

Profil Protein Sekretom Sel Stem Pulpa Gigi Manusia semasa Aruhan Asid Askorbik (Secretome Protein Profile of Human Dental Pulp Stem Cells during Ascorbic Acid Induction)

SHAHARUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN^{1*}, THANALETCHUMI MANOGARAN¹, ROHAYA MEGAT ABDUL WAHAB², SAIFUL ANUAR KARSANI³, INTAN ZARINA ZAINOL ABIDIN⁴, FARINAWATI YAZID², MUHAMMAD DAIN YAZID⁵ & ZAIDAH ZAINAL ARIFFIN⁶

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

²Centre of Family Dental Health, Faculty of Dentistry, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Raja Muda Abdul Aziz 50300 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan, Malaysia

³Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603 Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan, Malaysia

⁴Centre for Research and Graduate Studies, University of Cyberjaya, 63000 Cyberjaya, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

⁵Tissue Engineering Centre, Universiti Kebangsaan Malaysia Medical Centre, Jalan Yaacob Latif, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Wilayah Persekutuan, Malaysia

⁶School of Biology, Faculty of Applied Sciences, Universiti Teknologi MARA, 40450 Shah Alam, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

Diserahkan: 10 Jun 2021/Diterima: 4 Januari 2022

ABSTRAK

Pembezaan sel stem secara *in vitro* kepada osteoblas secara umumnya melibatkan gabungan aruhan asid askorbik dan β -gliserofosfat. Namun, β -gliserofosfat didapati menyebabkan penurunan keviabelan sel. Maka, kajian ini adalah untuk menentukan potensi asid askorbik tanpa kehadiran β -gliserofosfat dalam mengaruh pembezaan osteoblas serta mengenal pasti perubahan keamatan pengekspresan sekretom bagi protein osteoblas. Sel stem pulpa gigi kekal (DPSC) yang dipencilkan; diaruh dengan 10 μ g/mL asid askorbik selama 21 hari. Pengekspresan gen osteoblas pada hari ke-7 dan 21 ditentukan melalui transkripsi berbalik-tindak balas rantaian polimerase (RT-PCR). Selepas 21 hari aruhan, sel diaram dengan medium basal tanpa serum selama 12 jam dan dianalisis melalui pendekatan kromatografi cecair-spektrometri jisim/spektrometri jisim (LC-MS/MS). Kehadiran protein sekretom pada kedua-dua aruhan asid askorbik dan kawalan positif (gabungan asid askorbik + β -gliserofosfat) digunakan untuk menentukan proses biologi yang terlibat. Seterusnya, protein yang terlibat dalam pembezaan osteoblas serta mengalami perubahan terhadap keamatan pengekspresannya ditentukan melalui analisis *UniProt* dan *PANTHER*. Hubungan kait antara protein sekretom ini ditentukan menggunakan *STRING* bagi penentuan tapak jalan pembezaan DPSC kepada osteoblas. Hasilnya, gen BSP didapati diekspreskan semasa perlakuan asid askorbik serta sebanyak 57 protein sekretom dikenal pasti terlibat semasa aruhan asid askorbik dan kawalan, dengan hanya tiga protein didapati berkaitan dengan pembezaan osteoblas serta mengalami perubahan keamatan pengekspresan melalui penggunaan *UniProt* dan *PANTHER*. Seterusnya, analisis menggunakan *STRING* mendapati hanya dua sekretom bagi DPSC dikenal pasti melibatkan tiga tapak jalan. Kesimpulannya, asid askorbik sahaja walaupun tanpa β -gliserofosfat berupaya mengaruh pengekspresan protein sekretom yang berkaitan dengan osteoblas. Inhibin beta rantai A dan fibrilin-2 dicadangkan sebagai penanda sekretom semasa pembezaan DPSC kepada osteoblas.

Kata kunci: Asid askorbik; pembezaan osteoblas; penanda sekretom; sel stem pulpa gigi kekal (DPSC)

ABSTRACT

In vitro stem cell differentiation into osteoblast involved a combination of ascorbic acid and β -glycerophosphate. However, β -glycerophosphate reduced cell viability in the culture. Therefore, this study was conducted to determine the potential of ascorbic acid to induce osteoblast differentiation by identifying differentially expressed osteoblast-related secretome. Stem cells isolated from permanent (DPSC) tooth pulp was induced with 10 μ g/mL ascorbic acid for 21 days, and

osteoblast gene expression was determined via reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). After 21 days of induction, cells were incubated in a serum-free basal medium for 12 h and analyzed via liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) approach. The biological processes and differentially expressed osteoblast-related secretome were determined using UniProt and PANTHER based on similar proteins expressed in ascorbic acid induction and positive control. Interaction between secretome was determined using STRING for DPSC differentiation pathways determination. As a result, the BSP gene was expressed in ascorbic acid induction. A total of 57 secretome proteins were identified in ascorbic acid induction and control, where three differentially expressed osteoblast-related secretome were determined in DPSC. For secretome interaction, only two secretomes were involved in three pathways of DPSC after STRING analysis. In conclusion, ascorbic acid alone without β -glycerophosphate successfully induced osteoblast-related secretome. Inhibin beta A chain and fibrillin-2 were suggested as secretome markers for DPSC during osteoblast differentiation.

Keywords: Ascorbic acid; osteoblast differentiation; secretome; stem cells from human permanent tooth pulp (DPSC)

PENDAHULUAN

Sel stem adalah sel primitif yang berkebolehan untuk memperbaharui diri sendiri dan membeza kepada sel matang seperti osteoblas, kondrosit dan adiposit (Intan Zarina et al. 2008; Megat Abdul Wahab et al. 2017). Pada masa kini, terdapat pelbagai sumber sel stem yang telah dikenal pasti dan dikulturkan secara *in vitro* (Busra et al. 2017; Hasmad et al. 2018; Lim et al. 2021; Shamsul et al. 2018; Shanmuganantha et al. 2018; Siow et al. 2021; Zahari et al. 2017). Sel stem pulpa gigi kekal (DPSC) manusia dipilih dalam kajian ini kerana pemencilannya daripada tisu pulpa gigi kekal adalah mudah dan tidak invasif (Yazid et al. 2019). DPSC merupakan sel yang menyerupai sel fibroblas dan dicirikan sebagai sel stem mesenkima (MSC) kerana mengekspreskan penanda MSC (Shahrul Hisham et al. 2019).

Kajian terdahulu melaporkan bahawa DPSC berupaya membeza kepada osteoblas dalam kehadiran gabungan asid askorbik dan β -gliserofosfat (Ariffin et al. 2010; Yazid et al. 2010). Asid askorbik penting dalam pembentukan kolagen tulang dan transkripsi gen osteoblas manakala, β -gliserofosfat pula bertindak sebagai sumber ion fosfat untuk pemineralan tulang (Intan Zarina et al. 2020; Orriss et al. 2010). Walau bagaimanapun, β -gliserofosfat didapati berupaya menurunkan keviabelan sel yang seterusnya menyebabkan penurunan kepada bilangan sel viabel (sel hidup) yang akan membeza kepada osteoblas (Coelho & Fernandes 2000). Bilangan sel viabel yang rendah akan menyebabkan ia tidak boleh digunakan dalam terapi sel yang memerlukan bilangan sel viabel yang tinggi iaitu hampir 10 hingga 400 juta sel viabel (Estrada et al. 2013).

Sekretom adalah kumpulan protein yang dirembeskan oleh sel ke ruang ekstrasel. Protein ini memainkan peranan dalam komunikasi antara sel, proliferasi serta

metabolisma sel (Zhang et al. 2014). Selain itu, rembesan sekretom akan bekerjasama dengan komponen utama tulang yang lain seperti mineral, matriks berkolagen dan osteoblas untuk mewujudkan jaringan mikropersekutaran yang kondusif bagi menghasilkan tulang yang sihat. Sekretom seperti faktor pertumbuhan dan sitokin didapati terlibat dalam proses pemodelan tulang (Han et al. 2018). Selain itu, Katagiri et al. (2017) mendapati sel MSC berupaya untuk membeza kepada osteoblas dengan hanya melalui aruhan rembesan sekretom. Ini menunjukkan bahawa sekretom mempunyai peranan yang penting dalam proses pembentukan tulang. Analisis sekretom secara umumnya berupaya untuk membantu dalam mengenal pasti penanda protein bagi kegunaan diagnostik dan berupaya mengenal pasti tapak jalan terapeutik yang baru (Deracinois et al. 2013).

Secara keseluruhannya, kajian ini bertujuan untuk menentukan aruhan asid askorbik sahaja tanpa kehadiran β -gliserofosfat juga berupaya untuk membezakan sel DPSC kepada osteoblas serta mengenal pasti protein dan tapak jalan yang terlibat semasa proses aruhan pembezaan ini. Ini adalah untuk memastikan bilangan sel viabel yang tinggi dapat dicapai tanpa menjejaskan potensi sel untuk membeza kepada osteoblas bagi kegunaan terapi sel. Pembentukan tulang yang sihat melalui pembezaan DPSC juga boleh dilakukan dengan kehadiran perancah yang sesuai seperti perancah titanium (Rohaya et al. 2020). Untuk mencapai objektif tersebut, analisis molekul melibatkan penanda osteoblas (BSP) dilakukan diikuti dengan analisis sekretom dengan menggunakan teknik kromatografi cecair-spektrometri jisim/spektrometri jisim (LC-MS/MS) ke atas medium basal DPSC di bawah aruhan asid askorbik. Pendekatan analisis LC-MS/MS ini akan menyumbang kepada penentuan calon penanda sekretom bagi DPSC sewaktu aruhan asid askorbik serta

fungsinya dalam mikroperskitaran kultur pembezaan osteoblas. Maklumat ini boleh diaplikasikan dalam kajian regeneratif tulang bagi merawat penyakit tulang seperti osteogenesis imperfekta.

