

Protein Rembesan Sel Stem Pulpa Gigi Susu Manusia (SHED) semasa Pembezaan kepada Sel Osteoblas

(Proteins Secretion of Human Exfoliated Deciduous Teeth Stem Cells (SHED) during Osteoblast Cell Differentiation)

SHAHRUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN^{1*}, ROHAYA MEGAT ABDUL WAHAB², THANALETCHUMI MANOGARAN¹, FARINAWATI YAZID², SITI NUR ZAHIDAH ZAHARI¹, RUS DINA RUS DIN³ & INTAN ZARINA ZAINOL ABIDIN⁴

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

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

³*Forensic Science Programme, Faculty of Health Sciences, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia*

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

Diserahkan: 26 Januari 2023/Diterima: 13 Jun 2023

ABSTRAK

Analisis protein rembesan adalah penting untuk mengenal pasti penglibatan protein di dalam sistem biologi seperti mengenal pasti fungsi dan interaksi protein serta tapak jalan yang terlibat semasa pembezaan sel stem. Kajian ini dilakukan untuk mengenal pasti protein rembesan dan tapak jalan dalam pembezaan osteoblas melalui perubahan keamatan pengekspressan protein rembesan hasil aruhan asid askorbik terhadap sel stem pulpa gigi susu (SHED). SHED dirawat dengan 10 µg/mL asid askorbik selama 7 dan 21 hari dan pengekspressan gen ditentukan melalui transkripsi berbalik-tindak balas rantaian polimerase (RT-PCR) menunjukkan pengekspressan *GAPDH* (gen *endogenous* dan kawalan), diikuti dengan pengekspressan gen *COL1* dan *BSP* (penanda osteoblas). SHED (hari ke 7 dan 21) dieram dalam medium tanpa serum selama 12 jam sebelum medium dianalisis menggunakan kromatografi cecair-spektrometri jisim/spektrometri jisim (LC-MS/MS). Protein yang sama diekspreskan dalam kawalan (positif dan negatif) serta asid askorbik seterusnya ditentukan proses biologi dan sekretom berkaitan osteoblas serta mempunyai perubahan keamatan pengekspressan melalui *UniProt* dan *PANTHER*. Hubung kait antara protein-protein rembesan ini bagi mengenal pasti tapak jalan pembezaan osteoblas ditentukan melalui *STRING*. Sebanyak 57 protein yang sama diekspreskan semasa aruhan asid askorbik dan kawalan dengan empat protein rembesan berkaitan dengan osteoblas didapati mengalami perubahan keamatan pengekspressan. Bagi hubung kait antara protein pula hanya tiga dari empat protein rembesan iaitu gelsolin (GSN), kolagenase jenis IV 72 kDa (MMP2) dan homolog peroksidasin (PXDN) dikenal pasti terlibat dalam tiga tapak jalan. Kesimpulannya, tiga jenis protein rembesan yang melibatkan tiga tapak jalan berpotensi sebagai penanda protein rembesan semasa pembezaan SHED kepada osteoblas.

Kata kunci: Asid askorbik; pembezaan osteoblas; protein rembesan; sel stem pulpa gigi susu manusia (SHED)

ABSTRACT

Analysis of secreted proteins is crucial in understanding proteins' involvement in the biological system, namely the function and interactions of the proteins and pathways involved, especially during stem cell differentiation. This study is aimed to determine the secreted proteins and pathways during osteoblast differentiation of ascorbic acid-induced exfoliated deciduous teeth stem cells (SHED) via changes in the intensity of secreted proteins' expression results. SHED was treated with 10 µg/mL ascorbic acid for 7 and 21 days, and genes expression was determined using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), which resulted in the expressed of *GAPDH* (endogenous gene and control), followed by the expression of *COL1* and *BSP* genes (osteoblast marker). SHEDS (at days 7 and 21) were incubated in a serum-free basal medium for 12 h before being analysed using liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS). Based on similar proteins expressed in controls (positive and negative)

and ascorbic acid; the biological processes and osteoblast-related secreted proteins that experienced changes in expression intensity were determined using *UniProt* and *PANTHER*. The interaction between secreted proteins was determined using *STRING* to establish pathways involved during SHED-osteoblast differentiation. A total of 57 similar proteins were identified in ascorbic acid induction and controls of which only four secreted proteins were discovered to be associated with osteoblast and experiencing changes in expression intensity. Regarding protein interaction, only three out of four proteins; gelsolin (GSN), 72 kDa type IV collagenase (MMP2), and peroxidasin homolog (PXDN) were involved in three pathways. In conclusion, the three types of secreted proteins involved in three pathways are suggested as secreted proteins markers during osteoblast differentiation of SHED.

