

PERANAN ISOZIM PROTEIN KINASE C-ALPHA DALAM MEMEDIASI EFEK ANTIPROLIFERASI ALPHA-TOKOFEROL PADA SEL STROMA PROSTAT

Basuki B. Purnomo

ABSTRACT

Objective: Alpha tocopherol, also has a non anti-oxidant activity that correlates with inhibition of PKC-alpha isozyme activity. Several studies confirmed its role in inhibition of vascular smooth muscle proliferation. Inhibition of stromal cell proliferation is an alternative method of prevention of BPH. The aim of this in vitro study is to confirm that alpha-tocopherol, by its ability to inhibit PKC-alpha activity, has the capability to inhibit human prostatic stromal cell proliferation. **Materials & Methods:** Primary cultures of human prostatic stromal muscle cells were obtained from 4 patients with bladder outlet obstruction. The effects of various concentrations of alpha-tocopherol (20, 30, 40, 50, and 60 microM) were examined by cell proliferation and PKC-alpha isozyme activity assay. The cell proliferation study was performed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay method. A caspase-3 activity assay was also performed to examine apoptotic mechanism. **Results:** The MTT method, which is used to count viable cells, showed that exposures to various doses of alpha-tocopherol resulted in a decreased proliferation rate. The decrement of proliferation rate is linear with the increment of alpha-tocopherol dose. Immunocytochemistry staining with anti caspase-3 antibody showed that no cells developed apoptosis. Alpha-tocopherol also inhibits PKC-alpha activity. Isozyme activity is reduced along with the increment of the dose (dose-dependent). There is a correlation between PKC-alpha activity with cell proliferation rate after exposure to alpha-tocopherol ($R^2=0,9279$; $p=0,000$). **Conclusion:** Alpha-tocopherol at different concentrations reduces prostatic stromal cell proliferation, without an effect on apoptosis. This antiproliferative property correlates with a decreased activity of PKC-alpha isozyme.

Keywords: Protein kinase c-alpha, primary culture, human prostatic stromal cells, antiproliferative effect.

Correspondence: Basuki B. Purnomo, c/o: Lab. Ilmu Bedah/SMF Urologi, FK Universitas Brawijaya/RS Dr. Saiful Anwar. Jl. J.A. Suprpto No. 2, Malang.

PENDAHULUAN

Hiperplasi prostat jinak (*Benign Prostate Hyperplasia*) adalah penyakit yang banyak dijumpai pada pria berusia lanjut. Sebetulnya, hiperplasia ini sudah dijumpai sejak pria berusia 30 tahun, dan hiperplasia ini meningkat selaras dengan bertambahnya usia. Pada usia 51 – 60 tahun prevalensinya 50%, dan pada usia di sekitar 80 tahun, prevalensinya menjadi lebih kurang 80%.¹

Massa prostat yang membesar dapat menyumbat uretra posterior, dan memberikan manifestasi klinis

berupa kesulitan miksi hingga terjadi retensio urine. Pembesaran massa ini lebih banyak disebabkan karena penambahan sel prostat, yakni sel stroma dan epitel; namun penambahan sel stroma lebih banyak dibandingkan dengan epitel,² yang pada umumnya disebabkan peningkatan laju proliferasi.³

Protein Kinase C (PKC) adalah salah satu protein enzim yang berperan dalam transduksi sinyal intraseluler yang berhubungan dengan proliferasi, permeabilitas, kontraksi, migrasi, apoptosis, dan sekresi.⁴⁻⁶ Salah satu isoformnya, yakni PKC-alpha,

diaktifkan oleh diasilgliserol (DAG) dan ion kalsium.^{4,7,8} Peranan PKC- α pada proses proliferasi sel telah banyak diteliti, dan salah satunya adalah melalui jalur *mitogen activated protein kinase* (MAPK). Dalam hal ini, PKC- α memfosforilasi raf-1, suatu protein yang sangat penting dalam transduksi sinyal pada jalur ini.^{7,9}

Alpha-tokoferol, salah satu vitamin E yang dikenal sebagai antioksidan, terbukti dapat menurunkan laju proliferasi sel otot polos vaskular melalui mekanisme non-antioksidatif.¹⁰⁻¹² Secara tidak langsung, alpha-tokoferol menghambat aktivitas enzim PKC dan selanjutnya enzim ini mampu menurunkan laju proliferasi sel. Secara molekuler dapat dibuktikan bahwa vitamin E mampu menurunkan laju proliferasi sel turunan kanker prostat,¹³ maupun memacu apoptosis.^{14,15} Di klinik, pemakaian vitamin E dengan dosis yang dianjurkan dapat mencegah timbulnya penyakit kanker prostat,¹⁶ terutama pada perokok.¹⁷

Pengaruh alpha-tokoferol terhadap laju proliferasi sel stroma prostat belum diketahui. Sesuai dengan penelitian tentang manfaat alpha-tokoferol pada sel otot polos vaskular, penelitian ini bertujuan membuktikan pengaruhnya terhadap sel stroma prostat. Diharapkan penurunan laju proliferasi sel stroma prostat dapat menurunkan massa prostat pada BPH, sehingga obat ini pada masa mendatang diharapkan dapat dipakai sebagai salah satu obat untuk mencegah progresifitas BPH.

