+	-	-
14.	KSSRM	-	+	-
15.	KSSRM	-	+	-
16.	KSSRM	+	-	-
17.	KSSRM	-	-	+

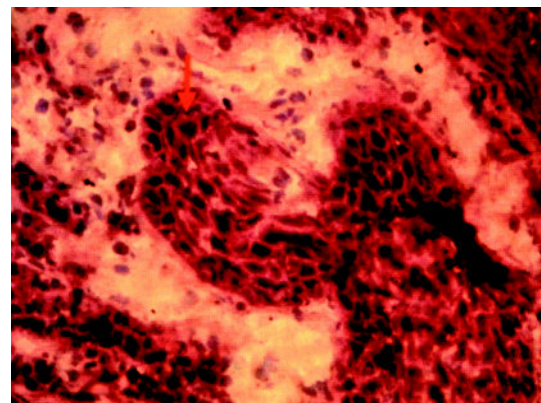
Berdasarkan keragaman genetik *EBV* yang diekspresikan, tampak terdapat perbedaan kuantitatif ekspresi genetik tersebut. Dari 17 kasus di atas, sebanyak 5 kasus KSSRM diekspresikan 3 ragam ekspresi gen laten *EBV* baik *LMP-1* maupun *EBNA-1* dan *EBER*, 2 kasus diekspresikan *LMP-1* saja, dan 2 kasus hanya diekspresikan *EBNA-1*, sedangkan yang diekspresikan *EBER* sebanyak 4 kasus, 2 kasus diekspresikan dua gen laten yaitu *LMP-1* dan *EBER*.



Gambar 1. Sel kanker dengan *insitu hybridization EBER*, inti berwarna coklat kehitaman dan kecil (pembesaran 400 kali).



Gambar 2. Sel kanker dengan ekspresi *LMP-1*, menggunakan *monoclonal antibody LMP-1*, pada membran inti berwarna coklat kehitaman (pembesaran 400 kali).



Gambar 3. Sel kanker dengan ekspresi *EBNA-1*, menggunakan *monoclonal antibody EBNA-1*, pada inti berwarna coklat kehitaman (pembesaran 400 kali).

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya yang merupakan sentra seluruh rumah sakit di Indonesia bagian Timur, ditemukan 3 ragam produk gen laten *EBV* yang diekspresikan yaitu *LMP-1*, *EBER* dan *EBNA-1* pada KSSRM. Hal ini sesuai dengan pendapat Nicholson *et al.*⁶ bahwa *LMP-1* dapat menyebabkan transformasi sel. Demikian pula laporan Gonzales *et al.*⁷ bahwa pada KSSRM penduduk Eropa ditemukan ekspresi *LMP-1*. Walaupun jumlah yang ditemukan di Eropa lebih banyak dibandingkan temuan peneliti kemungkinan berbagai faktor lain yang mempengaruhi. Ekspresi isolat *EBV* juga dipengaruhi oleh faktor ras genetik dan geografis.⁸

Ragam genetik *EBV* lain yang diekspresikan pada KSSRM yang ditemukan di RSUD. Dr. Soetomo adalah *EBV nuclear antigen-1 (EBNA-1)*. Dibandingkan dengan jumlah *LMP-1*, ternyata *EBNA-1* lebih kecil diekspresikan pada KSSRM. Keadaan ini mendukung laporan terdahulu oleh Middeldorp *et al.*,¹ bahwa *EBNA-1* banyak terkait dengan keganasan karena dapat meningkatkan aktivitas faktor transkripsi, namun ekspresi gen ini sangat spesifik hanya terdapat pada jenis kanker tertentu saja. Mengingat hal itu, maka diduka KSSRM adalah salah satu jenis kanker yang dipergunakan oleh ekspresi *EBNA-1*. Dengan diketemukan ekspresi *EBNA-1* pada KSSRM merupakan hal baru. Gen *EBNA-1* ini menyandi faktor transaktivator yang dibutuhkan untuk replikasi DNA, selain itu dapat berikatan dengan RNA melalui regio pengulangan *Gly-Ala*. Keberadaan *EBNA-1* secara laten akan mempertahankan hidup *EBV*. *EBNA-1* juga akan mengaktifkan faktor transkripsi, baik untuk *EBNA-1* sendiri maupun *EBNA* yang lain, seperti *EBNA 2A*, *2B*.³

Pada penelitian ini didapatkan ekspresi *EBER* yang paling banyak dibanding gen laten lainnya. Hal ini dapat dimengerti bahwa *EBER* pada fase laten akan ditranskripsi dalam jumlah banyak yaitu 10^6 – 10^7 per sel. *EBER* mempunyai kemampuan mengaktifkan transkripsi terhadap genom virus yang lain yaitu, *latent membran protein (LMP)* dan *EBV nuclear antigen (EBNA)*. Mengingat hal itu maka keberadaan *EBER* di dalam sel inang akan semakin meningkatkan aktivitas virus. Selain itu *EBER* berperan terhadap transkripsi dan menghambat apoptosis. Hal ini didukung oleh Komano and Takada⁹ bahwa ekspresi *EBER* meningkatkan ekspresi *bcl-2*. Peningkatan ekspresi *bcl-2* ini akan menghambat pelepasan *cytochrom-C* sehingga tidak terjadi *cascade caspase*. Hal ini menyebabkan tidak terjadi apoptosis.

