
KARAKTERISTIK SEL KANKER ORAL BARU (Sp-C1) DAN UJI HAMBATAN PERTUMBUHAN SEL Sp-C1 MENGUNAKAN TERAPI GEN pcDNA3.1 -p27Kip1 mutant type *in vitro*

(CHARACTERISTICS OF NEW ORAL CANCER CELL (Sp-C1) AND TEST
OF Sp-C1 CELL GROWTH INHIBITION USING A pcDNA
3.1-p27Kip1 mutant type gene *in vitro*)

Supriatno

Departemen Oral Medicine
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Denta Sekip Utara, Yogyakarta

Abstract

Primary cell of oral cancer (cell Sp-C1) has some characteristics of cell growth and protein expression of anti-apoptosis and positive regulatory protein of cell cycle. Characteristics of Sp-C1 cell are important to know and facilitate the researchers used an *in vitro* model of oral cancer cells. The aim of study was to introduce new types of oral cancer cells (cell Sp-C1) with their characteristics and to examine the cell growth inhibition of Sp-C1 using mutant type p27Kip1 gene therapy *in vitro*. Isolation of Sp-C1 cell was derived from cervical lymph node tissue of tongue cancer patient. From the isolation procedure was found fibroblasts and oral cancer primary cells were incubated at refrigerator -80°C. Growth inhibition of Sp-C1 cell was transfected with mutant type p27Kip1 and pcDNA3.1-neo (empty vector) using the MTT assay. Results of study revealed that characteristics of Sp-C1 cell growth was relative fast and highly protein expression of p45Skp2, α -tubulin, cyclin-dependent kinase-2 (CDK-2), cyclin-E, metastatic associated protein-1 (MTA-1) and anti-apoptosis protein maspin. Furthermore, Sp-C1-pcDNA3.1-p27Kip1 mt was significantly suppressed the cell growth compared with pcDNA3.1-neo ($P < 0.05$). In conclusion, Sp-C1 cells have certain characteristics and appropriate for an *in vitro* studies model of oral cancer. pcDNA3.1-p27Kip1 mt had strongly potential inhibition of Sp-C1 cell growth. Method of gene transfer *in vitro* had a simple procedure and a new strategy of gene therapy against oral cancer cells.

Key words: cell characteristic, Sp-C1, p27Kip1 mt, protein expression, anti-apoptosis

Abstrak

Sel primer kanker oral (sel Sp-C1) mempunyai beberapa karakteristik pertumbuhan sel dan ekspresi protein anti-apoptosis maupun protein regulator positif siklus sel. Karakteristik sel Sp-C1 penting diketahui untuk memudahkan peneliti menggunakan model *in vitro* sel kanker oral. Tujuan penelitian adalah memperkenalkan jenis sel kanker oral baru (sel Sp-C1) dengan karakteristiknya, serta menguji hambatan pertumbuhan sel Sp-C1 menggunakan terapi gen p27Kip1 mt secara *in vitro*. Isolasi sel Sp-C1 berasal dari jaringan limfonodi servikal yang termetastasis kanker lidah. Proses isolasi didapatkan fibroblas dan sel primer kanker oral yang diinkubasi pada refrigerator -80°C. Hambatan pertumbuhan sel Sp-C1 diperlakukan dengan terapi gen pcDNA3.1-p27Kip1 mt dan pcDNA3.1-neo (*empty vector*) menggunakan uji MTT. Hasil penelitian menunjukkan karakteristik pertumbuhan sel Sp-C1 yang relatif cepat dan ekspresi protein p45Skp2, α -tubulin, cyclin-dependent kinase-2 (CDK-2), cyclin-E, metastatic associated protein-1 (MTA-1) dan protein anti-apoptosis maspin. Selanjutnya, sel transfektan Sp-C1-pcDNA3.1-p27Kip1 mt mempunyai potensi hambatan pertumbuhan sel yang signifikan dibandingkan pcDNA3.1-neo ($P < 0.05$). Kesimpulan, sel Sp-C1 mempunyai karakteristik tertentu dan dapat digunakan sebagai model penelitian *in vitro* kanker mulut. pcDNA3.1-p27Kip1 mt mempunyai potensi hambatan pertumbuhan sel Sp-C1 yang kuat. Metode transfer gen secara *in vitro* merupakan prosedur yang sederhana dan suatu strategi baru terapi gen terhadap sel kanker oral.