Keywords: Ascorbic acid; osteoblast differentiation; protein secretion; stem cells from human deciduous tooth pulp (SHED)

PENDAHULUAN

Sel stem gigi susu atau gigi desidus berpotensi sebagai sumber alternatif sel stem mesenkima (MSC) yang ideal untuk digunakan dalam kejuruteraan tisu tulang. Kajian penstrukturan semula tulang pada awalnya melibatkan pendekatan graf-autologos yang merupakan pengukuran piawai klinikal dalam rawatan regenerasi tulang (Cypher & Grossman 1996). Bagaimanapun, terdapat beberapa kekurangan pada pendekatan graf-autologos seperti tulang sesuai yang terhad serta morbiditi penderma. Oleh itu, alternatif bagi strategi terapeutik klinikal yang lebih berkesan diperlukan. Pendekatan terapi sel melibatkan sel stem seperti MSC yang diasingkan daripada sumsum tulang merupakan alternatif terbaik dalam rawatan berkaitan tulang (Jaquinta et al. 2019). Justeru, banyak kajian tertumpu pada pengasingan MSC daripada sumber yang kurang invasif seperti sel stem daripada tisu pulpa gigi susu (SHED). Pengasingan SHED adalah lebih mudah dan tanpa trauma. SHED berkeupayaan untuk membahagi serta membeza kepada pelbagai jenis asalan sel matang termasuk sel osteoblas bagi mensintesis dan merembeskan matriks kolagen, di samping menggalakkan pemineralan tulang (Koh et al. 2021; Nur Atmaliya et al. 2022).

Aruhan faktor pembezaan dalam persekitaran kultur sel stem boleh mempengaruhi jenis rembesan protein hasil aktiviti aruhan pembezaan sel. Asid askorbik (AA) yang juga dikenali sebagai Vitamin C telah digunakan sebagai faktor pembezaan untuk pertumbuhan dan pembezaan sel kepada osteoblas (Shahrul Hisham et al. 2022; Siti Norhaiza et al. 2014). Kehadiran AA akan merangsang pengekspresan kolagen jenis I, diikuti dengan pengekspresan penanda osteoblas. Kehadiran hanya asid askorbik pada kultur sel stem hematopoietik menunjukkan peningkatan pada enzim alkali fosfatase (ALP), pembentukan mineral dan pengekspresan gen osteoblas (Siti Norhaiza et al.

2014). Kepekatan asid askorbik yang lebih tinggi juga boleh dijadikan faktor aruhan tunggal dalam medium osteogenik (Farinawati et al. 2022). Walau bagaimanapun, potensi asid askorbik semasa aruhan sel stem pulpa gigi susu (SHED) melibatkan perubahan pada protein rembesan masih belum dikenal pasti.

Protein rembesan merupakan rembesan sel yang mengandungi beberapa sitokin dan faktor pertumbuhan akan bekerjasama dengan komponen tisu tulang seperti sel osteoblas, osteoklas, matriks dan mineral untuk membentuk persekitaran homeostasis tulang (Han et al. 2018). Protein rembesan juga didapati berupaya mempengaruhi pembezaan sel stem mesenkima (MSC) kepada osteoblas (Katagiri et al. 2017). Ini menunjukkan protein rembesan berperanan penting dalam proses pembentukan tulang. Oleh itu, analisis protein rembesan berpotensi untuk mengenal pasti penanda protein yang terlibat dalam aruhan pembezaan osteoblas dan digunakan bagi mengenal pasti tapak jalan terapeutik yang baru untuk tujuan rawatan berkaitan tulang (Deracinois et al. 2013).

Objektif kajian adalah bagi mengenal pasti protein rembesan dan tapak jalan yang terlibat semasa pembezaan SHED kepada osteoblas. Penentuan protein rembesan hasil aruhan asid askorbik semasa pembezaan SHED dilakukan menggunakan pendekatan kromatografi cecair-spektrometri jisim/spektrometri jisim (LC-MS/MS). Kajian ini akan menyumbang kepada penentuan calon penanda protein rembesan serta tapak jalan yang terlibat semasa aruhan SHED membeza kepada osteoblas serta berpotensi untuk digunakan dalam kajian melibatkan rawatan regenerasi berkaitan tulang.

BAHAN DAN KAEDAH

PERSAMPELAN DAN KELULUSAN ETIKA

Sampel gigi susu dalam kajian ini diperoleh daripada

individu yang mendapat rawatan di Fakulti Pergigian, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur dan Pusat Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia, Cheras, Kuala Lumpur. Sebanyak tiga individu sihat (n=3) berusia 3 - 12 tahun terlibat dalam kajian ini. Persetujuan bertulis diperoleh daripada setiap ibu bapa subjek atau penjaga kanak-kanak bagi persampelan gigi susu tersebut. Kelulusan etika kajian ini diperoleh daripada Jawatankuasa Etika Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM 1.5.3.5/244/FST-2015-009).