BAHAN DAN KAEDAH

KELULUSAN ETIKA DAN PEMENCILAN DPSC

Sebanyak tiga sampel gigi kekal diperoleh daripada tiga individu sihat yang berbeza ($n=3$) dengan kebenaran bertulis serta mendapat kelulusan etika daripada Jawatankuasa Etika Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM 1.5.3.5/244/FST-2015-009). Gigi kekal diekstrak daripada individu dewasa berumur 18 hingga 25 tahun. Sampel gigi dibersihkan dengan 1% (i/i) larutan penisilin-streptomisin (HiMedia, India) dalam salin berpenimbal fosfat (PBS) (Gibco, USA) dan dipotong pada *cemento-enamel junction* (CEJ) menggunakan *bur* pergigian. Tisu pulpa gigi seterusnya diekstrak, dicincang dan dicernakan di dalam 1 mg/mL kolagenase jenis I (500 CDU) (Sigma Aldrich, USA) selama 30 min pada 37 °C. Kemudian, serum fetus lembu (FBS) (Gibco, USA) yang telah dieram pada 56 °C selama 30 min ditambahkan ke dalam campuran untuk merencatkan tindak balas enzim kolagenase (Berry et al. 1991) sebelum diemparkan pada kelajuan 400 g selama 5 min. Supernatan dibuang manakala pelet diampai dalam medium lengkap yang mengandungi Dulbecco's Minimum Essential Medium-Knockout™ (Gibco, USA), 10% FBS, 1% (i/i) larutan penisilin-streptomisin dan GlutaMAX™ (Gibco, USA). Sel dieramkan pada 37 °C dan 5% karbon dioksida (CO₂) sehingga mencapai 80-90% konfluensi.

PERLAKUAN ASID ASKORBİK TERHADAP DPSC

DPSC pada pasaj 3 digunakan dalam kajian ini. Sebanyak 10⁴ sel/cm² dikulturkan dalam medium lengkap serta dieram selama 24 jam pada suhu 37 °C dan 5% CO₂. Selepas 24 jam pengeraman, medium lengkap dikeluarkan dan digantikan dengan medium lengkap yang mengandungi 10 mg/mL asid askorbik. Kawalan positif pula terdiri daripada sel di dalam medium pembezaan osteoblas yang standard iaitu medium lengkap dengan penambahan gabungan 50 mg/mL asid askorbik dan 10 mM β -gliserofosfat. Selain itu, sel yang dikulturkan di dalam medium lengkap tanpa faktor pembezaan berperanan sebagai kawalan negatif. Medium kultur sel digantikan dengan medium baru setiap tiga hari.

PENGEKSPRESAN GEN OSTEUBLAS

Pengekspresan gen osteoblas ditentukan pada hari ke-7 dan 21 selepas diaruh dengan 10 μ g/mL asid askorbik serta kawalan positif (gabungan 50 mg/mL asid askorbik dan 10 mM β -gliserofosfat). Dalam analisis ini profil pengekspresan gen BSP telah melibatkan sel DPSC Pasaj 3 yang seterusnya dikulturkan pada hari ke-7 dan 21. Transkriptase berbalik-tindak balas rantaian polimerase (RT-PCR) dijalankan dengan RNA jumlah daripada kesemua aruhan diekstrak menggunakan reagen TRIzol® (Invitrogen, USA) mengikut arahan pengilang. Ketulenan RNA ditentukan menggunakan spektrofotometer pada 260 dan 280 nm. Sejumlah 200 ng RNA jumlah digunakan sebagai templat sintesis cDNA menggunakan kit *First Strand cDNA Synthesis* (PCR Biosystems, USA). Seterusnya, PCR dilakukan menggunakan 1 μ L cDNA, 1.25 unit Taq polimerase, 1 \times GoTaq penimbal tindak balas, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM deoksinukleosida trifosfat (dNTPs) dan 1 mM pencetus kehadapan dan berbalik. Amplifikasi PCR dijalankan seperti berikut: penyahaslian pada 95 °C selama 2 min; diikuti dengan 36 kitaran yang melibatkan tiga fasa iaitu fasa penyahaslian pada 95 °C selama seminit, fasa penyepuhan (pada 59.5 °C; *GAPDH* dan 54.3 °C; *BSP*) selama 30 s dan fasa pemanjangan pada 72 °C selama seminit; akhir sekali merupakan pemanjangan pada 72 °C selama lima min. Produk PCR dipisahkan secara elektroforesis menggunakan gel agarosa 1.7% (b/i) dalam penimbal 1 \times TAE dan jalur DNA diwarnakan menggunakan etidium bromida. Gel diperhatikan menggunakan sistem dokumentasi gel (Alpha Innotech, USA) di bawah sinaran ultra ungu. Jujukan pencetus adalah seperti berikut: *GAPDH* (Kehadapan: 5'GCAACTAGGATGGTGTGGCT³; Berbalik: 5'TCCATTCCCCAGCTCTCATA³) dan *BSP* (Kehadapan: 5'GCCTGGCACAGGGTATACAG³; Berbalik: 5'TGGTGTCTTCTGCATTGGCT³).

PENYEDIAAN SAMPEL PROTEIN

Selepas 7 dan 21 hari pengkulturan, medium dikeluarkan dan sel dibasuh menggunakan medium basal DMEM-KO masing-masing sebanyak tiga kali. Sel dieram dalam medium basal DMEM-KO yang diletakkan di dalam inkubator yang mengandungi 5% CO₂ selama 12 jam. Selepas itu, medium eraman dipindahkan ke dalam tiub yang mengandungi 1 \times enzim perencat protease dan diempar pada kelajuan 1000 g pada suhu 4 °C selama 5 min. Protein daripada medium tersebut diasingkan melalui teknik pemendakan menggunakan 95% etanol.

Medium ditambahkan dengan 95% etanol (nisbah 1:9) dan dieramkan semalaman pada suhu -80 °C. Campuran tersebut diempas pada kelajuan 4500 g pada 4 °C selama 30 min. Supernatan dibuang manakala pelet yang terhasil dikeringkan pada suhu bilik selama 5 min. Setelah kering, pelet tersebut diampai menggunakan 50 mM ammonium hidrogen karbonat dalam 8 M urea. Sampel disimpan dalam -80 °C sehingga analisis seterusnya dilakukan.

PENYEDIAAN SAMPEL PEPTIDA

Sebanyak 10 µL sampel ditambahkan ke dalam 15 µL 50 mM ammonium bikarbonat dan 1.5 µL 100 mM ditiotretol untuk penurunan protein. Air suling ternyahion ditambahkan ke dalam campuran tersebut sehingga isi padu akhir larutan mencapai 27 µL. Campuran tersebut dieramkan pada suhu 60 °C selama 30 min di atas blok haba dan dibiarkan sejuk pada suhu bilik selama lima minit. Kemudian, 3 µL 100 mM iodoasetamida ditambahkan untuk pengalkilan protein dan sampel dieram dalam gelap selama 20 min. Kepekatan urea dalam sampel protein dicairkan menjadi 1 M menggunakan 50 mM ammonium bikarbonat sebelum pencernaan tripsin dilakukan. Sampel protein dicernakan menggunakan 100 ng tripsin (gred spektrometri jisim) pada suhu 37 °C selama 3 jam. Seterusnya, sebanyak 100 ng tripsin ditambahkan lagi ke dalam campuran dan dieram semalaman di atas blok haba pada suhu 30 °C. Setelah itu, tiub yang mengandungi sampel divorteks dan diempas pada kelajuan 73 g selama seminit. Seterusnya, sampel diempas pada kelajuan 1000 g dalam mesin pengempas vakum selama 10 hingga 15 minit sehingga kering.

Selepas proses pengeringan menggunakan mesin pengempas vakum, sampel dilarutkan dalam 1 mL 0.1% asid formik. Kolum katrij *Sep-Pak* (Waters Corporation, USA) digunakan untuk proses penyahgaraman sampel. Sebanyak 3 mL 90% metanol dilalukan pada kolum *Sep-Pak* untuk membasahkan kolum. Kemudian, 2 mL 0.1% asid formik dipipetkan ke dalam kolum *Sep-Pak* dengan titisan secara perlahan-lahan. Setelah itu, 1 mL sampel pula dimasukkan ke dalam kolum juga melalui pendekatan titisan secara perlahan. Setelah kesemua sampel habis, 1 mL 0.1% asid formik dipipetkan ke dalam kolum diikuti dengan 1 mL 50% asetonitril dalam 0.1% asid formik bagi mengeluarkan sebarang peptida yang terperangkap di dalam kolum. Sampel peptida tersebut dikumpulkan di dalam tiub baru dan dikeringkan dengan menggunakan mesin pengempas vakum. Sampel peptida dilarutkan dalam 0.1% asid formik sebelum analisis menggunakan mesin kromatografi cecair-spektrometri jisim-spektrometri jisim (LC-MS/MS) dilakukan.