Kata kunci: karakteristik sel, Sp-C1, p27Kip1 mt, ekspresi protein, anti-apoptosis

PENDAHULUAN

Kanker oral merupakan penyakit dengan karakteristik gangguan atau kegagalan mekanisme pengaturan multiplikasi organisme multiseluler sehingga terjadi perubahan perilaku sel yang tidak terkontrol di rongga mulut. Kanker oral disebabkan rusaknya mekanisme pengaturan dasar perilaku sel, khususnya mekanisme pertumbuhan dan diferensiasi sel. Kanker tersebut ditandai dengan kerusakan DNA, menyebabkan pertumbuhan otonom yang tidak merespons faktor regulasi pertumbuhan normal. Kanker oral mempunyai angka kematian yang tinggi.¹ Dari seluruh jenis kanker pada manusia, kanker leher-kepala menempati urutan ke-6, dan paling banyak kasus yang timbul adalah kanker oral. Kanker oral merupakan kanker ganas yang mempunyai rerata lamanya hidup paling rendah diantara kanker ganas mayor. Kanker oral mempunyai persentase 2-5% dari seluruh kanker pada manusia.² Kanker oral merupakan salah satu masalah kesehatan utama yang ditunjukkan dengan tingginya insidensi penyakit tersebut di belahan dunia. Di negara-negara Asia Tenggara, kanker oral adalah bentuk paling umum dan insidensinya sepertiga dari semua kanker manusia.¹ Kanker oral ditandai dengan tingginya tingkat invasi dan metastasis ke limfonodi regional, serta kekambuhan lokal pasca pengobatan awal, kemungkinan terjadinya mikro-invasi dan/atau mikro-metastasis sel-sel kanker primer.² Pengobatan kanker oral secara konvensional termasuk radioterapi kemoterapi, pembedahan dan kombinasi ketiganya masih belum memuaskan. Namun, tingkat kelangsungan hidup secara keseluruhan masih belum meningkat secara signifikan dalam dua dekade terakhir.³ Prognosis kanker oral juga tidak berubah selama 10 tahun terakhir.⁴ Kondisi tersebut mengindikasikan perlunya upaya terus meningkatkan modalitas pengobatan.

Pengobatan kanker oral sampai saat ini masih belum maksimal. Penelitian-penelitian terus dilanjutkan dan dilakukan untuk mendapatkan hasil pengobatan yang efektif dan efisien secara *in vitro*, *in vivo*, dan klinis menggunakan tanaman herbal, obat sintesis atau kemoterapi serta terapi lain termasuk terapi gen.⁵ Namun demikian, model penelitian *in vitro* menggunakan jenis biakan sel kanker oral baru perlu pula dilakukan. Manfaat sel kanker oral baru ini memudahkan peneliti menggunakan model sel kanker oral dari manusia untuk jenis penelitian *in vitro*. Dalam penelitian ini, diperkenalkan jenis sel kanker oral baru (Sp-C1) dengan karakteristiknya dan uji hambatan pertumbuhan sel Sp-C1 menggunakan terapi gen p27Kip1 *mutant type* (mt) *in vitro*.

Salah satu anggota famili Cip/Kip dari *cyclin-dependent kinase* (CDK) inhibitor adalah p27Kip1 yang mengatur pertumbuhan sel secara negatif pada fase G1-S siklus sel dengan menonaktifkan aktivitas kinase kompleks cyclin E/Cdk-2 maupun Cyclin A/Cdk-2.⁶ Rendahnya ekspresi p27Kip1 berhubungan dengan prognosis buruk dan tingkat keganasan tinggi pada beberapa kanker manusia, termasuk kanker kolon,⁷ payudara,⁸ gastrik,⁹ paru,¹⁰ prostat adenokarsinoma,¹¹ ovarian,¹² tiroid¹³ dan limfoma maligna.¹⁴ Disrupsi atau kelainan mekanisme pengaturan siklus sel oleh p27Kip1 berhubungan erat dengan pertumbuhan dan perkembangan sel kanker. Defisiensi p27Kip1 menyebabkan perkembangan tumor endokrin dan ukuran tubuh yang besar, serta menyebabkan hiperplasi organ multipel.¹⁵ Walaupun aktivitas p27Kip1 dapat sebagai penghambat pertumbuhan beberapa jenis kanker manusia, tetapi mekanisme regulasi hambatannya pada kanker solid masih belum jelas.