PEMENCILAN DAN PENKULTURAN SHED

Kaedah pemencilan sel stem dilakukan dengan mengekstrak tisu pulpa gigi daripada sampel gigi susu. Sampel gigi direndam di dalam salin berpenimbal fosfat (PBS) (Gibco, USA) mengandungi larutan 1% penisilin/streptomisin (Sigma Aldrich, USA) sebelum dipotong menggunakan *bur* pergigian bagi mengasingkan tisu pulpa gigi. Tisu yang telah dicincang dicernakan di dalam kolagenase jenis I (500 CDU) (Sigma Aldrich, USA) selama 30 minit pada 37 °C. Seterusnya, aktiviti enzim kolagenase direncat menggunakan serum fetus lembu (Gibco, USA) pada 56 °C selama 30 minit diikuti dengan emparan selama 5 minit pada 400 g. Pelet yang terhasil diampai dalam DMEM-Knockout™ (Gibco, USA), 10% FBS, 1% (i/i) larutan penisilin/streptomisin dan GlutaMAX™ (Gibco, USA) dan diinkubasi pada 37 °C dan 5% (i/i) karbon dioksida (CO₂). Dalam kajian ini, pasaj 3 digunakan untuk aruhan pembezaan dan analisis protein rembesan. Ini kerana sel pada pasaj 3 mempunyai nilai populasi sel yang paling rendah (PDT; tempoh populasi berganda) dan paling tinggi mengekspreskan penanda gen sel stem (Rohaya et al. 2017; Shahrul Hisham et al. 2019).

PERLAKUAN ASID ASKORBİK TERHADAP SHED

Sebanyak 10⁴ sel/cm² SHED (pasaj 3) dikulturkan dalam medium lengkap serta diinkubasi pada suhu 37 °C dan 5% (i/i) CO₂ selama 24 jam untuk sel melekat pada permukaan kelalang. Kemudian, medium lengkap digantikan dengan medium baru yang mengandungi medium lengkap dan 10 µg/mL asid askorbik. Sel SHED pasaj 3 yang dikulturkan dalam medium pembezaan iaitu medium lengkap yang mengandungi 50 µg/mL asid askorbik dan 10 mM β-gliserofosfat pula merupakan kawalan positif. Kawalan negatif pula adalah SHED pasaj 3 yang dikulturkan dalam medium lengkap sahaja tanpa kehadiran faktor pembezaan. Kesemua sel dilakukan penukaran medium baru pada setiap tiga hari.

PENGEKSPRESAN GEN PENANDA OSTEOBLAS

Penentuan pengekspresan kehadiran penanda gen osteoblas dilakukan pada 7 dan 21 hari selepas aruhan 10 µg/mL asid askorbik menggunakan transkriptase berbalik-tindak balas rantaian polimerase (RT-PCR). RNA jumlah dari aruhan asid askorbik diasingkan menggunakan reagen TRIzol® (Invitrogen, USA) dan sebanyak 200 ng RNA jumlah digunakan semasa sintesis cDNA menggunakan *First Strand cDNA Synthesis* (PCR Biosystems, USA). Tindak balas PCR seterusnya dilakukan menggunakan templat cDNA yang telah disintesis. Kitaran suhu yang digunakan dalam tindak balas PCR adalah seperti dalam Jadual 1. Produk amplifikasi PCR seterusnya menjalani elektroforesis 1.7% (b/i) gel agarosa di dalam penimbal 1× TAE dengan pewarnaan etidium bromida bagi penentuan kehadiran jalur DNA di bawah sinaran ultra ungu serta didokumentasi sistem dokumentasi gel (Alpha Innotech, USA). Maklumat jujukan pencetus yang digunakan untuk menentukan pengekspresan osteoblas disenaraikan pada nota kaki Jadual 1.

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

Sel SHED pasaj 3 setelah 7 dan 21 hari pengkulturan diambil dan dibasuh sebanyak tiga kali menggunakan medium basal DMEM-KO. Sel seterusnya dieram di dalam medium yang sama pada 37 °C selama 12 jam di dalam inkubator 5% (i/i) CO₂. Seterusnya, sel dipindahkan ke dalam tiub yang mengandungi 1× enzim perencat protease sebelum emparan pada 1000 g, 4 °C selama 5 minit. Setelah itu, 95% etanol (1:9) dicampurkan dan dieram semalaman (-80 °C) sebelum diempar pada 4500 g pada 4 °C selama 30 minit. Pelet yang dikeringkan, diampai dengan 50 mM ammonium hidrogen karbonat dalam 8M urea dan sampel disimpan pada -80 °C.

Sebanyak 10 µL sampel ditambahkan ke dalam tiub yang mengandungi 15 µL ammonium bikarbonat (50 mM) dan 1.5 µL dithiothreitol (100 mM) dengan eraman pada suhu 60 °C selama 30 minit. Kemudian, 3 µL iodoasetamida (100 mM) ditambahkan pada sampel yang telah mencapai suhu bilik dan dieram dalam gelap selama 20 minit untuk tujuan pengalkilan protein. Sampel dicairkan menggunakan 50 mM ammonium bikarbonat diikuti pencernaan dengan 100 ng tripsin pada 37 °C, 3 jam seterusnya penambahan 100 ng tripsin lagi semalaman pada suhu 30 °C. Tiub yang mengandungi sampel seterusnya divorteks dan diempar pada kelajuan 1000 g dalam mesin pengempar vakum sehingga kering (10-15 minit) sebelum dilarutkan dalam asid formik (0.1%).