TUJUAN PENELITIAN

Membuktikan bahwa paparan alpha-tokoferol pada sel stroma prostat dapat menurunkan aktivitas isozim PKC- α dan menurunkan laju proliferasinya

BAHANNAN CARA

Jaringan prostat diperoleh dari pasien BPH bergejala yang menjalani reseksi prostat transuretra (TURP). Dipilih kerokan yang paling besar, dicuci dengan larutan garam fisiologis, dan membuang jaringan yang terbakar karena kerokan listrik. *Chips* prostat dimasukkan ke dalam medium RPMI 1640 (mengandung 200 U/mL penisillin, 0,2 μ g/mL streptomisin, dan 1 μ g/mL fungizone).

Chips dicuci kembali dengan RPMI 1640 yang mengandung *Gentamycin* 50 mg, diulang 3 – 4 kali, kemudian dicacah hingga ukuran $\pm$ 1 mm lalu

dimasukkan ke dalam media RPMI yang mengandung *collagenase* tipe I 0,5 mg/ml yang sudah disaring dengan saringan 0,2 μ (seluruh jaringan terendam media). Diinkubasi dalam inkubator CO₂ bersuhu 37°C selama 18 jam. Setelah itu dipindahkan dalam *tube* 15 ml, disentrifuge 1000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan PBS yang mengandung gentamicin, diulang sebanyak 3 kali. Endapan ditanam pada media kultur RPMI + FBS 10% dalam *plate* selama 14 hari. Obyek diperlakukan dengan memaparkan alpha-tokoferol dari berbagai dosis, untuk menilai aktivitas isozim PKC- α dan menilai proliferasi sel. Kultur yang diperlakukan sebagai kontrol, setelah 6-7 hari hanya dilakukan penggantian medium tumbuh RPMI 1640 yang mengandung 2 mM IL-glutamin (MP Biomedicals) dan 10% FBS (Gibco). Kultur yang mendapatkan perlakuan, selain dilakukan penggantian medium tumbuh juga ditambahkan alpha-tokoferol, mulai dosis 20, 30, 40, 50, sampai 60 μ M yang kemudian diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator 5% CO₂. Setelah itu sebagian kultur dilakukan (1) pengecatan imunositokimia, (2) isolasi enzim, dan (3) penghitungan proliferasi sel dengan metode spektrometri.

Sel yang telah konfluen diletakkan pada obyek gelas. Kemudian dilakukan fiksasi dengan metanol absolut selama 5 menit, dicuci dengan PBS pada pH 7,4 selama 5 menit 3 kali, dan direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam *distilled water*) selama 5 – 10 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 5 menit 3 kali. direndam pada 1% *bovine serum albumin* (BSA)/NGS dalam PBS selama 10 – 30 menit pada suhu ruang, dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Ditambahkan antibodi primer selama satu jam pada suhu ruang, yakni *rabbit anti human* PKC- α , kemudian dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Kemudian antibodi sekunder *anti rabbit* IgG selama satu jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit. Ditambahkan SA-HRP (*Strept Avidin-Horseradish Peroxidase*) selama 30 – 60 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 kali 5 menit, ditambahkan kromogen DAB (3,3-*diaminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 10 – 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam *DI water* selama 3 kali 5 menit. Dilakukan *counterstain* dengan Meyer hematoxilen eosin (HE) selama 20 menit pada suhu ruang. Dicuci dengan air kran selama 3 kali 5 menit, kemudian dipakai aquades selama 3 kali 5 menit. Dikeringkan dan dilakukan *mounting*. Pengamatan dengan mikroskop cahaya pada

perbesaran 400x dan dihitung jumlah sel per 100 sel dengan dilakukan perulangan sebanyak 3 kali. Kultur sel dari keenam sumur tersebut setelah diwarnai, dan diperhatikan ekspresi isozim berupa warna coklat pada sel, yang mungkin banyak terdapat di membran sel atau sitoplasma.

Untuk mengetahui kemungkinan adanya sel yang mengalami apoptosis, bagian kultur yang mendapat perlakuan di atas dilakukan pewarnaan imunositokimia seperti pada prosedur di atas tetapi dengan memakai antibodi primer *rabbit polyclonal anti caspase-3*.