PENENTUAN PROTEIN MELALUI ANALISIS LC-MS/MS SECARA SEMI-KUANTITATIF

Tiga kali suntikan dilakukan bagi setiap sampel peptida ke dalam kromatografi cecair (LC) (Dionex 3000 Ultimate RSLnano, USA) yang disambungkan kepada spektrometer jisim (MS) LTQ Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, Bremen, Jerman). Sebanyak 2 µg peptida disuntik ke dalam kolum fasa berbalik dan dikeluarkan pada kadar aliran 250 nL per min. Alat LC ditetapkan supaya beroperasi pada mod bersandarkan data (*data-dependent mode*). Bagi setiap analisis kecerunan kepekatan penimbal digunakan iaitu 5 - 40% penimbal B selama 91 min, seterusnya 2 min bagi 85% penimbal B, 3 min bagi 85% penimbal B, 5% penimbal B selama seminit dan akhir sekali 4 min bagi 5% penimbal B. Selepas setiap analisis, kolum dibasuh menggunakan 10% penimbal A dan 90% penimbal B iaitu Penimbal A: 0.1% asid formik dalam air steril manakala Penimbal B: 0.1% asid formik dalam asetonitril.

Spektrum imbasan penuh dikumpulkan daripada spektrometri jisim Orbitrap berdasarkan parameter yang berikut: Lingkungan imbasan 310-1800 m/z, kuasa pembeza-jelas sebanyak 12,000, sasaran automatik pengawal gandaan (AGC) sebanyak 400,000 dan masa suntikan maksimum sebanyak 50 ms. Kaedah ini merangkumi Mod Kelajuan Tinggi selama 3 s dengan pelopor dipilih secara maksimum pada kitaran 3 s. Pelopor monoisotop m/z dan keadaan bercas 2-7 sahaja dipilih untuk analisis. Semua pelopor ditapis menggunakan tettingkap penyisihan dinamik selama 20 s dengan ambang keamatan sebanyak 5,000.

Bagi spektrum MS/MS pula, kadar imbasan pantas dilakukan pada masa suntikan maksimum iaitu 250 ms. Ion induk dan ion serpihan masing-masing ditentukan dengan penetapan toleransi sebanyak ± 10 ppm dan ± 0.6 Da. Pengoksidaan (M), penyahaminaan aspargina (N) dan glutamin (Q) dipilih sebagai pengubahsuaian pemboleh ubah. Sampel peptida disahkan dengan menggunakan algoritma penapis (percolator®) berdasarkan nilai q kurang daripada 5% kadar penemuan palsu (FDR) (Aranda et al. 2019). FDR pada tahap protein pula adalah kurang daripada 1% (Lu et al. 2019). Data LC-MS/MS diperolehi melalui pangkalan data *Homo sapiens* daripada UniProt menggunakan perisian Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™ versi 2.1. Kuantifikasi ditentukan menggunakan formula berikut:

$$\text{Penambahan Protein (PP)} = \frac{\text{Protein abundance sampel rawatan}}{\text{Protein abundance sampel kawalan}}$$

dengan nilai PP > 1.5 merupakan peningkatan pengekspresan protein dan < 1.5 merupakan penurunan

pengekspresan protein. Normalisasi pula dilakukan berdasarkan kepada setiap sampel yang disuntik adalah pada kepekatan 2 µg protein.

$$\text{Normalisasi} = \frac{\text{Protein abundance pada sampel} \times 2\mu\text{g protein}}{\text{Kepekatan protein yang disuntik} (\mu\text{g})}$$

Seterusnya, penentuan protein daripada LC-MS/MS dianalisis menggunakan pangkalan data *Homo sapiens* daripada UniProt (dimuat turun pada November 2018) menggunakan perisian Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™ versi 2.1.

ANALISIS IN SILIKO

Peratus persamaan protein di antara sel dalam perlakuan asid askorbik, kawalan positif dan kawalan negatif dibandingkan. Perisian Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) digunakan untuk mengenal pasti protein yang sama di antara jenis sel, hari analisis dan jenis perlakuan.

Analisis perubahan keamatan pengekspresan protein dilakukan bagi protein sel DPSC antara perlakuan asid askorbik dan kedua-dua kawalan positif dan negatif. Analisis perubahan keamatan pengekspresan turut dijalankan ke atas protein tersebut pada hari ke-7 dan 21 semasa perlakuan asid askorbik. Ujian Shapiro-Wilk dilakukan untuk menentukan taburan data yang normal. Ujian analisis varians (ANOVA secara sehalu dilakukan bersama *post hoc* ujian Bonferroni, $df=2$) untuk menentukan perubahan keamatan protein yang signifikan ($p<0.05$). Hanya protein yang menunjukkan perubahan keamatan pengekspresan melebihi 1.5 kali ganda secara signifikan ($p<0.05$) dianggap sebagai peningkatan atau penurunan keamatan protein.

Analisis pengenalpastian sekretom dilakukan untuk meramal protein yang dirembeskan ke dalam medium menggunakan perisian SignalP 5.0, SecretomeP 2.0a dan TMHMM v. 2.0. Secara asasnya, protein sekretom ditentukan dengan menepati salah satu kriteria iaitu skor melebihi 0.450 daripada perisian SignalP 5.0, skor NN melebihi 0.600 daripada perisian SecretomeP 2.0a atau skor melebihi 18.000 daripada perisian TMHMM v. 2.0. Seterusnya, dua pangkalan data iaitu Universal Protein Resources (UniProt; www.uniprot.org) dan Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER; www.pantherdb.org) digunakan untuk meramal protein sekretom yang terlibat dalam proses biologi yang berkaitan dengan pembezaan osteoblas.

Sekretom seterusnya dimasukkan ke dalam pangkalan data STRING untuk menentukan ramalan hubung kait sekretom. Sumber interaksi sekretom

dipilih daripada *text-mining*, uji kaji, pangkalan data, pengekspresan bersama, kejiranan, gabungan gen dan kejadian bersama. Skor interaksi ditetapkan pada tahap keyakinan sederhana (0.400-1.000). Sekretom diwakili oleh nod bulat dengan nama gen masing-masing, manakala setiap tapak jalan bagi sekretom diwakilkan oleh warna yang berbeza.

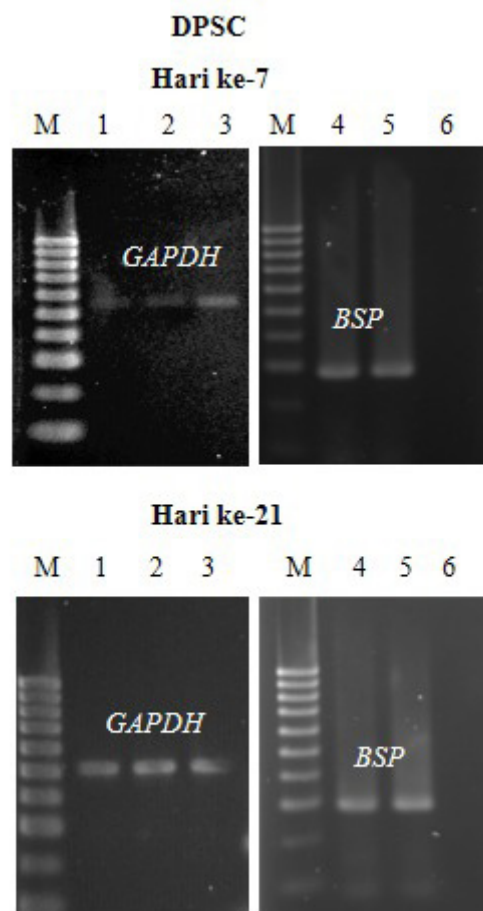
HASIL DAN PERBINCANGAN

PENGEKSPRESAN GEN OSTEOBLAS DALAM PERLAKUAN ASID ASKORBİK

Rajah 1 menunjukkan profil pengekspresan gen osteoblas bagi sel DPSC pasaj 3 selepas perlakuan asid askorbik. Sel DPSC pada pasaj 3 merupakan populasi sel stem mesenkima dengan lebih 90% sel dalam populasi ini mengekspreskan penanda sel stem mesenkima iaitu CD29 (Ponnaiyan & Jegadeesan 2014), CD73 dan CD105 (Huang et al. 2010). Dalam kajian sebelum ini; sel DPSC pada pasaj 3 telah ditentukan pencirian molekul. Kajian oleh Shahrul Hisham et al. (2019) menunjukkan sel DPSC yang sama pada pasaj 3 merupakan sel stem mesenkima dengan kehadiran penanda molekul cKIT⁺, CD29⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD146⁺, CD11b⁻, CD34⁻ dan CD45⁻. Pada hari ke-7 dan 21, kedua-dua sel di dalam perlakuan asid askorbik dan kawalan positif didapati mengekspreskan gen *GAPDH*⁺ (~532 pb) dan *BSP*⁺ (~287 pb) (Rajah 1). Gen *BSP* diekspreskan pada fasa awal pembezaan osteoblas dan terlibat dalam proses pemineralan matriks tulang iaitu mengaruh tapak jalan penghasilan matrik berkalsium (Bouet et al. 2015; Yang et al. 2016). Walau bagaimanapun, kajian ini hanya melibatkan satu sahaja penanda gen osteoblas. Hari ke-7 dan 21 dipilih kerana hari ke-7 merupakan peringkat awal proses pembezaan sel osteoblas (Intan Zarina et al. 2008; Muhammad Dain et al. 2011; Ruzanna et al. 2012; Shahrul Hisham et al. 2019), manakala hari ke-21 mewakili peringkat akhir pembezaan secara *in vitro* kerana pada masa ini sel telah membeza sepenuhnya membentuk sel osteoblas matang (Manal et al. 2021; Megat Abdul Wahab et al. 2017). Kajian lain ke atas sel stem adipos juga menunjukkan pengekspresan gen *BSP* semasa pembezaan osteoblas (Olimpio et al. 2018). Ini kerana gen *BSP* bukan sahaja mengekod sialoprotein tulang iaitu komponen matriks tulang; malahan terlibat dalam pembentukan hidroksiapatit semasa pemineralan tulang (Farshdousti Hagh et al. 2015). Ini menunjukkan bahawa gen *BSP* terlibat dalam pembezaan osteoblas daripada fasa awal hingga akhir. Pengekspresan gen *BSP* telah menunjukkan bahawa kepekatan 10 µg/mL asid askorbik