JADUAL 1. Proses amplifikasi PCR dan jujukan pencetus bagi gen *GAPDH*, *COL1* dan *BSP*

| Proses amplifikasi | Suhu (°C) | Masa (minit) | Jumlah kitaran |
|--------------------|-----------|--------------|----------------|
| Pra-penyahasilan | 95 | 2 | 1 |
| Penyahasilan | 95 | 0.5-1 | } 36 |
| Penyepuhan | Ts | 0.5-1 | |
| Pemanjangan | 72 | 1 min/kb | |
| Pemanjangan Akhir | 72 | 5 | 1 |

*Ts= Suhu penyepuhan bagi *GAPDH* [Pencetus hadapan: GCAACTAGGATGGTGTGGCT Pencetus berbalik: TCCCATTCCCCAGCTCTCATA]: 59.5°C; *COL1* [Pencetus hadapan: CAGGTACCATGACCGAGACG Pencetus berbalik: AGCACCATCATTCCACGAG]: 61.3°C; *BSP* [Pencetus hadapan: GCCTGGCACAGGTATACAG Pencetus berbalik: TGGTGTCTTCTGCATTGGCT]: 54.3°C

Sampel dimasukkan ke dalam kolom katrij Sep-Pak (Waters Corporation, USA)

untuk proses penyahgaraman sampel melalui pendekatan titisan secara perlahan diikuti dengan 1 mL asid formik (0.1%), 1 mL asetonitril (50%) dalam asid formik (0.1%). Sampel yang terkumpul dikeringkan dengan menggunakan mesin pengempar vakum dan dilarutkan dalam asid formik (0.1%) bagi analisis kromatografi cecair-spektrometri jisim/spektrometri jisim (LC-MS/MS) (Intan Zarina et al. 2022).

Setiap 2 µg sampel peptida disuntik sebanyak tiga kali ke dalam kromatografi cecair (LC) (Dionex 3000 Ultimate RSLnano, USA) yang mempunyai spektrometer jisim (MS) LTQ Orbitrap Fusion (Thermo Scientific, Bremen, Jerman) dengan aliran keluar pada kadar aliran 250 nL per minut. Pengenalpastian protein daripada LC-MS/MS dilakukan menggunakan pangkalan data *UniProt* menggunakan perisian *Thermo Scientific™ Proteome Discoverer™* versi 2.1.

ANALISIS IN SILIKO

Venny 2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) digunakan untuk mengenal pasti protein yang sama di antara sel dalam aruhan asid askorbik, kawalan positif dan kawalan negatif. Perubahan keamatan pengekspresan protein dilakukan bagi protein di antara perlakuan iaitu asid askorbik dengan kawalan positif dan negatif serta antara perlakuan asid askorbik pada 7 dan 21 hari. Taburan normal data ditentukan melalui Ujian *Shapiro-Wilk*. Diikuti dengan ujian ANOVA sehala bersama ujian *post hoc Bonferroni*, $df=2$) bagi penentuan perubahan

keamatan protein yang signifikan ($p<0.05$). Protein yang mengalami perubahan keamatan secara signifikan ($p<0.05$) dengan pengekspresan melebihi 1.5 kali ganda dianggap sebagai peningkatan atau penurunan keamatan protein.

Penentuan sekretom secara *in silico* digunakan untuk mengenal pasti rembesan protein di dalam medium menggunakan tiga jenis perisian dengan menepati salah satu kriteria iaitu skor >0.450 (*SignalP 5.0*), skor NN >0.600 (*SecretomeP 2.0a*) atau skor >18.000 (*TMHMM v. 2.0*). Ini diikuti dengan melibatkan dua pangkalan data iaitu *Universal Protein Resources (UniProt; www.uniprot.org)* serta *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER; www.pantherdb.org)* bagi penentuan proses biologi berkaitan dengan pembezaan osteoblas. Pangkalan data *STRING* pula digunakan bagi menentukan ramalan jaringan protein-protein sekretom dengan skor interaksi pada tahap keyakinan sederhana (0.400-1.000). Sekretom serta protein-protein lain yang terlibat dalam jaringan diwakili oleh nod bulat dengan nama gen masing-masing.