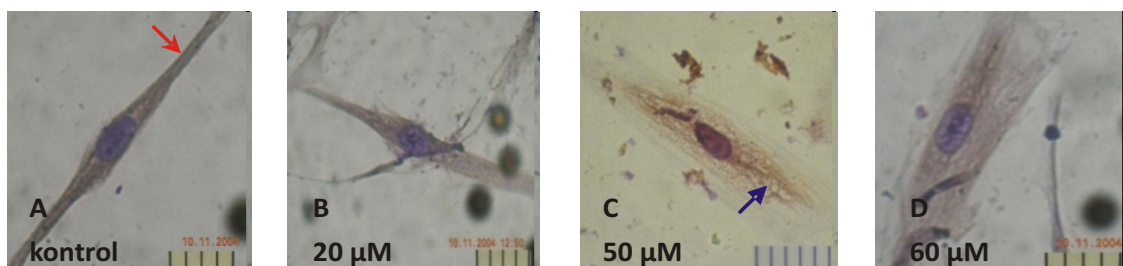
Hasil kultur sel dari berbagai pengamatan ditambah dengan *buffer* ekstrak pH 7,4 yang mengandung sukrosa 0,25 M dan imidazol 3 mM sebanyak 10x volumenya. Selanjutnya dihomogenkan dengan alat vortex, disonikasi selama 15 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm, temperatur 4°C selama 1 jam. Supernatan yang diperoleh, ditentukan aktivitasnya dengan metode spektrofotometri seperti metode dari Dewi (2000).¹⁸ Enzim yang telah diisolasi ditentukan aktivitasnya dengan cara sebagai berikut, dipipet 1 mL enzim PKC-alpha, ditambah dengan 1 mL larutan ATP 125 ppm dan 1 mL larutan histon 74 ppm kemudian diinkubasi pada temperatur 35°C selama 1 jam. Selanjutnya ditambah 1 mL trikloroasetat (TCA) 8%, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dan endapan

yang diperoleh dipisahkan. Supernatan yang mengandung larutan ATP sisa, diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimumnya.

Proliferasi kultur sel stroma prostat diukur secara kuantitatif memakai metode kolorimetri, berdasarkan atas proses reduksi metabolik zat warna kuning terazolium atau 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) menjadi formazan ungu yang tidak larut setelah bereaksi dengan enzim suksinil dehidrogenase mitokondria sel stroma. Pemeriksaan ini secara empiris membedakan antara sel mati dengan sel yang masih hidup. Sel yang telah dipapar dengan alpha-tokoferol dari berbagai konsentrasi dan diinkubasikan selama 48 jam, dicuci dua kali dengan medium RPMI 1640. Kemudian ditambahkan 1 mL RPMI 1640, 100 µL MTT. Diinkubasikan selama 4 jam dalam inkubator CO₂, kemudian ditambahkan isopropanol HCL 1cc. Kemudian absorbansi larutan dibaca pada spektrometri dengan panjang gelombang 540 nm, seperti pada metode Guh et al (1998).¹⁹

HASIL PENELITIAN

Hasil imunositokimia yang menilai pengaruh berbagai dosis alpha-tokoferol pada sel stroma prostat disajikan pada Gambar 1. Penilaian perubahan aktivitas isozim PKC-alpha secara kuantitatif, melalui metode spektrometri, disajikan pada tabel 1, kolom 1.



Gambar 1: Pewarnaan imunositokimia yang menunjukkan pengaruh paparan alpha-tokoferol terhadap aktivitas isozim PKC-alpha. Sel stroma diwarnai dengan antibodi primer *rabbit anti human* PKC-alpha, kemudian diberi pewarnaan DAB sehingga berwarna coklat, dilakukan *counterstain* dengan Meyer hematoxilen eosin. A: Sel yang tidak dipapar dengan alpha-tokoferol (kontrol) menunjukkan isozim PKC-alpha dalam keadaan aktif, yakni tampak warna coklat pada sel membran, B. Sel yang telah dipapar dengan alpha-tokoferol 20 µM ekspresi warna coklat pada sel membran mulai menipis dan tampak warna coklat banyak berada di sitoplasma, C. Paparan 50 dan D. 60 µM, menunjukkan aktivitas enzim semakin berkurang dengan ditandai ekspresi warna coklat banyak terdapat di sitoplasma, dan hampir tidak dijumpai di sel membran. Panah biru → menunjukkan ekspresi isozim PKC-alpha dan panah merah → menunjukkan sel membran. 1 bar = 0,01 mm.

Tabel 1. Pengaruh alpha-tokoferol terhadap perubahan aktivitas isozim PKC-alpha dan laju proliferasi sel.

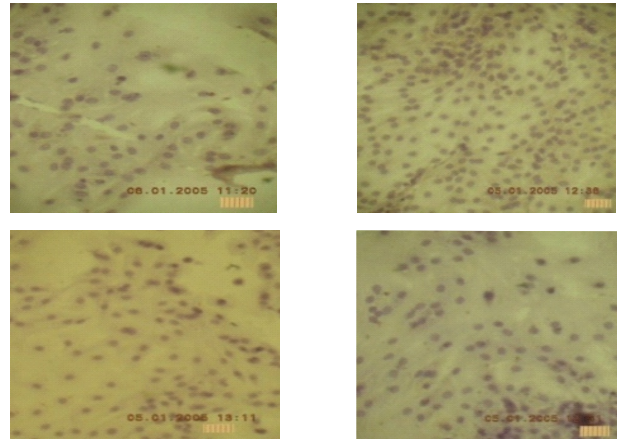
Dosis alpha tokoferol	Rerata ($\bar{x} \pm SD$)	
	Aktivitas isozim PKC -Alpha	Laju proliferasi
0 (Kontrol)	$1,127 \pm 0,047^e$	$0,103 \pm 0,0008^e$
20 μ M	$0,917 \pm 0,031^d$	$0,098 \pm 0,0021^d$
30 μ M	$0,790 \pm 0,036^c$	$0,089 \pm 0,0017^c$
40 μ M	$0,670 \pm 0,039^b$	$0,084 \pm 0,0014^b$
50 μ M	$0,560 \pm 0,041^a$	$0,078 \pm 0,0005^a$
60 μ M	$0,530 \pm 0,077^a$	$0,077 \pm 0,0008^a$