Sel Sp-C1 merupakan sel kanker primer solid rongga mulut yang diisolasi dari pasien kanker lidah yang telah bermetastasis ke limfonodi regional, belum melibatkan jaringan otot dan mempunyai diferensiasi ringan (*mild differentiation*). Sel Sp-C1 hasil isolasi dapat tumbuh cepat jika dibiakkan dalam media dengan serum lebih dari 10 %. Sel Sp-C1 telah banyak diteliti sebagai model *in vitro* dengan menginduksi sel tersebut menggunakan obat herbal, sintesis dan terapi gen.¹⁶⁻²²

Tujuan penelitian ini adalah memperkenalkan jenis sel kanker baru dirongga mulut (sel Sp-C1) dengan karakteristiknya, serta menguji daya hambat pertumbuhan sel Sp-C1 menggunakan terapi gen p27 Kip1 mt *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Metode isolasi sel kanker oral Sp-C1 berasal dari jaringan limfonodi servikal yang telah termetastasis sel kanker lidah. Jaringan kanker oral segar dalam cawan petri ($\varnothing = 60$ mm) berisi larutan *phosphate buffer saline* (PBS, Sigma-Aldrich, USA) steril dan penisilin-streptomisin (Penstrep; Gibco, USA) dibawa ke laboratorium. Pada jaringan tersebut dilakukan proses fisik dengan memotong-motong menjadi bagian kecil dalam *laminar-flow clean bench* steril (Thermo scientific, USA). Hasil proses diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya (Olympus, Japan) dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan dan perkembangan sel baru. Hasil pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya menunjukkan adanya pertumbuhan jaringan fibroblas baru dan sel baru. Selanjutnya sel baru diberi tanda atau label

pada cawan petri

Isolasi sel fibroblas dilakukan menggunakan *Whatmann paper* yang telah direndam larutan EDTA-Trypsin 0,25% (Sigma-Aldrich, USA) dalam cawan petri (Falcon, USA). Selanjutnya, cawan petri ditambahkan *Dulbecco's Modified Eagle Media* (Sigma-Aldrich, USA) 10% *Foetal bovine serum* (FBS, Moregate, Australia). Sel fibroblas diinkubasi pada suhu 37°C setelah serial tripsinasi dilakukan. Kemudian, sel fibroblast baru *distock* dan disimpan dalam refrigerator suhu -80°C.

Isolasi sel kanker oral baru dilakukan dengan prosedur yang sama, yaitu *Whatmann paper* yang telah direndam larutan EDTA-Trypsin 0,25% (Sigma-Aldrich, USA) diletakkan pada dasar cawan petri sesuai dengan tanda atau label yang telah dibuat dan diinkubasi pada suhu 37°C. selama \pm 5 menit. *Whatmann paper* dipindah ke petri baru berisi DMEM 10% FBS dan diinkubasi selama 24 jam. Serial prosedur tripsinasi dilakukan sampai diperoleh sel baru bebas fibroblast. Sel-sel baru tersebut dikloning dengan label *clone-1* sampai dengan *clone-10*. Sel baru dengan pertumbuhan yang tercepat dan sehat adalah sel yang dipelihara dan diberi nama atau label baru, yaitu Sp-C1.

Karakteristik sel kanker oral (Sp-C1) baru berasal dari penderita kanker lidah yang telah bermetastasis ke limfonodi servikal. Sel Sp-C1 diisolasi dari limfonodi servikal pasca *neck dissection*. Sel Sp-C1 mempunyai diferensiasi baik (*well differentiation*) dan belum mengalami invasi ke jaringan otot. Dalam kultur sel, Sp-C1 tumbuh cepat dalam *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) 10% FBS (Foetal Bovine Serum, tetapi akan tumbuh lambat jika menggunakan media *Rosswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich, USA). Morfologi sel Sp-C1 terlihat bentuk sel tidak beraturan seperti bulat oval, lonjong dan pipih, tidak berkontak interseluler atau hidup mandiri jika belum penuh pertumbuhannya (belum *confluent*). Sel Sp-C1 yang sehat selalu melekat erat di dasar cawan Petri (Falcon, USA) dan tidak mengambang di permukaan media, kecuali sel yang telah mati. Sel Sp-C1 mempunyai karakteristik kuat terhadap ekspresi protein p45Sklp2, α tubulin, *cyclin-dependent kinase-2* (CDK-2), *cyclin-E*, *metastatic associated protein-1* (MTA-1), p27Kip1, dan protein anti-apoptosis termasuk maspin. Sel Sp-C1 mempunyai sifat tumorigenisitas positif terhadap tikus Nude dan tumorigenisitas negatif terhadap mencit Wistar maupun tikus Sprague Dawley.