HASIL DAN PERBINCANGAN

PENANDA GEN BAGI OSTEOBLAS SEMASA ARUHAN ASID ASKORBIK

Sel stem pulpa gigi susu (SHED) mengalami pembezaan osteoblas dengan kehadiran 10 µg/mL asid askorbik seperti semasa aruhan pada kawalan positif (Intan Zarina

et al. 2022). Maka, kepekatan 10 µg/mL asid askorbik dipilih untuk analisis protein rembesan dalam kajian ini. Pengekspresan penanda molekul osteoblas dalam kajian ini ditentukan menggunakan pendekatan transkripsi berbalik-tindak balas rantaian polimerase (RT-PCR). Penanda sel stem yang digunakan melibatkan pencirian molekul bagi sel SHED yang diasingkan telah dilakukan sebelum ini melibatkan pencirian pengeksresan gen *cKIT*⁺, *CD29*⁺, *CD73*⁺, *CD105*⁺, *CD146*⁺, *CD11b*⁻, *CD34*⁻ dan *CD45*⁻ oleh Shahrul Hisham et al. (2019). Populasi sel dan pasaj yang sama hasil pencirian pengeksresan gen-gen ini digunakan untuk kajian ini. Profil pengeksresan gen osteoblas oleh SHED hasil aruhan 10 µg/mL asid askorbik mendapati berlakunya pengeksresan gen kawalan *endogenous GAPDH* manakala *COL1* dan *BSP* pula sebagai penanda gen osteoblas pada 7 dan 21 hari aruhan (Rajah 1).

Pulpa gigi terdiri daripada tisu penghubung, terutamanya kolagen. Gentian kolagen ini disintesis dan dirembeskan terutamanya oleh sel fibroblas atau sel pulpa yang tidak membeza. Gen *COL1* merupakan gen yang mengekod dan menghasilkan rantaian kolagen jenis 1 semasa pembentukan struktur heliks kolagen ganda tiga. Dalam kajian ini, gen *COL1* didapati diekspreskan di dalam semua medium termasuk kawalan negatif (Rajah 1). Ini kerana SHED sentiasa mengekspreskan kolagen jenis 1 semasa pembentukan gigi secara berterusan (Chen et al. 2016). Penghasilan kolagen jenis 1 secara berterusan akan meningkatkan kepekatan fosfat dalam kultur sel. Interaksi sel stem dengan kolagen jenis 1 melalui integrin $\alpha 2\beta 1$ akan mengekspreskan gen *OCN* dan meningkatkan kadar pembezaan osteoblas (Jafary, Hanachi & Gorjipour 2017).

Gen *BSP* pula merupakan gen yang mengekspreskan protein sialoprotein tulang yang terlibat dalam pembentukan hidroksiapatit semasa proses pembentukan tulang (Farshdousti Hagh et al. 2015). Gen *BSP* didapati terlibat pada fasa awal hingga akhir proses pembentukan tulang. Ini kerana, sialoprotein tulang perlu mengikat matriks berkolagen bagi meningkatkan kekuatan mekanikal tulang (Kruger, Miller & Wang 2013). Kajian terhadap sel stem adipos mendapati berlakunya pengeksresan gen *BSP* sewaktu aruhan membentuk osteoblas (Olimpio et al. 2018). Pengeksresan gen *BSP* dalam kajian ini (Rajah 1) telah mendapati asid askorbik pada kepekatan 10 µg/mL berupaya mengaruh SHED untuk membentuk sel osteoblas sama seperti semasa dibawah aruhan kawalan positif.