Pada penelitian ini juga ditemukan kasus KSSRM dengan dua ragam genetik *EBV* yang diekspresikan secara bersama. Keadaan ini semakin memperkuat laporan sebelumnya bahwa genom *EBV* bila berada pada sel inang berbentuk *latent episome* terdiri dari beberapa ragam genetik yang akan diekspresikan. Keberadaan keragaman gen laten *EBV* tersebut akan menyebabkan proliferasi sel inang berlebihan. Hal ini memicu karsinogenesis dan mempercepat progresivitas. Karsinogenesis terjadi melalui

berbagai tahapan atau multistep dan multi *hits*.^{10,11,12} Berbagai faktor penyebab yang kompleks juga merupakan hal yang perlu dikaji lebih jauh. Selain itu berbagai faktor genom regulator yang mengatur proses proliferasi sel dan apoptosis sangat penting peranan terhadap karsinogenesis.

Mengingat hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui peran tiap ekspresi gen laten *EBV* terhadap gen regulator proliferasi dan apoptosis. Seperti onkogen, supresor gen, gen *repair*. Hal ini untuk membuktikan pendapat King¹⁰ bahwa karsinogenesis terjadi karena ketidak seimbangan antara proliferasi dan apoptosis sel, serta keberadaan mutasi gen.

Dapat disimpulkan bahwa pada karsinoma sel skuamosa rongga mulut yang ditemukan di RSUD. Dr. Soetomo yang merupakan sentra seluruh rumah sakit di Indonesia Timur diekspresikan tiga ragam gen *EBV* yaitu *latent membrane protein-1 (LMP-1)*, *EBV RNA (EBER)* dan *epstein barr nuclear antigen-1 (EBNA-1)*. Disarankan perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui peran ekspresi genetik *EBV* terhadap gen regulator proliferasi dan apoptosis sel kanker.

DAFTAR PUSTAKA

- Middeldorp JM, Antoinette ATP, Brink, Adrian JC van den Brule, Chris JLM Meiger. Pathogenic roles for epstein-barr virus (EBV) gene product in EBV-associated proliferative disorder. *Oncology* 2003; 45: 1–36.
- Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, Iyama K. Epstein-Barr Virus Subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a sub tropical island in southern Japan, compared with Kitakyusyu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol* 2002; 55: 414–23.
- Hu, Li Fu. Nasopharyngeal carcinoma and Epstein-Barr virus. *Microbiology and Tumor Biology Center, Karolinska Institute. Stockholm* 1996; 15–25.
- Aitken C, Sengupta SK, Aedes C, Moss DJ, Scully TB. Heterogeneity within the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 gene in different strains of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* 1994; 75: 95–100.
- Shimakage M, Horri K, Tempaku A, Kakudo K, Shirotsuka T, Sasagawa T. Association of EBV with oral cancers. *Hum Pathol* 2002 Jun; 33(6): 608–14.
- Nicholson LJ, Hopwood P, Johannessen I, Salisbury JR, Codd J, Thorley-Lawson D, Crawford H. Epstein-Barr virus latent membrane protein does inhibit differentiation and induces tumorigenicity of human epithelial cells. *Oncogenesis* 1997; 15: 275–83.
- Gonzales, M, Gutierrez, Rodriguez, Avila R, Archilla R. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2002; 112(3): 482–87.
- Degreef H and the Famciclovir Herpes Clinical Study Group. Famciclovir, a new oral antiherpes drug: result of the first controlled clinical study demonstrating its efficacy and safety in the treatment of uncomplicated herpes zoster in immunocompetent patients. *Int J Antimicrob Agent* 1994; 4: 241–6.
- Komano Jun, Kenzo Takada. Role of *bcl-2* in Epstein-Barr virus-induced malignant conversion of Burkitt's Lymphoma cell line Akata. *J of Virology* 2001 Feb; 1561–4.
- Mendelson J, Howley PM, Israel M, Liotta LA. Tumor suppressor genes. In the molecular basis of cancer. Philadelphia: WB Saunders Co; 1995. p. 86–100.
- King, Roger JB. Growth: a balance of proliferation, death and differentiation in cancer biology. 2nd ed. Prentice Hall; 2000. p. 146–70.
- Putra ST. Biologi molekuler kedokteran. Edisi 1. Surabaya: Airlangga University; 1997. p. 59–89.