Keterangan: Sel stroma yang telah konfluen direstimulasi dengan FBS 10% tanpa (kontrol) atau dipapar alpha-tokoferol dari berbagai dosis selama 48 jam. Terlihat semakin tinggi paparan tokoferol, semakin rendah rerata aktivitas isozim PKC-alpha (kolom 2). Demikian pula rerata laju proliferasi sel (absorbansi MTT) menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis alpha-tokoferol semakin rendah absorbansinya (kolom 3). Uji analisis Tukey menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada rerata aktivitas PKC dan laju proliferasi sel pada berbagai paparan, kecuali pada paparan 50 dan 60 μ M. Notasi yang berbeda pada *superscript* menunjukkan beda yang nyata ($\alpha < 0,05$).

Untuk menilai hubungan antara dosis alpha-tokoferol yang dipaparkan dengan aktivitas isozim PKC-alpha, dilakukan analisis Pearson dan dilanjutkan dengan analisis regresi. Terdapat korelasi negatif yang antara paparan dosis alpha-tokoferol dengan aktivitas isozim PKC-alpha ($r = -0,973$, $p = 0,000$).

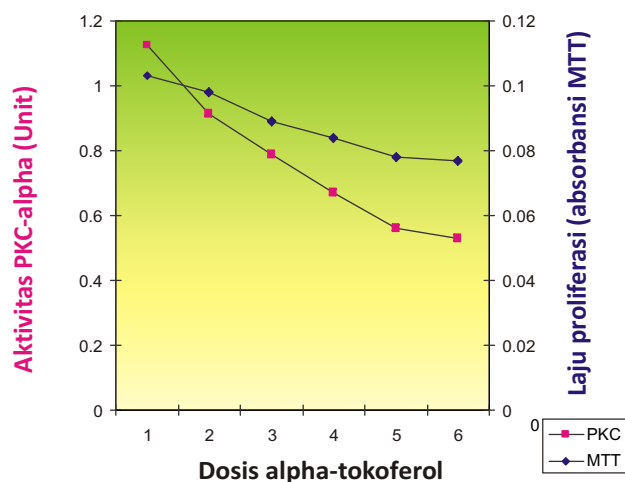
Jumlah sel stroma di dalam suatu lapangan pandang setelah terpapar alpha-tokoferol disajikan pada pewarnaan imunositokimia pada gambar 2. Pada gambar ini dapat diketahui, bahwa tidak didapatkan sel yang mengalami apoptosis pada semua perlakuan. Secara tidak langsung, laju proliferasi ditentukan dengan menghitung absorbansi MTT pada panjang gelombang 540 nm, seperti terlihat pada tabel 1, kolom 3.

Untuk menilai hubungan antara dosis alpha-tokoferol yang dipaparkan dengan laju proliferasi (absorbansi MTT), dilakukan analisis Pearson. Didapatkan korelasi negatif yang kuat antara paparan dosis alpha-tokoferol dengan absorbansi MTT ($r = -0,975$, $p = 0,000$).



Gambar 2: Efek paparan alpha-tokoferol pada apoptosis sel stroma prostat. Sel stroma prostat (A) yang dihasilkan dari kultur sebelum diperlakukan. Selanjutnya sel restimulasi dengan FBS 10%, dan kemudian diwarnai dengan imunositokimia dengan antibodi primer anti kaspase-3. Pengamatan dengan mikroskop cahaya menunjukkan bahwa pada berbagai sediaan yang tidak dipapar sebagai kontrol (B) maupun yang dipapar alpha-tokoferol dosis 30 μ M (C), dan 50 μ M menunjukkan tidak tampak ekspresi kaspase berupa warna coklat hitam di dalam sel. 1 bar = 0,01 mm.

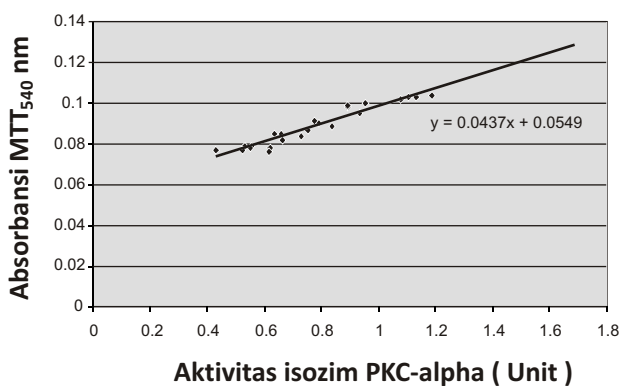
Hubungan antara Aktivitas Isozim PKC-alpha dengan Proliferasi Sel



Gambar 3: Pengaruh paparan alpha-tokoferol terhadap aktivitas isozim PKC-alpha dan laju proliferasi (absorbansi MTT) sel stroma prostat. Absis menunjukkan dosis tokoferol mulai dari kontrol (1), dosis 20 μ M (2), 30 μ M (3), 40 μ M (4), 50 μ M (5), dan 60 μ M (6). Ordinat sebelah kiri menunjukkan aktivitas PKC dalam unit (grafik warna merah muda), sedangkan ordinat kanan menunjukkan absorbansi MTT (grafik warna biru).