PROFIL PROTEIN SHED SEMASA RAWATAN ASID ASKORBIK

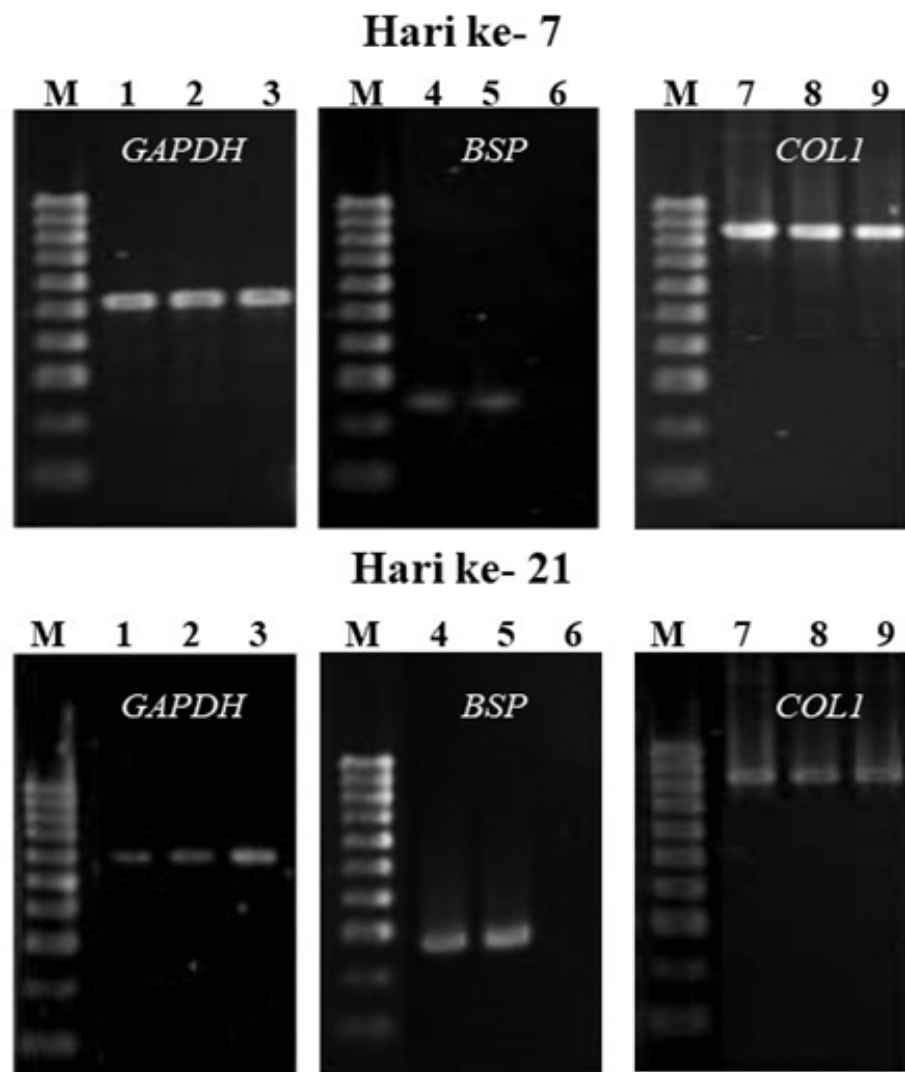
Tiga sampel (n=3) telah digunakan bagi setiap kumpulan untuk mengenal pasti perubahan dinamik pada kandungan rembesan sel yang dipengaruhi oleh pembahagian sel serta perkembangannya, maka analisis protein rembesan dilakukan (Shin et al. 2019). Sebanyak ~280-430 protein telah dikenal pasti pada SHED melibatkan hari aruhan yang berbeza. Kajian terhadap sel BMMSC mendapati hampir 200 protein diekspreskan selepas aruhan sel untuk membentuk osteoblas (Choi et al. 2010). Rembesan protein oleh sel berlaku pada kuantiti yang sedikit akan menyebabkan pengesanan menjadi sukar. Oleh itu, analisis penentuan protein rembesan melalui pendekatan LC-MS/MS sering menghasilkan bilangan protein yang rendah (Chevallet et al. 2007).

Analisis seterusnya mendapati sebanyak 57 protein yang sama terlibat pada kesemua tiga kumpulan perlakuan (Jadual 2). Majoriti protein yang diekspreskan tidak dapat melaksanakan fungsinya secara bersendirian menyebabkan analisis terhadap pengeksresan protein sama bagi sesuatu perlakuan adalah penting. Dalam sesuatu proses biologi, interaksi antara protein sering berlaku (Launay, Ceres & Martin 2017) menyebabkan penentuan penglibatan protein yang sama perlu diketahui terlebih dahulu sebelum pengenalanpastian proses biologi.

Untuk mendapatkan gambaran kasar tentang protein yang ditemui dalam medium basal, pemerhatian dilakukan ke atas tiga kumpulan perlakuan terhadap SHED. Setiap kumpulan mengandungi pemerhatian pada hari ke 7 dan 21. Jadual 2 menunjukkan sebanyak 229 protein sama didapati terlibat semasa perlakuan asid askorbik, 261 protein sama semasa kawalan positif dan 237 protein sama bagi kawalan negatif (Jadual 2).

PROSES BIOLOGI SHED SEMASA ARUHAN ASID ASKORBIK

Setiap protein dalam sesuatu proses biologi adalah molekul yang mewakili peranan fisiologi masing-masing. Kefahaman terhadap susunan protein yang terlibat akan memberikan kefahaman terhadap kekompleksan jaringan interaksi protein-protein rembesan yang terlibat (Dalmer & Clugston 2019). Sebanyak 57 protein sama telah dirembeskan ke dalam medium melibatkan kesemua tiga perlakuan bagi SHED (Jadual 2). Walau bagaimanapun, daripada 57 protein sama yang diekspreskan hanya 43 protein sahaja berserta proses



GAPDH⁺ (~532 pb) merupakan kawalan positif gen *endogenous* manakala *COL1*⁺ (~847 pb) dan *BSP*⁺ (~287 pb) diekspreskan pada hari ke 7 dan 21 sebagai gen penanda pembezaan osteoblas dalam perlakuan asid askorbik. M: penanda 100 pasang bes (pb); Lajur 1, 4 dan 7: sel dalam medium perlakuan 10 µg/mL asid askorbik; Lajur 2, 5 dan 8: kawalan positif (50 µg/mL asid askorbik dan 10 mM β-gliserofosfat); Lajur 3, 6 dan 9: kawalan negatif (tanpa asid askorbik)

RAJAH 1. Pengekspresan penanda gen osteoblas bagi SHED pada aruhan hari ke 7 dan 21

biologi masing-masing terdapat di dalam pangkalan data *UniProt* dan *PANTHER*.