sahaja masih mampu mengaruh pembedaan osteoblas DPSC sama seperti kawalan positif (Rajah 1). Oleh itu,

analisis profil protein sekretom dilakukan melibatkan aruhan asid askorbik pada kepekatan 10 µg/mL.



DPSC diaruhkan selama 7 dan 21 hari menggunakan 10 µg/mL asid askorbik, kawalan positif (50 µg/mL asid askorbik dan 10 mM β-gliserofosfat) dan kawalan negatif (medium sel tanpa perlakuan asid askorbik). M: penanda 100 pasang bes (pb); Lajur 1 dan 4: sel dalam perlakuan 10 µg/mL asid askorbik; Lajur 2 dan 5: kawalan positif; Lajur 3 dan 6: kawalan negatif. *GAPDH*⁺ (~532 pb) dan *BSP*⁺ (~287 pb) diekspreskan oleh sel pada hari ke-7 dan 21 menandakan pembedaan osteoblas dalam perlakuan asid askorbik dan kawalan positif

RAJAH 1. Pengekspresan penanda gen osteoblas

PENKULTURAN DPSC DALAM MEDIUM BASAL TANPA SERUM

Dalam kajian ini, sel DPSC dikulturkan dalam medium basal tanpa serum selama 12 jam sebelum analisis sekretom dilakukan. Ini kerana serum mengandungi 4-5 mg/mL protein yang akan menyukarkan penentuan profil protein sekretom yang kebiasaannya akan diekspreskan oleh sel pada kepekatan yang rendah (Shin et al. 2019). Berdasarkan kajian terdahulu ke atas sel stem sumsum tulang (BMMSC) melibatkan analisis pembedaan osteoblas; pengkulturan tanpa serum selama 12 jam

adalah masa eraman yang mencukupi untuk pemantauan profil protein sekretom (Choi et al. 2010). Oleh itu, masa eraman selama 12 jam juga dipilih dalam kajian melibatkan DPSC.

PROFIL PROTEIN SEKRETOM UNTUK DPSC DI DALAM ARUHAN ASID ASKORBIK

Analisis protein sekretom adalah penting bagi menentukan perubahan dinamik yang berlaku pada komposisi rembesan kerana ia mempengaruhi proliferasi dan perkembangan

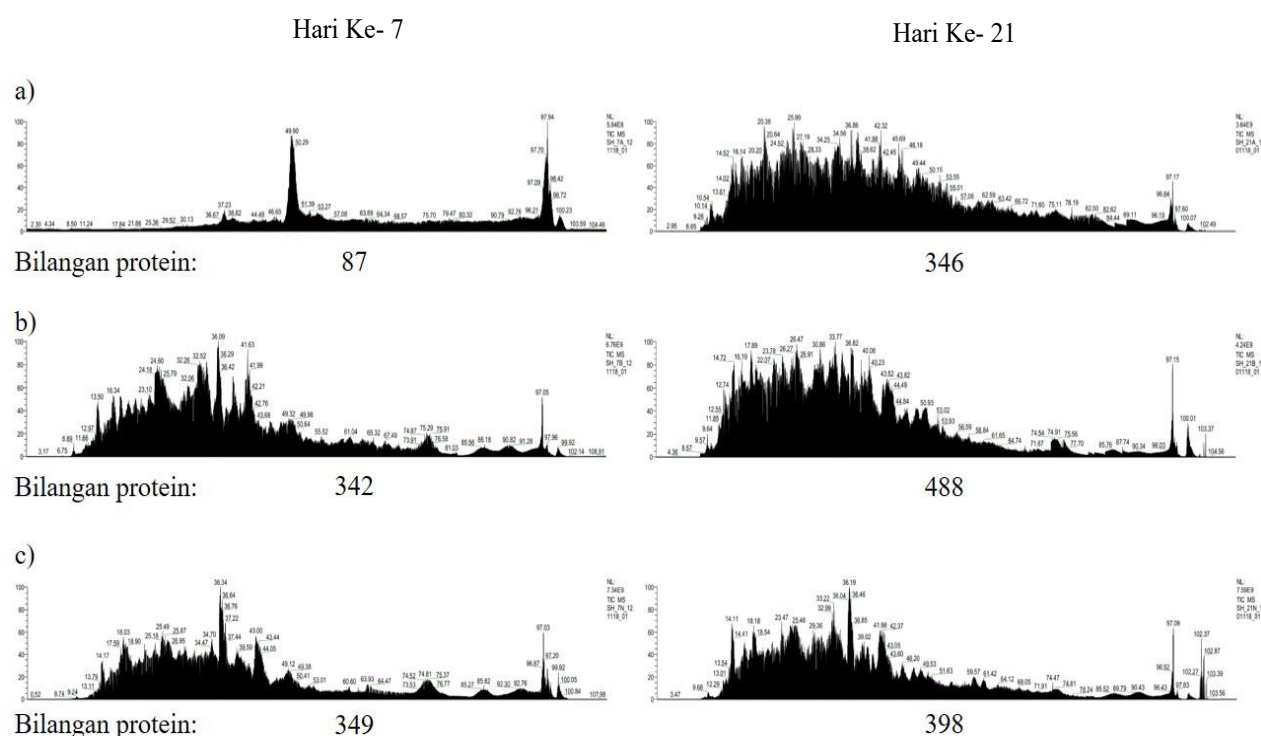
sel (Shin et al. 2019). Rajah 2 menunjukkan *total* arus ion (TIC) bagi DPSC pada hari ke-7 dan 21 semasa perlakuan asid askorbik, kawalan positif dan negatif. Setiap kumpulan perlakuan ini masing-masing melibatkan tiga sampel. TIC menunjukkan *elution* protein yang konsisten selama 110 min. Sebanyak ~80-480 protein telah dikenal pasti di antara sel pada hari analisis dan perlakuan yang berbeza (Rajah 2(a)-2(c)). Kajian terdahulu ke atas sel BMMSC melaporkan kehadiran ~200 protein dalam medium basal semasa pembezaan osteoblas (Choi et al. 2010). Pengenalpastian protein sering melibatkan bilangan protein yang rendah kerana protein dirembeskan oleh sel pada kepekatan yang sangat rendah yang seterusnya akan menyukarkan proses pengesanan (Chevallet et al. 2007).

Untuk mendapatkan gambaran kasar tentang protein yang telah dikenal pasti, pemerhatian dilakukan ke atas tiga kumpulan perlakuan yang melibatkan sel DPSC iaitu perlakuan asid askorbik, kawalan positif dan negatif. Setiap kumpulan merangkumi analisis pada hari ke-7 dan 21 bagi sel (Rajah 3(a)-3(c)). Sebanyak 72 protein telah dikenal pasti bagi perlakuan asid askorbik (Rajah 3(a)), diikuti 272 protein bagi kawalan positif (Rajah 3(b)) dan 284 protein bagi kawalan negatif (Rajah 3(c)). Analisis protein sekretom dijalankan sebanyak tiga

kali terhadap tiga sampel yang berlainan untuk setiap kumpulan perlakuan dan menunjukkan keputusan yang hampir sama pada setiap replikat.

Bilangan protein yang diekspreskan semasa pembezaan sel didapati berkurangan berbanding kawalan negatif iaitu sel stem yang mengalami proliferasi. Sel stem dalam kawalan negatif akan mempamerkan gabungan faktor transkripsi tertentu untuk pembahagian sel serta mengekalkan tahap primitif sel. Walau bagaimanapun, gabungan tindakan faktor transkripsi ini melibatkan pelbagai protein.