Penurunan aktivitas enzim PKC diikuti dengan penurunan laju proliferasi sel stroma. Semakin tinggi dosis alpha-tokoferol, aktivitas PKC maupun laju proliferasi sel semakin menurun (absorbansi MTT).

Pada analisis Pearson, didapatkan korelasi positif yang kuat dan bermakna ($r=0,963$, $p=0,000$) antara aktivitas PKC-alpha dengan laju proliferasi sel stroma setelah terpapar alpha-tokoferol (Gambar 4). Analisis regresi didapatkan hubungan antara laju proliferasi (absorbansi MTT) dengan aktivitas isozim PKC-alpha, adalah Absorbansi MTT = $(0,0437 \text{ aktivitas PKC}) + 0,0549$



Gambar 4: Korelasi antara aktivitas isozim PKC-alpha dengan laju proliferasi sel stroma prostat. Absis menunjukkan aktivitas isozim PKC-alpha dan ordinat menunjukkan laju proliferasi (absorbansi MTT).

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dibuktikan bahwa aktivitas isozim PKC-alpha menurun setelah dipapar alpha-tokoferol. Melalui pewarnaan imunositokimia, tampak bahwa lokasi ekspresi warna coklat (yang menandakan isozim PKC-alpha) berbeda pada saat sebelum dan sesudah dipapar alpha-tokoferol (Gambar 1). Seperti yang ditulis oleh Boscoboinik et al (1991) bahwa pemberian PMA 300 nM (suatu aktivator PKC) pada sel otot polos vaskular A7r5 menyebabkan translokasi enzim PKC dari sitosol ke membran sel, sedangkan pemberian alpha-tokoferol 100 μ M menyebabkan rasio ekspresi PKC di dalam sitosol/sel membran meningkat dari 1,8 (kontrol) menjadi 8,6.¹⁰ Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi enzim PKC lebih banyak di dalam sitosol, atau sebagian besar enzim dalam keadaan inaktif.

Secara kuantitatif aktivitas isozim PKC-alpha dapat dihitung secara *in vitro* dengan ataupun tanpa melibatkan zat radioaktif, yakni dengan menghitung

jumlah ATP yang dipindahkan ke dalam substrat. Pada penelitian ini dapat dibuktikan bahwa aktivitas isozim setelah terpapar oleh alpha-tokoferol berbanding terbalik dengan dosis yang diberikan, yakni semakin tinggi dosis, ternyata semakin rendah aktivitasnya.

Alpha-tokoferol adalah suatu antioksidan yang saat ini telah diyakini dapat mencegah timbulnya risiko penyakit jantung koroner maupun penyakit keganasan. Di samping efeknya sebagai antioksidan, secara *in vitro* alpha-tokoferol terbukti dapat menurunkan aktivitas isozim PKC-alpha pada berbagai sel.^{9,10,20} Kemampuannya dalam menurunkan laju proliferasi sel otot polos vaskular dapat dipakai untuk mencegah terjadinya penyakit atherosklerosis dan hipertensi.^{10,11} Mekanisme alpha-tokoferol dalam mempengaruhi aktivitas isozim PKC-alpha terjadi secara tidak langsung, yakni dengan (1) mengaktifkan enzim protein fosfatase 2 A (PP₂A),^{1,10,12} (2) menghambat ekspresi DAG yang ada di permukaan membran,^{21,22} atau (3) mengaktifkan molekul NO.²³

Diasilgliserol bersama-sama dengan ion kalsium berfungsi dalam mengaktifkan isoform enzim cPKC di permukaan sel, sehingga penurunan ekspresi DAG menyebabkan penurunan aktivitas enzim itu. Hal ini diketahui dari berkurangnya enzim yang bertranslokasi dari sitoplasma ke dalam permukaan membran sel. Kemungkinan lain dari penurunan aktivitas enzim PKC akibat paparan tokoferol adalah terjadinya peningkatan aktivitas enzim PP₂A. Enzim PP₂A ini menyebabkan defosforilasi enzim PKC sehingga menyebabkan aktivitasnya berkurang.^{11,12,24} Penelitian *in vitro* yang dilakukan oleh Ricciarelli et al (2001) pada sel stroma vaskular yang dipapar alpha-tokoferol 50 μ M menunjukkan adanya peningkatan aktivitas enzim PP₂A, sedangkan pemberian beta-tokoferol tidak menyebabkan peningkatan aktivitas enzim tersebut.¹² Semakin tinggi dosis alpha-tokoferol yang dipaparkan, semakin tinggi aktivitas enzim PP₂A. Kemungkinan kedua ini tampaknya paling banyak dibuktikan oleh berbagai penulis, oleh karena itu jalur ini paling mungkin untuk menerangkan mekanisme hambatan alpha-tokoferol terhadap aktivitas isozim PKC-alpha pada stroma prostat.