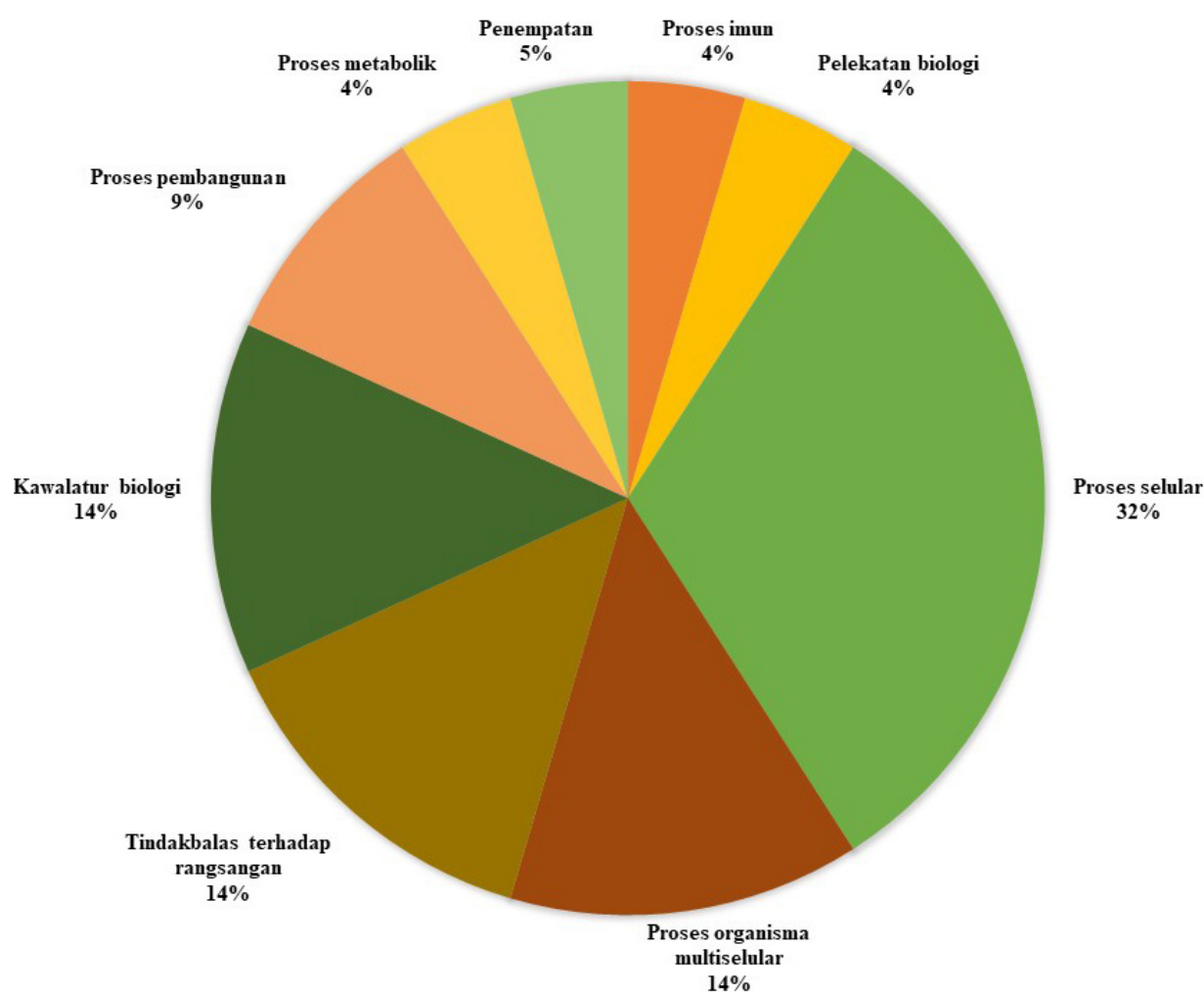
Sebanyak 32% protein yang terlibat merupakan protein yang dikaitkan dengan proses sel seperti pembentukan sitorangka dan rembesan faktor pertumbuhan serta komponen matriks ekstrasel (Rajah 2). Komponen-komponen ini didapati terlibat semasa proses pembahagian sel dan pembentukan sel stem kepada sel matang (Gattazzo, Urciuolo & Bonaldo 2014).