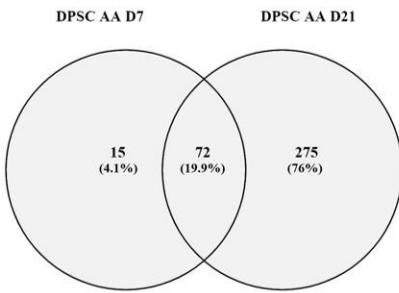
Pengawalaturan isyarat sel yang khusus dan pengekspressan protein yang berkaitan sahaja berlaku semasa pembezaan sel; dalam kes ini, apabila sel diaruhkan menggunakan asid askorbik, hanya beberapa tapak jalan akan diaktifkan. Semasa pembezaan sel, beberapa faktor transkripsi yang terlibat dalam proses pembahagian sel berinteraksi dengan gabungan faktor transkripsi lain yang akan menghasilkan perubahan keamatan protein yang berlainan (Rossmann et al. 2018). Oleh itu, gabungan pelbagai faktor transkripsi yang berbeza dan perubahan keamatan pengekspressan protein adalah lebih penting dalam menentukan takdir sesuatu sel berbanding bilangan protein yang diekspreskan semasa rawatan.



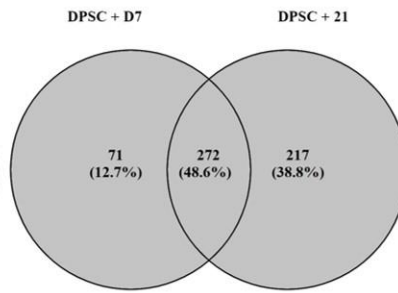
LC-MS/MS DPSC pada hari ke-7 dan 21 selepas perlakuan a) 10 µg/mL asid askorbik, b) kawalan positif dan c) kawalan negatif. Kromatogram menunjukkan keamatan jumlah terhadap masa (minit). Sebanyak 2 µL sampel (1 µg/µL) disuntik selama 110 minit pada kadar aliran 250 nL/min dalam fasa mobil B 0.1% (asid formik 0.1% dalam asetonitril). Analisis LC-MS/MS telah mengenal pasti ~80 hingga 480 protein dalam medium basal DPSC pada semua perlakuan dan masa

RAJAH 2. *Total* arus ion (TIC) kromatogram dan bilangan protein dalam medium basal

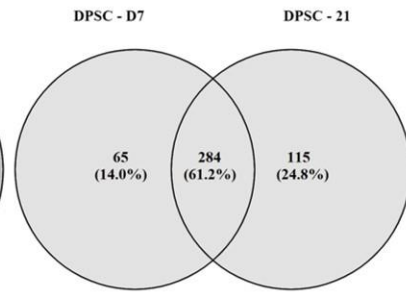
a) Asid Askorbik



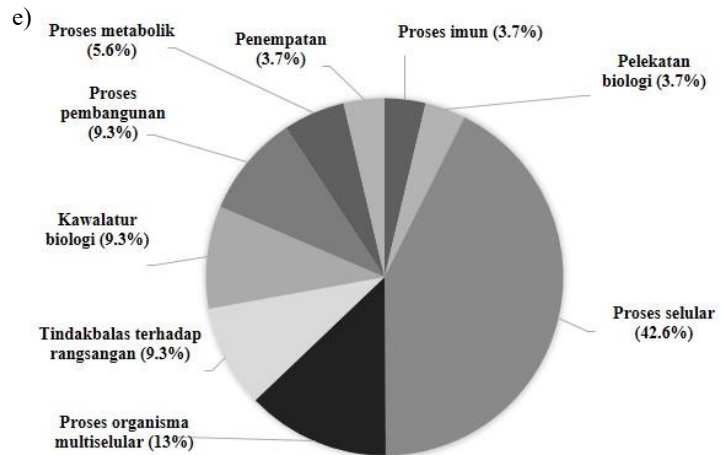
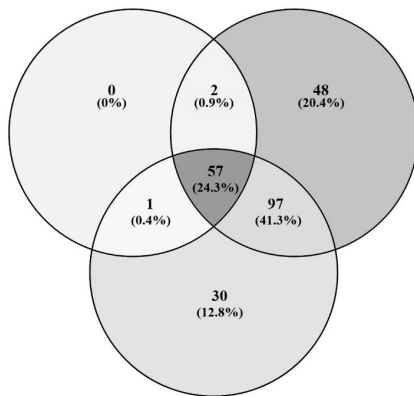
b) Kawalan Positif



c) Kawalan Negatif



d) Asid Askorbik Kawalan Positif



Medium basal DPSC dianalisis pada hari ke-7 (D7) dan 21 (D21) selepas perlakuan a) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ asid askorbik, b) kawalan positif dan c) kawalan negatif; masing-masing menunjukkan taburan protein sebanyak 72, 272 dan 284. d) Sebanyak 57 protein yang sama didapati dalam ketiga-tiga perlakuan. e) Pangkalan data *Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER)* menunjukkan hanya 43 protein daripada keseluruhan 57 protein yang terdapat di dalam pangkalan data ini dengan majoriti protein terlibat dalam proses sel (42.6%) dan proses organisma multisel (13.0%)

RAJAH 3. Taburan dan proses biologi protein dalam medium basal

PROSES BIOLOGI MELALUI PANGKALAN DATA *PANTHER*
 Penentuan protein yang sama dalam suatu perlakuan adalah penting kerana majoriti protein tidak dapat melaksanakan fungsinya secara bersendirian. Protein berinteraksi antara satu sama lain dan sering terlibat dalam proses biologi yang sama (Launay et al. 2017). Maka, protein yang sama perlulah ditentukan terlebih dahulu sebelum mengenal pasti proses biologinya. Proses biologi merupakan urutan fungsi molekul yang mewakili peranan fisiologi bagi setiap protein yang terlibat secara keseluruhannya dalam kompleks jaringan sekretom (Dalmer & Clugston 2019). Berdasarkan Rajah 3(d), sebanyak 57 protein yang sama telah dirembeskan ke dalam medium semasa perlakuan asid askorbik, kawalan positif dan negatif bagi DPSC (Rajah 3(d)). Gambaran proses biologi bagi protein tersebut

telah ditentukan menggunakan *PANTHER* seperti dalam Rajah 3(e). Sejumlah 43 daripada 57 protein yang sama didapati tersenarai dalam pangkalan data *PANTHER* berserta dengan proses biologinya.

Hampir separuh daripada protein tersebut dikaitkan dengan proses sel (42.6%) seperti pembentukan sitorangka, rembesan faktor pertumbuhan serta komponen matriks ekstrasel (Rajah 3(e)). Komponen dalam proses sel dilaporkan mempunyai penglibatan yang penting dalam mekanisme proliferasi dan pembezaan sel (Gattazzo et al. 2014). Menurut pangkalan data *PANTHER*, sebanyak 13% protein pula dikaitkan dengan proses organisma multisel (Rajah 3(e)). Proses ini merujuk kepada rembesan bahan organik matriks oleh pelbagai organisma multisel. Ini termasuklah kolagen dan faktor pertumbuhan yang berpotensi tinggi secara *in*

vitro terlibat di dalam proses penyembuhan luka (Deng et al. 2017). Daripada 22 proses biologi yang terdapat di dalam pangkalan data *PANTHER*; sembilan proses biologi telah dikenal pasti mempunyai kaitan dengan 43 protein yang telah dikenal pasti pada medium pembezaan osteoblas untuk DPSC (Rajah 3(e)). Kajian lain yang melibatkan analisis medium eraman sel stem folikel gigi menunjukkan bahawa majoriti protein yang terlibat merupakan proses sel, proses metabolik, kawalatur biologi, proses pembangunan dan tindak balas terhadap rangsangan (Dou et al. 2017). Kelima-lima proses biologi tersebut turut ditemui dalam kajian ini, iaitu sel DPSC.

PROFIL PERUBAHAN KEAMATAN PENGEKSPRESAN PROTEIN SEKRETOM SEMASA PEMBEZAAN OSTEOLAS

Analisis terhadap perubahan keamatan pengekspressan protein dibandingkan antara perlakuan dan kedua-dua kawalan untuk memahami sistem biologi sewaktu pembentukan tulang. Dalam kajian ini, lima protein didapati mengalami perubahan keamatan pengekspressan ($p < 0.05$) serta terlibat di dalam pembezaan osteoblas. Namun, pengkulturan sel tanpa serum boleh menyebabkan kematian sel dan kandungannya terurai ke dalam medium basal (Tit-Oon et al. 2014). Bagi memastikan protein dalam medium basal DMEM-KO adalah hasil rembesan sel (sekretom) dan bukan kandungan sel mati (proteom) akibat lisis sel; lima protein tersebut disaring menggunakan tiga perisian di atas talian iaitu *SignalP 5.0*, *SecretomeP 2.0a* dan *TMHMM v. 2.0*. Perisian *SignalP 5.0* digunakan untuk meramal sekretom yang dirembeskan melalui tapak jalan klasik manakala *SecretomeP 2.0a* meramal sekretom yang dirembeskan melalui tapak jalan bukan klasik. *TMHMM v2.0* pula meramal kehadiran heliks transmembran pada jujukan protein (Chang et al. 2013).

Merujuk kepada Jadual 1, empat daripada lima protein DPSC diramalkan sebagai protein sekretom yang terlibat dalam pembezaan sel DPSC kepada osteoblas iaitu inhibin beta rantai A (INHBA), fibrilin-2 (FBN2), peroksiredoksin-1 (PRDX1) dan talin-1 (TLN1). Daripada kesemua empat protein sekretom ini; satu protein sekretom yang merupakan protein heliks transmembran iaitu FBN2 melibatkan tapak jalan klasik. Manakala, tiga sekretom pula terlibat dalam tapak jalan bukan klasik iaitu, INHBA, PRDX1 dan TLN1.