Pemberian SNP (sodium-nitroprusid), suatu donor NO pada sel stroma prostat dibuktikan dapat meningkatkan kadar cGMP (siklik Guanosin Mono Fosfat).¹⁹ Keadaan ini dapat dimengerti karena NO mempengaruhi enzim guanilil siklase yang ada di dalam sel untuk merubah GTP menjadi cGMP.²⁵

Demikian pula pemberian SNP dapat menurunkan aktivitas enzim PKC.¹⁹ Uraian penelitian yang dikemukakan oleh Ganz & Seftel (2000),²³ Guh et al (1998),¹⁹ dan Lue (2002),²⁵ dapat menerangkan kemungkinan pengaruh alpha-tokoferol terhadap aktivitas enzim PKC melalui mekanisme ketiga, yakni alpha-tokoferol meningkatkan ekspresi NO,²³ selanjutnya NO menurunkan aktivitas enzim PKC,^{19,23} dengan cara meningkatkan ekspresi cGMP,¹⁹ yang kemudian cGMP mempengaruhi protein kinase spesifik untuk memicu penyimpanan ion kalsium intrasel ke dalam retikulum endoplasma.²⁵ Berkurangnya kadar ion kalsium intraseluler menyebabkan berkurangnya aktivitas enzim PKC.

Secara kualitatif dapat dibuktikan kemampuan alpha-tokoferol dalam menghambat laju proliferasi sel stroma prostat yang distimulasi oleh FBS 10% (Gambar 3). Hambatan tersebut tergantung pada besarnya dosis yang diberikan (*dose dependent*).

Pada tabel 1 terlihat bahwa bertambahnya dosis yang diberikan, menyebabkan berkurangnya laju proliferasi sel, yang secara tidak langsung dapat diamati dengan menghitung jumlah sel yang hidup melalui uji MTT. Metode MTT dalam mengukur perubahan populasi sel sudah dikembangkan oleh berbagai peneliti, di antaranya untuk mengukur laju proliferasi sel otot polos prostat.^{19,26}

Proliferasi sel dapat dibangkitkan oleh suatu stimulus atau ligan. Ligan berikatan dengan reseptor pada membran sel, kemudian mengaktifkan beberapa protein di dalam sel melalui fosforilasi. Transduksi sinyal tersebut diteruskan ke dalam inti sel untuk mengaktifkan faktor transkripsi yang selanjutnya mengaktifkan siklus sel.^{7,27,28} Di dalam eksperimen *in vitro*, stimulus yang sering dipergunakan dalam penelitian adalah serum forbol ester,^{13,19,29} 12-O-tetradekanoil forbol-13-asetat (TPA),³⁰ atau forbol mirislate asetat (PMA), ketiganya adalah aktivator PKC, bombesin, asam lisofosfatidat, *growth factors*, dan endotelin.¹⁰ Mitogen tersebut memberikan kuantitas efek yang berbeda dalam meningkatkan proliferasi sel. Kemampuan suatu obat dalam menghambat laju proliferasi sel, selain ditentukan oleh jenis obat yang dipaparkan, juga ditentukan oleh jenis mitogen yang dipakai. Hasil penelitian yang disajikan oleh Boscoboinik (1991) et al,¹⁰ menunjukkan bahwa jika memakai serum atau FCS 10% sebagai stimulator pertumbuhan sel, alpha-tokoferol 50 µM hanya mampu menghambat laju proliferasi sel

stroma vaskular tidak lebih dari 75%. Akan tetapi jika dipakai endothelin, alpha-tokoferol mampu menekan laju proliferasi sel hingga kurang dari 50%, apalagi jika dipakai *growth factors*, di antaranya PDGF, mungkin dapat menghambat proliferasi hingga kurang 25%.

Selain mempunyai kemampuan sebagai anti-oksidan,³¹⁻³³ Vitamin E terbukti dapat menghambat pertumbuhan suatu jaringan melalui mekanisme non-antioksidasi.^{10-12,34-36} Mekanisme vitamin E dalam menghambat pertumbuhan jaringan adalah dengan cara menghambat laju proliferasi sel,¹⁰⁻¹³ atau memacu timbulnya apoptosis, seperti yang ditunjukkan oleh alpha tokoferil suksinat.³⁵⁻³⁷ Untuk itu pada penelitian ini telah dibuktikan, bahwa alpha-tokoferol tidak meningkatkan laju apoptosis (Gambar 2).

Penelitian ini mengaitkan hubungan antara aktivitas isozim PKC-alpha dengan laju proliferasi sel stroma setelah terpapar oleh alpha-tokoferol dari berbagai dosis. Pada tabel 3 dan gambar 5, terlihat bahwa setelah terpapar oleh alpha-tokoferol, aktivitas isozim PKC-alpha menurun, dan diikuti pula dengan laju proliferasi yang juga menurun. Data tersebut lebih meyakinkan bahwa hambatan laju proliferasi dimediasi oleh enzim PKC. Terlihat hubungan yang erat antara aktivitas isozim PKC-alpha yang dipapar alpha-tokoferol dengan laju proliferasi sel. Dari rumus tersebut dapat dihitung laju proliferasi sel = $(0,0437 \times \text{aktivitas isozim PKC-alpha}) + 0,0549$.