Konstruksi ekspresi vektor mamalia pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt (*containing sense-oriented human mutant type p27^{Kip1} cDNA*) dilakukan sebagai berikut: pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, USA) merupakan eks-

presi vektor mamalia yang berisi promoter sitomegalo virus. pcDNA3.1 (+) dilarutkan dengan AgeI (Takara Biomedicals, Japan) dan NheI (Takara), kemudian didefosforilasi menggunakan *calf intestinal alkaline phosphatase* (Roche Diagnostics, Germany). Fragmen p27^{Kip1} mt [mutasi dari Thr-187/Pro-188 (ACGCCC) menjadi Met-187/Ile-188 (ATGATC) disiapkan dari ekspresi vektor pORF9-p27 mt yang termasuk artifisial p27^{Kip1} mt (Invivo Gen, USA). Selanjutnya fragmen terikat dengan pcDNA3.1 (+). Dengan menggunakan analisis *sequencing*, ikatan fragmen tersebut dikonfirmasi menggunakan primer spesifik p27^{Kip1}-SQP1: 5'-ATGTCAAACGTGCGAGTGTC-3' untuk p27^{Kip1} cDNA manusia. *Sequencing DNA* ditentukan dengan metode *dideoxy chain termination* menggunakan *fluorescens-labeled* primer dan *thermo sequenase cycle sequencing kit*.²³ Pada penelitian ini, plasmid cDNA3.1-p27^{Kip1} mt dan cDNA3.1-neo diperoleh dari Dr. Koji Harada ph.D (Department of Therapeutic Regulation for Oral Tumor, Institute of Health Biosciences, Tokushima University, Japan).¹⁶

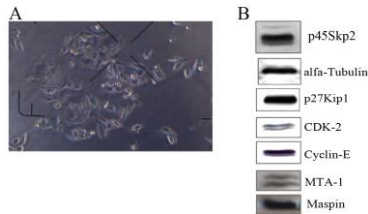
Sel Sp-C1 (2×10^4 sel/sumur) yang telah ditransfeksi dengan pcDNA3.1-neo (kontrol) dan pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt (*treatment*) dibiakkan dalam cawan petri 96 sumuran (Falcon, USA) dengan media DMEM 10% FBS (Sigma-Aldrich, USA). Setelah 24 jam, media diganti dengan medium yang mengandung Geneticine (Sigma-Aldrich, USA) atau tidak mengandung Geneticine. Setelah 24 dan 48 jam inkubasi, 20 μ l 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/ml PBS) (Sigma-Aldrich, USA) dimasukkan ke dalam setiap sumuran. Setelah 4 jam inkubasi, media kultur dibuang dan diganti dengan 100 μ l DMSO (Nacalai tesque, Japan). Densitas optik (OD) diukur pada panjang gelombang 540 nm menggunakan *Bio-Rad microplate reader* (Bio-Rad, USA). Penelitian dilakukan dengan 6 kali replikasi.¹⁷

Analisis statistik dilakukan dengan program Stat Work menggunakan komputer Macintosh (Cricket Software, Philadelphia, PA). Perbandingan statistik antar kelompok dilakukan dengan uji LSD. Perbedaan signifikan ditentukan dengan $p < 0,05$.