Sebelum ini, kajian pembezaan osteoblas daripada BMMSC turut melaporkan 33 dan 25% protein sekretom

masing-masing terlibat di dalam tapak jalan klasik dan bukan klasik (Kim et al. 2013). Majoriti sekretom mempunyai struktur isyarat peptida supaya dirembeskan melalui tapak jalan klasik melibatkan sintesis polipeptida oleh ribosom, proses pasca-translasi sebelum dihantar ke jasad Golgi dan seterusnya dirembes ke luar sel secara eksositosis (Brandizzi & Barlowe 2013). Bagi sekretom selebihnya, protein yang terlibat samada tidak mempunyai struktur isyarat peptida atau dirembeskan melalui tapak jalan bukan klasik iaitu diangkut ke luar sel tanpa melalui jasad Golgi dengan menggunakan laluan yang masih belum dikenal pasti (Kim et al. 2018) (Jadual 1).

Objektif kajian ini adalah bertujuan untuk menentukan potensi asid askorbik dalam mengaruh sekretom yang berkaitan dengan osteoblas. Maka selepas penentuan sekretom, empat proses biologi dijadikan sebagai kriteria pemilihan protein sekretom yang berkaitan dengan osteoblas iaitu pembezaan sel, pembangunan sistem rangka, ikatan ion kalsium (Schmidt et al. 2016) serta organisasi matriks ekstrasel (Kim et al. 2013). Maklumat proses biologi bagi setiap sekretom berkaitan osteoblas diperoleh daripada pangkalan data *UniProt* dan *PANTHER* serta diringkaskan dalam Jadual 2. Kesimpulannya, sebanyak tiga protein sekretom yang berkaitan dengan osteoblas telah dikenal pasti bagi sel DPSC di bawah aruhan asid askorbik (Jadual 2).

Seterusnya, perubahan keamatan pengekspressan sekretom berkaitan osteoblas bagi sel DPSC juga diringkaskan di dalam Jadual 2. INHBA, FBN2 dan PRDX1 mengalami perubahan keamatan pengekspressan dalam perlakuan asid askorbik berbanding kawalan negatif samada pada hari ke-7 dan 21. Semasa perlakuan asid askorbik pada hari ke-7 berbanding ke-21 pula, hanya FBN2 mengalami perubahan keamatan pengekspressan (Jadual 2).

Kajian terdahulu ke atas sel BMMSC yang dibezakan kepada osteoblas menunjukkan perubahan keamatan sekretom yang terlibat dalam organisasi sitorangka, ikatan ion kalsium dan pembentukan matriks ekstrasel. Namun, pembezaan BMMSC kepada osteoblas diaruh menggunakan gabungan asid askorbik dan β -gliserofosfat (Choi et al. 2010). Daripada kajian ini, perlakuan asid askorbik sahaja tanpa β -gliserofosfat didapati telah berjaya mengaruh perubahan keamatan sekretom berkaitan osteoblas bagi sel DPSC.

JADUAL 1. Pengenalpastian sekretom DPSC berdasarkan ramalan oleh perisian *SignalP 5.0*, *SecretomeP 2.0a* dan *TMHMM v2.0*

No	No Aksesan	Protein (Nama Gene)	<i>SignalP</i> ^{a)}	<i>SecretomeP</i> ^{b)}	<i>TMHMM</i> ^{c)}	Sekretom (Ya/Tidak)
1	P08476	Inhibin beta rantai A (INHBA)	0.974	0.814	0.007660	Ya
2	P35556	Fibrilin-2 (FBN2)	0.844	0.417	18.51939	Ya
3	Q06830	Peroksiredoksin-1 (PRDX1) Isoform 3 bagi	0.001	0.838	10.04669	Ya
4	Q9ULV4-3	Koronin-1C (CORO1C)	0.002	0.080	6.99404	Tidak
5	Q9Y490	Talin-1 (TLN1)	0.0016	0.755	0.00018	Ya

Protein yang menunjukkan perubahan keamatan pengekspresan dikategorikan sebagai sekretom jika memenuhi sekurang-kurangnya satu kriteria yang berikut: protein mempunyai struktur isyarat peptida berdasarkan *SignalP 5.0* (skor-D>0.450), protein dirembeskan melalui tapak jalan bukan klasik berdasarkan *SecretomeP 2.0a* (skor N-N>0.600) dan protein mempunyai heliks transmembran berdasarkan *TMHMM v2.0* (skor>18.000). **Fon tebal** menunjukkan sekretom memenuhi salah satu daripada tiga perisian

JADUAL 2. Perubahan keamatan pengekspresan sekretom DPSC berkaitan osteoblas sewaktu perlakuan asid askorbik pada hari ke-7 dan 21

No Aksesan	Sekretom (Nama Gen)	Proses Biologi	Pengekspresan pada hari ke-7		Pengekspresan pada hari ke-21		Pengekspresan AA pada hari ke-7 dan 21
			AA & NEG	AA & POS	AA & NEG	AA & POS	
P08476	Inhibin beta rantai A (INHBA)	Pembezaan sel	Malar	Malar	Menurun	Menurun	Malar
P35556	Fibrilin-2 (FBN2)	Pembangunan sistem rangka	Menurun	Menurun	Menurun	Malar	Menurun
Q06830	Peroksiredoksin-1 (PRDX1)	Organisasi matriks ekstrasel	Malar	Malar	Meningkat	Menurun	Malar

*AA: Asid Askorbik; POS: Kawalan Positif; NEG: Kawalan Negatif

HUBUNG KAIT ANTARA PROTEIN SEKRETOM DENGAN TAPAK JALAN SEMASA PERLAKUAN ASID ASKORBİK MELALUI PANGKALAN DATA *STRING*

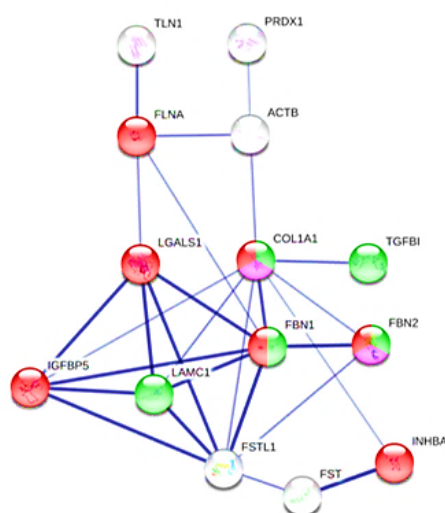
Selain daripada proses biologi dan perubahan keamatan pengekspresan, hubung kait antara protein sekretom dapat memberikan maklumat yang penting semasa aruhan asid askorbik dalam pembezaan osteoblas. Rajah 4 menunjukkan hubung kait protein sekretom yang terlibat di dalam pembezaan osteoblas bagi sel DPSC berdasarkan kepada pangkalan data *STRING*. Analisis hubung kait

antara protein sekretom berdasarkan pangkalan data *STRING* mendapati sejumlah sebelas protein lain juga terlibat untuk melengkapkan jaringan hubung kait ini. Kesemua sekretom diwakili oleh simbol gen masing-masing. Berdasarkan Rajah 4, setiap hubungan di antara protein menunjukkan nilai p pengayaan protein yang signifikan ($p < 1.0 \times 10^{-16}$). Melalui pendekatan analisis ini, hubungan fungsian telah diramalkan bagi semua sekretom hasil aruhan asid askorbik bagi sel DPSC.

Cadangan tapak jalan bagi pembezaan sel DPSC semasa pembentukan osteoblas telah ditunjukkan dalam Jadual 3. Berdasarkan pangkalan data *STRING* dan analisis pendekatan LC-MS/MS pada sel DPSC yang diaruh dengan asid askorbik; hanya dua protein sekretom yang telah dikenal pasti terlibat di dalam pembezaan DPSC kepada osteoblas iaitu INHBA dan FBN2. Kedua-dua protein ini (INHBA dan FBN2) didapati terlibat dalam tapak jalan 1) Pengawalaturan Pembezaan Sel, manakala FBN2 juga terlibat dalam dua tapak jalan yang berlainan iaitu 2) Organisasi Matriks Ekstrasel dan 3) Pembentukan Tulang Trabekular. Ketiga-tiga tapak jalan ini adalah signifikan (FDR) dan nilai $p < 0.05$ *Bonferroni-corrected*) bagi pembezaan DPSC kepada osteoblas (Jadual 3).

Pengekspresan INHBA didapati meningkat semasa pembentukan tulang melalui rangsangan aktiviti osteoblas (Perrien et al. 2012). INHBA didapati berupaya untuk meningkatkan kadar pemineralan matriks

ekstrasel dan perembesan osteokalsin iaitu sejenis hormon bukan kolagen yang terdapat pada tulang (Perrien et al. 2007). Selain itu, FBN2 sentiasa diekspreskan semasa pembezaan MSC kepada osteoblas dan pemodelan semula tulang retak didapati mengikat ion kalsium dan protein morfogenetik tulang (Smaldone & Ramirez 2016). Kedua-dua sekretom telah dirembeskan dalam kajian pembezaan osteoblas ini juga terlibat dalam aruhan 10 $\mu\text{g/mL}$ asid askorbik sahaja. Ini membuktikan bahawa asid askorbik sahaja tanpa β -gliserofosfat dapat mengaruh penanda sekretom berkaitan osteoblas seperti media pembezaan kawalan (kawalan positif). Maka, INHBA dan FBN2 dicadangkan sebagai calon penanda sekretom bagi DPSC sewaktu pembezaan osteoblas dengan kehadiran asid askorbik. Calon penanda sekretom amat berguna untuk kajian dan aplikasi dalam bidang perubatan regeneratif bagi merawat penyakit berkaitan pemodelan tulang.