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa transduksi sinyal intraseluler pada proliferasi sel stroma prostat melalui kaskade MAPK (yang meliputi: raf-1 → MEK → ERK.^{26,38,39} Keterlibatan enzim PKC dalam kaskade MAPK ini terlihat pada penelitian *in vitro* pada kultur sel rhabdomyosarkoma yang diberi TPA, suatu aktivator PKC.³⁰ Pemberian TPA menyebabkan peningkatan ekspresi isozim PKC-alpha dua kali lipat, peningkatan fosforilasi ERK dan JNK, yang selanjutnya diikuti dengan peningkatan laju proliferasi sel. Demikian pula sebaliknya pemberian inhibitor PKC mampu menurunkan laju proliferasi sel yang ditimbulkan oleh TPA.

Efek penurunan aktivitas enzim PKC terhadap penurunan laju proliferasi dapat pula diamati pada sel otot prostat yang dipapar oleh sodium nitroprusid (SNP), suatu donor nitrik oksid (NO). Guh et al (1998) mendapatkan bahwa paparan SNP menyebabkan

penurunan aktivitas enzim PKC, yang selanjutnya menyebabkan penurunan laju proliferasi sel.¹⁹ Penurunan laju proliferasi sel yang diakibatkan oleh penurunan aktivitas isozim PKC terjadi pada saat siklus sel fase G₁.^{11,19} Fase G₁/S terjadi pada 6 jam pertama setelah dimulainya fase G₁. Efek alpha-tokoferol terhadap penurunan laju proliferasi sel otot polos vaskular hanya dapat diamati pada 6 – 9 jam setelah sel yang telah dibiarkan *quiescent* dirangsang dengan serum, namun jika alpha-tokoferol diberikan setelah itu, tidak nampak lagi hambatan terhadap laju proliferasi sel.¹¹ Demikian pula halnya yang didapatkan oleh Guh et al (1998), bahwa penurunan laju proliferasi sel hanya dapat disaksikan pada 6 jam pertama setelah sel yang dibuat *quiescent* dirangsang oleh FCS 10%.¹⁹

Rerata persentase penurunan laju proliferasi sel stroma prostat oleh alpha-tokoferol pada penelitian ini jika diberikan dosis maksimum 60 µM adalah $74,7 \pm 1,181\%$, sedangkan rerata penurunan aktivitas isozim PKC-alpha adalah $46,9 \pm 5,04\%$ (Tabel 1). Penemuan ini hampir mirip dengan sel otot polos prostat yang dipapar oleh SNP,¹⁹ maupun sel otot polos vaskular yang dipapar oleh alpha-tokoferol.¹⁰

SIMPULAN

Paparan alpha-tokoferol dari berbagai dosis mampu menghambat laju proliferasi sel stroma prostat, yang dimediasi oleh isozim PKC-alpha. Hambatan tersebut bersifat *dose dependent*, yakni semakin besar dosis yang dipaparkan, aktivitas enzim maupun laju proliferasi semakin menurun.

DAFTAR PUSTAKA

- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. J Urol 1984; 132: 474-9.
- Deering RE, Bigler SA, King J, Choongkit taworn M, Aramburu E, Brawer MK. Morpho-metric quantitation of stroma in human benign prostatic hyperplasia. Urology 1994; 44: 64-70.
- Claus S, Berges R, Senge T, Schulze H. Cell kinetic in epithelium and stroma of benign prostatic hyperplasia. J Urol 1997; 158: 217-21.
- Newton AC. Protein kinase C: Structure, function, and regulation. J Biol Chem 1995; 270: 28495-8.
- Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions. Discovery and Prospect of Protein Kinase C Research: Epilogue. J. Biochem 2003; 133: 155-8.
- Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 279: L429-L438.
- Kazanietz MG, Blumberg PM. Protein kinase C and signal transduction in normal and neoplastic cells. In Sirica (ed) Cellular and molecular pathogenesis. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p.389-402.
- Ron D, Kazanietz MG. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. FASEB J 1999; 13: 1658-76.
- Egger T, Schuligoi R, Wintersperger A, Amann R, Malle E, Sattler W. Vitamin E (α-tocopherol) attenuates cyclo-oxygenase 2 transcription and synthesis in immortalized murine BV-2 microglia. Biochem J 2003; 370: 459-67.
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. J Biol. Chem. 1991; 266: 6188-94.
- Tasinato A, Boscoboinik D, Bartoli GM, Maroni P, Azzi A. d-α-Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentration, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. USA: Proc. Nas. Acad. Sci. 1995; 92: 12190-4.
- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E: protective role of a Janus molecule. FASEB J. 2001; 15: 2314-25.
- Venkateswaran V, Fleshner NE, Klotz LH. Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. J Urol 2002; 169: 1578-82.
- Zhang Y, Ni J, Messing EM, Chang E, Yang CR, Yeh S. Vitamin E succinate inhibits the function of androgen receptor and the expression of prostate-specific antigen in prostate cancer cells. PNAS 2002; 99: 7408-13.
- Jiang Q, Wong J, Fyrst H, Saba JD, Ames BN. γ-Tocopherol or combination of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. PNAS 2004; 101: 17825-30.
- Helzlsouer KJ, Huang H-Y, Alberg AJ, Hoffman S, Burke A, Norkus EP, et al. Association Between α-Tocopherol, γ-Tocopherol, Selenium, and Subsequent Prostate Cancer. J Natl Cancer Inst 2000; 92: 2018-23.