HASIL

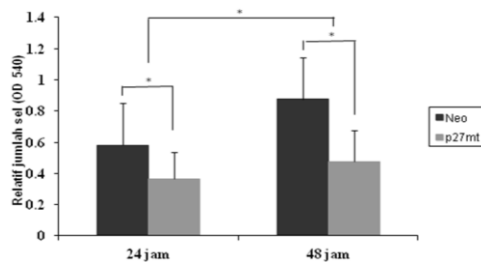
Sel Sp-C1 sebagai model penelitian *in vitro* sel kanker oral mempunyai morfologi dan pertumbuhan sel spesifik. Morfologi sel Sp-C1 dan ekspresi beberapa protein hasil analisis menggunakan *Western blotting* ditunjukkan pada Gambar 1. Morfologi sel Sp-C1 tampak tidak beraturan seperti bulat, bulat oval, lonjong dan pipih. Sel Sp-C1 yang sehat selalu

melekat erat di dasar cawan petri dan tidak mengambang di permukaan media, kecuali sel mati. Sel Sp-C1 mempunyai ekspresi protein spesifik terutama protein anti-apoptosis (maspin dan MTA-1), protein regulasi negatif siklus sel (komplek CDK 2-Cyclin E), protein pemacu tumor (p45Skp2) dan satu protein regulasi positif siklus sel jika sel Sp-C1 ditransfeksi dengan gen p27Kip1 mt, yaitu p27Kip1.



Gambar 1. Karakteristik sel kanker oral baru (sel Sp-C1) A. Morfologi dan pertumbuhan sel Sp-C1 yang belum *confluent*. B. Ekspresi beberapa protein yang dihasilkan sel Sp-C1 melalui analisis *Western blotting*

Relatif jumlah sel kanker Sp-C1 yang telah ditransfeksi dengan pcDNA3.1-neo atau pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt dievaluasi dengan membandingkan absorbansi setiap sel pada hari ke-1 dan 2 menggunakan uji MTT. Terlihat perbedaan bermakna terjadi pada sel Sp-C1 transfektan. Jumlah sel Sp-C1 pcDNA3.1-p27^{Kip1}mt menunjukkan hambatan pertumbuhan yang bermakna dibandingkan dengan Sp-C1 pcDNA3.1-neo ($P < 0,05$). Hambatan sel Sp-C1 pcDNA3.1-p27^{Kip1}mt pada jam ke-48 lebih kuat dibandingkan jam ke-24. Besarnya hambatan sel Sp-C1 transfektan pada jam ke-24 dan -48 berturut-turut sebesar 37% dan 45,4% (Gambar 2). Perbedaan kekuatan hambatan tersebut dikarenakan sel Sp-C1 lebih lama berkontak dengan gen p27Kip1 mt dan paparan dosis yang lebih tinggi pada jam ke-48, menyebabkan toksik pada sel kanker oral tersebut. Selain itu, fungsi p27Kip1 sebagai regulator negatif siklus sel, menyebabkan hambatan pertumbuhan yang lebih tinggi pada jam ke-48.



Gambar 2. Uji hambatan pertumbuhan sel Sp-C1 menggunakan transfeksi gen pcDNA3.1-p27Kip1 mt dan pcDNA3.1-neo yang diinkubasi selama 24 dan 48 jam. * $P < 0,05$

PEMBAHASAN

Kultur sel Sp-C1 yang dibiakkan dalam cawan petri berisi DMEM 10% FBS mempunyai kecepatan pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan sel yang dibiakkan dalam media RPMI 1640 10% FBS. Kondisi tersebut merupakan salah satu karakteristik sel kanker oral Sp-C1 baru. Gambaran spesifik dan unik lain termasuk tumorigenisitas yang dapat bersifat positif atau negatif tergantung jenis tikus yang digunakan dalam penelitian. Tumorigenisitas positif tampak pada jenis tikus *Nude* dengan latar belakang Balb/C yang diinjeksi sel Sp-C1 *xenograft* sebanyak 1×10^6 sel/tikus pada bagian punggung tikus, sedangkan tumorigenisitas negatif terjadi pada tikus Wistar maupun Sprague-Dawley yang diinjeksi sel Sp-C1. Hasil tersebut mungkin karena kedua jenis tikus tersebut mempunyai daya tahan tubuh atau imun tubuh yang baik, sehingga sel-sel Sp-C1 yang diinjeksikan secara *xenograft* dapat dilisiskan.¹⁶ Karakteristik lain sel kanker oral Sp-C1 adalah ekspresi protein anti-apoptosis dan regulasi negatif siklus sel yang kuat. Protein anti-apoptosis atau *inhibitory apoptosis protein* (IAP) seperti protein maspin dan MTA-1 terekspresi pada sel Sp-C1. Begitu pula protein Cdk-2 dan *cyclin E* yang merupakan regulator negatif siklus sel terekspresi pada sel Sp-C1 melalui analisis *Western blotting* (Gambar 1). Semua protein tersebut merupakan protein pemicu tumor (*tumor promoter protein*) yang merupakan ciri khas sel kanker.