Warna nod dan proses biologi b) DPSC

- Putih: tiada proses biologi dikesan
- Merah: Regulation of Cell Differentiation
- Hijau: Organisasi Matriks Ekstraselular
- Ungu: Pembentukan Trabekular Tulang

Berdasarkan pangkalan data *Search Tools for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)*, tiga sekretom bagi DPSC berserta sebelas protein tambahan diperlukan untuk membentuk hubung kait sekretom. Setiap protein sekretom diwakilkan oleh nod dan nama gen masing-masing. Warna nod mewakili proses biologi tertentu iaitu: Putih: tiada proses biologi dikesan; Merah: pengawalaturan pembezaan sel (DPSC); Hijau: organisasi matriks ekstrasel; dan Ungu: pembentukan tulang trabekular (DPSC); gabungan warna mewakili gabungan proses. Hubung kait sekretom ditentukan melalui penghubung nod. Ketebalan penghubung nod mewakili skor tertentu. Paling nipis: keyakinan paling rendah (skor interaksi: 0.400); sederhana tebal: keyakinan sederhana (skor interaksi: 0.700) dan tebal: keyakinan tertinggi (skor interaksi: 0.900)

RAJAH 4. Jaringan hubung kait sekretom berkaitan osteoblas bagi DPSC

JADUAL 3. Tapak jalan bagi sekretom berkaitan osteoblas sewaktu perlakuan asid askorbik

#ID tapak jalan	Tapak jalan	DPSC		
		Bilangan gen	Kadar penemuan palsu (p<0.05)	Gen yang padan dalam jaringan interaksi
GO:0045595	Pengawalan Pembezaan Sel	7	0.0029	COL1A1,FBN1, FBN2 ,FLNA,IGFBP5, INHBA ,LGALS1
GO:0030198	Organisasi Matriks Ekstrasel	5	0.00063	COL1A1,FBN1, FBN2 ,LAMC1,TGFBI
GO:0060346	Pembentukan Tulang Trabekular	2	0.0013	COL1A1, FBN2

Kadar penemuan palsu dan nilai *p* *Benferroni corrected* (FDR; $p < 0.05$) diperoleh daripada pangkalan data *STRING*. Ketiga-tiga tapak jalan didapati signifikan (FDR; $p < 0.05$) bagi DPSC. **Fon tebal** mewakili sekretom yang menunjukkan perubahan keamatan pengekspressan dalam kajian ini dan tersenarai dalam *STRING*

KESIMPULAN

Perlakuan asid askorbik ke atas DPSC berjaya mengaruh pengekspressan gen osteoblas iaitu *BSP* selepas 7 hari. Perubahan keamatan pengekspressan bagi sekretom berkaitan osteoblas turut ditemui sewaktu aruhan DPSC kepada sel osteoblas. Daripada analisis jaringan *STRING*, dua sekretom berkaitan pembezaan DPSC kepada osteoblas iaitu protein *FBN2* dan *INHBA* terlibat dalam tapak jalan pengawalan pembezaan sel, serta dua tapak jalan tambahan untuk *FBN2* iaitu Organisasi Matrik Ekstrasel dan Pembentukan Tulang Trabekular. Kedua-dua protein sekretom ini dicadangkan sebagai calon penanda sekretom semasa pembezaan osteoblas. Maka, asid askorbik sahaja tanpa β -gliserofosfat didapati berupaya untuk mengaruh pembezaan DPSC kepada osteoblas serta mengaruh pengekspressan sekretom yang mempunyai hubungan dengan osteoblas.

PENGHARGAAN

Penghargaan diberikan kepada geran penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (GUP-2017-002 dan GUP-2017-054) untuk pembiayaan kewangan kajian ini. Penghargaan turut diberikan kepada Institut Genom Malaysia untuk servis LC-MS/MS.

RUJUKAN

Aranda, S., Alcaine-Colet, A., Blanco, E., Borràs, E., Caillot, C., Sabidó, E. & Di Croce, L. 2019. Chromatin capture links the metabolic enzyme AHCY to stem cell proliferation. *Science Advances* 5(3): eaav2448.

- Ariffin, S.H.Z., Abidin, I.Z.Z., Yazid, M.D. & Wahab, R.M.A. 2010. Differentiation analyses of adult suspension mononucleated peripheral blood cells of *Mus musculus*. *Cell Communication and Signaling CCS* 8(1): 1-7.
- Berry, M.N., Barritt, G.J. & Edwards, A.M. 1991. Isolated hepatocytes; Preparation, properties and applications. Dlm. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* disunting oleh Burdon, R.H. & van Knippenberg, P.H. Netherlands: Elsevier. hlm. 337-342.
- Bouet, G., Boulefour, W., Juignet, L., Linossier, M.T., Thomas, M., Vanden-Bossche, A., Aubin, J.E., Vico, L., Marchat, D. & Malaval, L. 2015. The impairment of osteogenesis in bone sialoprotein (BSP) knockout calvaria cell cultures is cell density dependent. *PLoS ONE* 10(2): e0117402.
- Brandizzi, F. & Barlowe, C. 2013. Organization of the er-golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(6): 382-392.
- Busra, F.M., Lokanathan, Y., Nadzir, M.M., Saim, A., Idrus, R.B.H. & Chowdhury, S.R. 2017. Attachment, proliferation, and morphological properties of human dermal fibroblasts on ovine tendon collagen scaffolds: A comparative study. *Malays. J. Med. Sci.* 24(2): 33-43.
- Chang, H.Y., Hor, S.Y., Lim, K.P., Zain, R.B., Cheong, S.C., Rahman, M.A. & Karsani, S.A. 2013. Oral cancer secretome: Identification of cancer-associated proteins. *Electrophoresis* 34(15): 2199-2208.
- Chevallet, M., Diemer, H., Van Dorssealer, A., Villiers, C. & Rabilloud, T. 2007. Toward a better analysis of secreted proteins: The example of the myeloid cells secretome. *Proteomics* 7(11): 1757-1770.
- Choi, Y.A., Lim, J., Kim, K.M., Acharya, B., Cho, J.Y., Bae, Y.C., Shin, H.I., Kim, S.Y. & Park, E.K. 2010. Secretome analysis of human BMSCs and identification of SMOC1 as an important ECM protein in osteoblast differentiation. *J. Proteome Res.* 9(6): 2946-2956.