17. Chan JM, Stampfer MJ, Jing Ma, Rimm EB, Willett WC, Giovannucci EL. Supplemental vitamin E intake and prostate cancer risk in a large cohort of men in the United States. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999; 8: 893–9.
18. Dewi N. Karakterisasi ekstrak kasar enzim protein kinase C- α hasil isolasi dari serum darah penderita pre-ekalmsia. Skripsi, Unibraw; 2000.
19. Guh JH, Hwang TL, Ko FN, Chueh SC, Lai MK, Teng CM. Antiproliferative effect in human prostatic smooth muscle cells by nitric oxide donor. *Mol Pharm* 1998; 53:467-74.
20. Keaney JF, Guo Y, Cunningham D, Shwaery GT, Xu A, Vita JA. Vascular incorporation of α -tocopherol prevents endothelial dysfunction due to oxidized LDL by inhibiting protein kinase C stimulation. *J. Clin. Invest.* 1996; 98: 386–94.
21. Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes* 1994; 43:1372-7.
22. Kunisaki M, Bursell SE, Clermont AC, Ishii H, Ballas LM, Jirousek MR, et al. Vitamin E prevents diabetes-induced abnormal retinal blood flow via the diacylglycerol-protein kinase C pathway. *Am J Physiol* 1995; 269: E239-46.
23. Ganz MB, Seftel A. Glucose-induced changes in protein kinase C and nitric oxide are prevented by vitamin E. *Endocrinol. Metab. Am J Physiol* 2000; 278: E 146- E 152.
24. Boudreau RTM, Garduno R, Lin T-J. Protein phosphatase 2A and protein kinase C α are physically associated and are involved in *Pseudomonas aeruginosa*-induced interleukin 6 production by mast cells. *J. Biol. Chem* 2002; 227: 5322-9.
25. Lue TF. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction and priapism. In: *Campbell's Urology*, edisi ke 7. editor: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, dan Wein AJ. Philadelphia: WB Saunders Co. 2002; 1591-618.
26. Chueh S-C, Guh J-H, Chen J, Lai M-K, Teng C-M. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. *J Urol* 2001; 166: 347-53.
27. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cell communication. Dalam *Molecular biology of the cell*, edisi ke-4. New York: Garland Publishing, Inc; 2002. p.831-906.
28. DeWolf WC, Gaston SM. The cell cycle and its relevance to the urologist. *J Urol* 2004; 171: 1674-81.
29. Braz TC, Bueno OF, DEWindt LJ, Molkentin JD. PKC α regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2). *J. Cell Biol* 2002; 5: 905-19.
30. Mauro A, Ciccarelli C, Cesaris PD, Scoglio A, Bouche M, Molinaro M et al. PKC α -mediated ERK, JNK, and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *Jour Cell Science* 2002; 115: 3587-99.
31. Marcus R, Coulston AM. Fat soluble vitamins. Vitamin A, D, and E. In: Hardman JG, Limbird LE, and Gilman AG (editor). *Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics* 10th ed; 2001. p.1733-91.
32. Ricciarelli R, Maroni P, Ozer N, Zingg J M, Azzi A. Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic. Biol. Med.* 1999; 27: 729–37.
33. Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J.* 1999; 13: 1145–55.
34. Aratri E, Spycher S E, Breyer I, Azzi A. Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1999; 447: 91–4.
35. McIntyre BS, Briski KP, Gapor A, Sylvester PW. Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells (44544). *P.S.E.B.M* 2000; 224: 292-301
36. Neuzil J, Weber T, Schroder A, Lu M, Ostermann G, Gellert N, et al. Induction of cancer cell apoptosis by α -tocopheryl succinate: molecular pathways and structural. *FASEB J.* 2001; 15: 403–15
37. Neuzil J, Zhao M, Ostermann G, Sticha M, Gellert N, Weber C, et al. α -Tocopheryl succinate, an agent with in vivo anti-tumour activity, induces apoptosis by causing lysosomal instability. *Biochem J* 2002; 362: 709-15
38. Maroni PD, Koul S, Meacham RB, Koul HK. Mitogen Activated Protein kinase signal transduction pathways in the prostate. *Cell Communication and Signaling* 2004, diakses dari: <http://www.biosignaling.com/content/2/1/5>
39. Price DT, Della Roca G, Guo C, Ballo MS, Schwinn DA, Luttrell LM. Activation of extracellular signal-regulated kinase in human prostate cancer. *J Urol* 1999; 162: 1537-42.