Ekspresi tinggi pada salah satu marker protein sel kanker oral, yaitu protein p45Skp2 yang merupakan co-aktivator p27Kip1 mengindikasikan bahwa Sp-C1 merupakan sel kanker oral dengan agresivitas pertumbuhan sel dan metastasis tinggi. Dilaporkan bahwa tingginya ekspresi p45Skp2 menunjukkan prognosis buruk dan tingkat keganasan tinggi pada penderita kanker kolon,¹⁸ limfoma,¹⁹ gastrik,²¹ oral,¹⁷ dan paru.²² p45Skp2 knock-out (-/-) pada tikus *Nude* menunjukkan pertumbuhan sel kanker lebih lambat dan meningkatkan aktivitas apoptosis dibandingkan kontrol atau p45Skp2 (+/+).²

Hasil penelitian menggunakan sel Sp-C1 yang ditransfeksi dengan gen pcDNA3.1-p27Kip1 mt dan pcDNA3.1-neo (*empty vector*) menunjukkan bahwa sel Sp-C1-pcDNA3.1-p27Kip1 mt dapat meningkatkan hambatan pertumbuhan sel kanker pada jam ke-24 sebesar 37% dan jam ke-48 sebanyak 45,4%. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa hambatan sel Sp-C1 disebabkan oleh gen p27^{Kip1} mt dan bukan oleh efek non spesifik seperti toksisitas *vector* atau plasmid. Dilaporkan bahwa transfeksi pcDNA3.1-p27Kip1 mt pada sel Sp-C1 yang diinjeksikan *xenograft* pada punggung tikus me-

meningkatkan hambatan pertumbuhan sel dengan menurunnya ukuran volume tumor tanpa menimbulkan gangguan pada berat badan tikus dan efek sistemik di tubuh²³. pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt dilaporkan lebih resisten terhadap degradasi ubiquitin-proteasom dan lebih stabil dibandingkan p27^{Kip1} *wild type* (wt), sehingga p27^{Kip1} mt mempunyai aktivitas antitumor lebih kuat dibandingkan p27^{Kip1} wt.¹⁵

Penggunaan plasmid (cDNA3.1)-neo terhadap pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt dimaksudkan sebagai kontrol vektor atau plasmid yang tidak diberi perlakuan apapun (*empty vector*). Dikarenakan gen *treatment* menggunakan pcDNA3.1 yang ditransfeksi dengan p27^{Kip1} mt menjadi pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt, maka idealnya sebagai kontrol internal menggunakan pcDNA3.1-neo. Supriatno et al.¹⁵ melaporkan penggunaan pcDNA3.1-neo sebagai kontrol internal terhadap pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt dan pcDNA3.1-p27^{Kip1} *wild type* (wt) yang bioaktivitas antitumornya sangat berbeda dibandingkan kontrol pada sel kanker leher-kepala.

Kesimpulan, sel Sp-C1 merupakan sel kanker oral baru kultur primer yang berasal dari jaringan epitel limfonodi servikal termetastasis kanker lidah yang mempunyai karakteristik pertumbuhan sel yang relatif cepat dalam DMEM 10% FBS, melekat erat pada dasar cawan petri dan mempunyai ekspresi protein spesifik terutama protein regulator positif siklus sel dan protein anti-apoptosis. Sel Sp-C1 cocok digunakan untuk model penelitian *in vitro* kanker mulut. pcDNA3.1-p27^{Kip1} mt mempunyai potensi hambatan pertumbuhan sel Sp-C1 yang kuat. Metode transfer gen secara *in vitro* merupakan prosedur yang sederhana dan suatu strategi baru terapi gen terhadap sel kanker oral.