- Coelho, M.J. & Fernandes, M.H. 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. part II: Effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21(11): 1095-1102.
- Dalmer, T.R.A. & Clugston, R.D. 2019. Gene ontology enrichment analysis of congenital diaphragmatic hernia-associated genes. *Pediatr. Res.* 85(1): 13-19.
- Deng, C., He, Y., Feng, J., Dong, Z., Yao, Y., Mok, H., Lin, M. & Feng, L. 2017. Extracellular matrix/stromal vascular fraction gel conditioned medium accelerates wound healing in a murine model. *Wound Repair Regen.* 25(6): 923-932.
- Deracinois, B., Flahaut, C., Duban-Deweier, S. & Karamanos, Y. 2013. Comparative and quantitative global proteomics approaches: An overview. *Proteomes* 1(3): 180-218.
- Dou, L., Wu, Y., Yan, Q., Wang, J., Zhang, Y. & Ji, P. 2017. Secretome profiles of immortalized dental follicle cells using itraq-based proteomic analysis. *Scientific Reports* 7(1): 1-8.
- Estrada, J.C., Torres, Y., Benguria, A., Dopazo, A., Roche, E., Carrera-Quintanar, L., Perez, R.A., Enriquez, J.A., Torres, R., Ramirez, J.C., Samper, E. & Bernad, A. 2013. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis.* 4(6): e691.
- Farshdousti Hagh, M., Noruzinia, M., Mortazavi, Y., Soleimani, M., Kaviani, S., Abroun, S., Dehghani Fard, A. & Mahmoodinia, M. 2015. Different methylation patterns of runx2, osx, dlx5 and bsp in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell J.* 17(1): 71-82.
- Gattazzo, F., Urciuolo, A. & Bonaldo, P. 2014. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1840(8): 2506-2519.
- Han, Y., You, X., Xing, W., Zhang, Z. & Zou, W. 2018. Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res.* 6(1): 1-11.
- Hasmad, H., Yusof, M.R., Mohd Razi, Z.R., Hj Idrus, R.B. & Chowdhury, S.R. 2018. Human amniotic membrane with aligned electrospun fiber as scaffold for aligned tissue regeneration. *Tissue Eng. Part C Methods* 24(6): 368-378.
- Huang, G.T.J., Yamaza, T., Shea, L.D., Djouad, F., Kuhn, N.Z., Tuan, R.S. & Shi, S. 2010. Stem/progenitor cell-mediated *de novo* regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model. *Tissue Engineering Part A* 16(2): 605-615.
- Intan Zarina, Z.A., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Sahidan, S. & Zaidah, Z.A. 2008. Osteoclast and osteoblast development of *Mus musculus* haemopoietic mononucleated cells. *Journal of Biological Sciences* 8(3): 506-516.
- Intan Zarina, Z.A., Thanalechumi, M. & Shahrul Hisham, Z.A. 2020. Cytotoxicity of L- and D- ascorbic acid on murine and human suspension peripheral blood cells. *Sains Malaysiana* 49(3): 595-604.
- Katagiri, W., Sakaguchi, K., Kawai, T., Wakayama, Y., Osugi, M. & Hibi, H. 2017. A defined mix of cytokines mimics conditioned medium from cultures of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and elicits bone regeneration. *Cell Prolif.* 50(3): e12333.
- Kim, J., Gee, H.Y. & Lee, M.G. 2018. Unconventional protein secretion - new insights into the pathogenesis and therapeutic targets of human diseases. *Journal of Cell Science* 131(12): jcs213686.
- Kim, J.M., Kim, J., Kim, Y.H., Kim, K.T., Ryu, S.H., Lee, T.G. & Suh, P.G. 2013. Comparative secretome analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during osteogenesis. *J. Cell Physiol.* 228(1): 216-224.
- Launay, G., Ceres, N. & Martin, J. 2017. Non-interacting proteins may resemble interacting proteins: Prevalence and implications. *Sci. Rep.* 7(1): 40419.
- Lim, J., Eng, S.P., Yeoh, W.Y., Low, Y.W., Nur Mohd Shafwan, B.J., Ain Syahirah, B.R., Amirah, S., Faiq Bahrani, Y., Rushda Adiba, A.R., Zainul Rashid, M.R., Leong, C.F., Jose, S. & Ng, M.H. 2021. Immunomodulatory properties of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells from three anatomical segments of umbilical cord. *Sains Malaysiana* 50(6): 1715-1726.
- Lu, S., Zhang, J., Lian, X., Sun, L., Meng, K., Chen, Y., Sun, Z., Yin, X., Li, Y., Zhao, J., Wang, T., Zhang, G. & He, Q.Y. 2019. A hidden human proteome encoded by 'non-coding' genes. *Nucleic Acid Research* 47(11): 8111-8125.
- Manal, N.H., Farinawati, Y., Nur Atmaliya, L., Shahrul Hisham, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2021. Comparative evaluation of osteogenic differentiation potential of stem cells derived from dental pulp and exfoliated deciduous teeth cultured over granular hydroxyapatite based scaffold. *BMC Oral Health* 21(1): 1-13.
- Megat Abdul Wahab, R., Mohamed Rozali, N.A., Senafi, S., Zainol Abidin, I.Z., Zainal Ariffin, Z. & Zainal Ariffin, S.H. 2017. Impact of isolation method on doubling time and the quality of chondrocyte and osteoblast differentiated from murine dental pulp stem cells. *PeerJ* 5: e3180.
- Muhammad Dain, Y., Shahrul Hisham, Z.A., Sahidan, S. & Rohaya, M.A.W. 2011. Stem cell heterogeneity of mononucleated cells from murine peripheral blood: Molecular analysis. *The Scientific World Journal* 11: 2150-2159.
- Olimpio, R.M.C., De Oliveira, M., De Sibio, M.T., Moretto, F.C.F., Deprá, I.C., Mathias, L.S., Gonçalves, B.M., Rodrigues, B.M., Tilli, H.P., Coscrato, V.E., Costa, S.M.B., Mazeto, G., Fernandes, C.J.C., Zambuzzi, W.F., Saraiva, P.P., Maria, D.A. & Nogueira, C.R. 2018. Cell viability assessed in a reproducible model of human osteoblasts derived from human adipose-derived stem cells. *PLoS ONE* 13(4): e0194847.
- Orriss, I.R., Burnstock, G. & Arnett, T.R. 2010. Purinergic signalling and bone remodelling. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10(3): 322-330.

- Perrien, D.S., Akel, N.S., Edwards, P.K., Carver, A.A., Bendre, M.S., Swain, F.L., Skinner, R.A., Hogue, W.R., Nicks, K.M., Pierson, T.M., Suva, L.J. & Gaddy, D. 2007. Inhibin A is an endocrine stimulator of bone mass and strength. *Endocrinology* 148(4): 1654-1665.
- Perrien, D.S., Nicks, K.M., Liu, L., Akel, N.S., Bacon, A.W., Skinner, R.A., Swain, F.L., Aronson, J., Suva, L.J. & Gaddy, D. 2012. Inhibin enhances bone formation during distraction osteogenesis. *J. Orthop. Res.* 30(2): 288-295.
- Ponnaiyan, D. & Jegadeesan, V. 2014. Comparison of phenotype and differentiation marker gene expression profiles in human dental pulp and bone marrow mesenchymal stem cells. *European Journal of Dentistry* 8(03): 307-313.
- Rohaya, M.A.W., Manal, N.H., Nur Atmaliya, L., Farinawati, Y. & Shahrul Hisham, Z.A. 2020. 3D titanium scaffold properties and osteogenesis of stem cells. *Sains Malaysiana* 49(4): 809-816.
- Rossmann, M.P., Orkin, S.H. & Chute, J.P. 2018. Hematopoietic stem cell biology. Dlm. *Hematology: Basic Principles and Practice*, disunting oleh Hoffman, R., Benz, E., Heslop, H. & Weitz, J. Philadelphia: Elsevier. hlm. 95-110.
- Ruzanna, A.K., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W., Shabnam, K. & Sahidan, S. 2012. Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *The Scientific World Journal* 2012: 843843.
- Schmidt, J.R., Kliemt, S., Preissler, C., Moeller, S., Von Bergen, M., Hempel, U. & Kalkhof, S. 2016. Osteoblast-released matrix vesicles, regulation of activity and composition by sulfated and non-sulfated glycosaminoglycans. *Mol. Cell Proteomics* 15(2): 558-572.
- Siow, K.S., Arifah, H., Amnani, A. & Ng, P.Y. 2021. Effect of sulfur on nitrogen-containing plasma polymers in promoting osteogenic differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Sains Malaysiana* 50(1): 239-251.
- Shahrul Hisham, Z.A., Thanalethumi, M., Intan Zarina, Z.A., Zaidah, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2019. Culture and molecular markers characterization of stem cells from human deciduous (shed) and permanent (dpSC) teeth pulp. *Sains Malaysiana* 48(9): 1855-1865.
- Shamsul, B.S., Chowdhury, S.R., Ruszymah, B.H.I. & Nor Hamdan, B.M.Y. 2018. Effects of PLGA nanofiber on osteoarthritic chondrocytes. *Sains Malaysiana* 47(10): 2325-2336.
- Shanmuganatha, L., Azmi, B., Abdul, H.A.R., Nor Hazla, M.H., Sabaru, A.M. & Ruszymah, B.H.I. 2018. Role of titanium-wollastonite in promoting mesenchymal stem cells growth. *Regenerative Research* 7(1): 28-30.
- Shin, J., Rhim, J., Kwon, Y., Choi, S.Y., Shin, S., Ha, C.W. & Lee, C. 2019. Comparative analysis of differentially secreted proteins in serum-free and serum-containing media by using BONCAT and pulsed SILAC. *Sci. Rep.* 9(1): 1-2.
- Smaldone, S. & Ramirez, F. 2016. Fibrillin microfibrils in bone physiology. *Matrix Biol.* 52: 191-197.
- Tit-Oon, P., Chokchaichamnankit, D., Khongmanee, A., Sawangareetrakul, P., Svasti, J. & Srisomsap, C. 2014. Comparative secretome analysis of cholangiocarcinoma cell line in three-dimensional culture. *Int. J. Oncol.* 45(5): 2108-2116.
- Yang, Y., Huang, Y., Zhang, L. & Zhang, C. 2016. Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene expression by OSX. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 476(4): 574-579.
- Yazid, F., Luchman, N.A., Megat Abdul Wahab, R. & Zainal Ariffin, S.H. 2019. Characterization and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells and stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Sains Malaysiana* 48(7): 1483-1490.
- Yazid, M.D., Ariffin, S.H.Z., Senafi, S., Razak, M.A. & Wahab, R.M.A. 2010. Determination of the differentiation capacities of murine's primary mononucleated cells and Mc3T3-E1 cells. *Cancer Cell Int.* 10(1): 1-12.
- Zahari, N.K., Idrus, R.B.H. & Chowdhury, S.R. 2017. Laminin-coated poly(methyl methacrylate) (PMMA) nanofiber scaffold facilitates the enrichment of skeletal muscle myoblast population. *Int. J. Mol. Sci.* 18(11): 2242.
- Zhang, H., Wu, P., Chen, F., Hao, Y., Lao, Y., Ren, L., Sun, L., Sun, W., Wei, H., Chan, D.W., Jiang, Y. & He, F. 2014. SILAC-based quantitative proteomic analysis of secretome between activated and reverted hepatic stellate cells. *Proteomics* 14(17-18): 1977-1986.

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: hisham@ukm.edu.my