Daftar Pustaka

- Petersen PE, Yamamoto T. Improving the oral health of older people: the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Comm Dent Oral Epidemiol* 2005; 33(2): 81-92.
- Supriatno, Yuletnawati SE, Widiasto A. Effect of intratumoral injection of mutant type p27^{Kip1} followed by *in vivo* electroporation on radiotherapy-resistant human oral tongue cancer xenografts. *Mol Med Report* 2011; 4(1): 41-6.
- Almofiti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M. The clinico-pathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2004; 25: 65-71
- Ford PJ, Farah CS. Early detection and diagnosis of oral cancer: Strategies for improvement. *J Cancer Pol* 2013; 1: e2-e7.
- Harada K, Supriatno, Kawashima Y, Yoshida H, Sato M. S-1 inhibits tumorigenicity and angiogenesis of human oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of phosphorylated Akt, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2. *Int J Oncol* 2007, 30(2): 365-374.
- Karthiga A, Tripathi SK, Shanmugam R, Suryanarayanan V, Singh SK. Targeting the cyclin-binding groove site to inhibit the catalytic activity of CDK2/cyclin A complex using p27(KIP1)-derived peptidomimetic inhibitors. *J Chem Biol* 2014; 8(1): 11-24.
- Lu H, Li H, Mao D, Zhu Z, Sun H. Nrdp1 inhibits growth of colorectal cancer cells by nuclear retention of p27. *Tumour Biol* 2014; 35(9): 8639-43.
- Huang J, Zhou N, Watabe K, Lu Z, Wu F, Xu M, Mo YY. Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis* 2014; 5(1): e1008-9.
- Wu X, Liu T, Fang O, Leach LJ, Hu X, Luo Z. miR-194 suppresses metastasis of non-small cell lung cancer through regulating expression of BMP1 and p27(kip1). *Oncogene* 2014; 33(12): 1506-14.
- Pandhare-Dash J, Mantri CK, Gong Y, Chen Z, Dash C. XMRV accelerates cellular proliferation, transformational activity, and invasiveness of prostate cancer cells by down regulating p27(Kip1). *Prostate* 2012; 72(8): 886-97.
- Skirnisdottir I, Seidal T. Association of p21, p27 and p53 status to histological subtypes and prognosis in low-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2013; 10(1): 27-34.
- Kotb MH, Zaher AM, Abd El-Wahab MA, Abulkheir IL, Hussein M, Salem SS. Prognostic value of p27 in follicular thyroid carcinoma and its relation to radioactive iodine response: does it aid in the modification of risk stratification? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2014; 22(7): 511-7.
- Seki R, Ohshima K, Okamura T. [Prognostic significance of Skp2 and p27(kip) in diffuse large B cell lymphoma. *Rinsho Ketsueki* 2010; 51(12): 1741-7.
- Wolf G, Schanze A, Stahl RA, Shankland SJ, Amann K. p27(Kip1) Knockout mice are protected from diabetic nephropathy: evidence for p27(Kip1) haplotype insufficiency. *Kidney Int* 2005; 68(4): 1583-9.
- Glover CE, Gurley KE, Kim KH, Stoner B, Ferro ML, Kemp CJ. Endocrine dysfunction in p27^{Kip1} deficient mice and susceptibility to Wnt-1 driven breast cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30(6): 1058-63.
- Supriatno, Harada K, Yoshida H, Sato M. Basic investigation on the development of molecular targeting therapy against cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} in head and neck cancer cells. *Int J Oncol* 2005; 27: 627-635.
- Supriatno. Intratumoral injection of pcDNA3.1-p27^{Kip1} followed by electroporation on a human tongue base cancer cell xenograft. *Dent J* 2009;

- 21:1-8.
19. Bochiş OV, Irimie A, Pichler M, Berindan-Neagoe I. The role of Skp2 and its substrate CDKN1B (p27) in colorectal cancer. *J Gastrointestin Liver Dis* 2015; 24(2): 225-34.
 20. Kullmann MK, Grubbauer C, Goetsch K, Jäkel H, Podmirseg SR, Trockenbacher A et al. The p27-Skp2 axis mediates glucocorticoid-induced cell cycle arrest in T-lymphoma cells. *Cell cycle* 2013; 12(16): 2625-35.
 21. Ma XM, Liu JH, Guo JW, Liu Y, Zuo LF. Correlation of Skp2 expression in gastric carcinoma to expression of P27 and PTEN. *Ai Zheng*. 2006; 25(1): 56-61.
 22. Hung WC, Tseng WL, Shiea J, Chang HC. Skp2 overexpression increases the expression of MMP-2 and MMP-9 and invasion of lung cancer cells. *Cancer Lett* 2010; 288(2): 156-61.