Selain itu, 14% protein terlibat dengan proses organisma multisel (Rajah 2) yang merujuk kepada rembesan pelbagai organisma multisel dalam menghasilkan bahan organik seperti kolagen dan faktor pertumbuhan. Kajian *in vivo* oleh Deng et al. (2017) mendapati kedua-dua bahan ini terlibat secara langsung dalam proses penyembuhan luka. Sembilan daripada 22 proses biologi (Rajah 2) yang terdapat dalam pangkalan data *PANTHER* telah dikaitkan dengan 43 protein (Jadual 2) yang dikenal

JADUAL 2. Taburan protein rembesan SHED semasa aruhan

| Aruhan | Bilangan protein (Hari) | Bilangan protein sama | | Pangkalan data <i>PANTHER</i> |
|-----------------|-------------------------|---------------------------------|--------|-------------------------------|
| | | Hari 7 & 21 (Peratus persamaan) | Aruhan | |
| AA | 295 (7) | 229 (58.4%) | | |
| Kawalan Positif | 326 (21) | 261 (51.9%) | 57 | 43 |
| Kawalan Negatif | 284 (7) | 237 (63.0%) | | |
| | 329 (21) | | | |

AA; medium basal dan 10 µg/mL askorbik asid, Kawalan Positif; medium basal, 50 µg/mL askorbik asid dan 10 mM β-gliserofosfat dan Kawalan Negatif; medium basal sahaja



Pangkalan data *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER)* menunjukkan 43 protein melibatkan 9 proses biologi dimana majoriti protein terlibat adalah dalam proses sel (32%) dan proses organisma multisel (14.0%)

RAJAH 2. Proses biologi protein rembesan SHED semasa aruhan asid askorbik

pasti pada medium basal SHED. Analisis medium eraman sel stem folikel gigi hasil kajian Dou et al. (2017) mendapati majoriti protein terlibat dalam proses sel, proses metabolik, kawal atur biologi, proses pembangunan dan tindak balas terhadap aruhan (Dou et al. 2017). Kesemua proses biologi ini juga turut terdapat pada kajian ini.

PERUBAHAN KEAMATAN PENGEKSPRESAN PROTEIN SHED SEMASA ARUHAN ASID ASKORBİK

Analisis perubahan keamatan pengekspresan protein dibandingkan antara perlakuan dan semua kawalan dilakukan bagi memahami kekompleksan sistem biologi semasa proses pembentukan tulang. Sebanyak lapan protein bagi SHED didapati mengalami pengekspresan perubahan keamatan yang signifikan ($p < 0.05$).

Bagi menentukan protein dalam medium basal DMEM-KO hanya protein daripada hasil rembesan sel atau protein sekretom serta tidak daripada komponen sel lisis yang terlibat, kesemua lapan protein menjalani tapisan seterusnya melibatkan perisian *SignalP 5.0*, *SecretomeP 2.0a* dan *TMHMM v. 2.0*. Perisian *SignalP 5.0* merupakan tapisan jenis protein sekretom melalui tapak jalan klasik. Bagi perisian *SecretomeP 2.0a* pula perisian menentukan jenis protein sekretom tapak jalan bukan klasik manakala perisian *TMHMM v2.0* pula meramal jujukan protein heliks transmembran (Chang et al. 2013).

Hasil tapisan ketiga-tiga perisian ini, hanya enam daripada lapan protein SHED (Jadual 3) diramal merupakan protein sekretom iaitu gelsolin (GSN), profilin-1 (PFN1), kolagenase jenis IV 72 kDa (MMP2), folistatin (FST), filamin-C (FLNC) dan peroksidasin homolog (PXDN). Empat sekretom SHED yang dirembeskan melalui tapak jalan klasik iaitu GSN, MMP2, FST dan PXDN. Manakala, dua sekretom dirembeskan melalui tapak jalan bukan klasik iaitu PFN1 dan FLNC; satu sekretom heliks transmembran iaitu PXDN (Jadual 3).

Kajian oleh Kim et al. (2013) terhadap sel BMMSC mendapati sebanyak 33% dan 25% daripada populasi keseluruhan protein yang berjaya dikesan masing-masing adalah daripada tapak jalan klasik dan bukan klasik. Kebanyakan protein sekretom yang dihasilkan dan ditapis oleh perisian *SignalP 5* adalah untuk tapak jalan klasik yang mempunyai isyarat peptida melibatkan penghasilan protein pra-translasi oleh ribosom untuk ke Jasad Golgi dan dirembeskan oleh sel secara eksositosis (Brandizzi & Barlowe 2013). Bagi protein yang tiada

isyarat peptida, protein ini akan dirembes oleh sel melalui tapak jalan bukan klasik (*SecretomeP 2.0a*) tanpa Jasad Golgi menggunakan mekanisme pengangkutan yang belum dikenal pasti lagi (Kim, Gee & Lee 2018). Di samping itu, sekretom PXDN telah diramal mempunyai struktur transmembran (TM) oleh *TMHMM v2.0* (Jadual 3). Struktur TM terikat separa atau sepenuhnya pada membran sel berguna dalam meramalkan struktur dan fungsi protein (Baker et al. 2017). Pada kajian ini, sebanyak enam daripada lapan protein yang mengalami perubahan keamatan pengekspresan (Rajah 3) adalah melibatkan protein sekretom.

PENENTUAN PROTEIN SEKRETOM BERKAITAN OSTEOLAS SEMASA PERLUKUAN ASID ASKORBİK

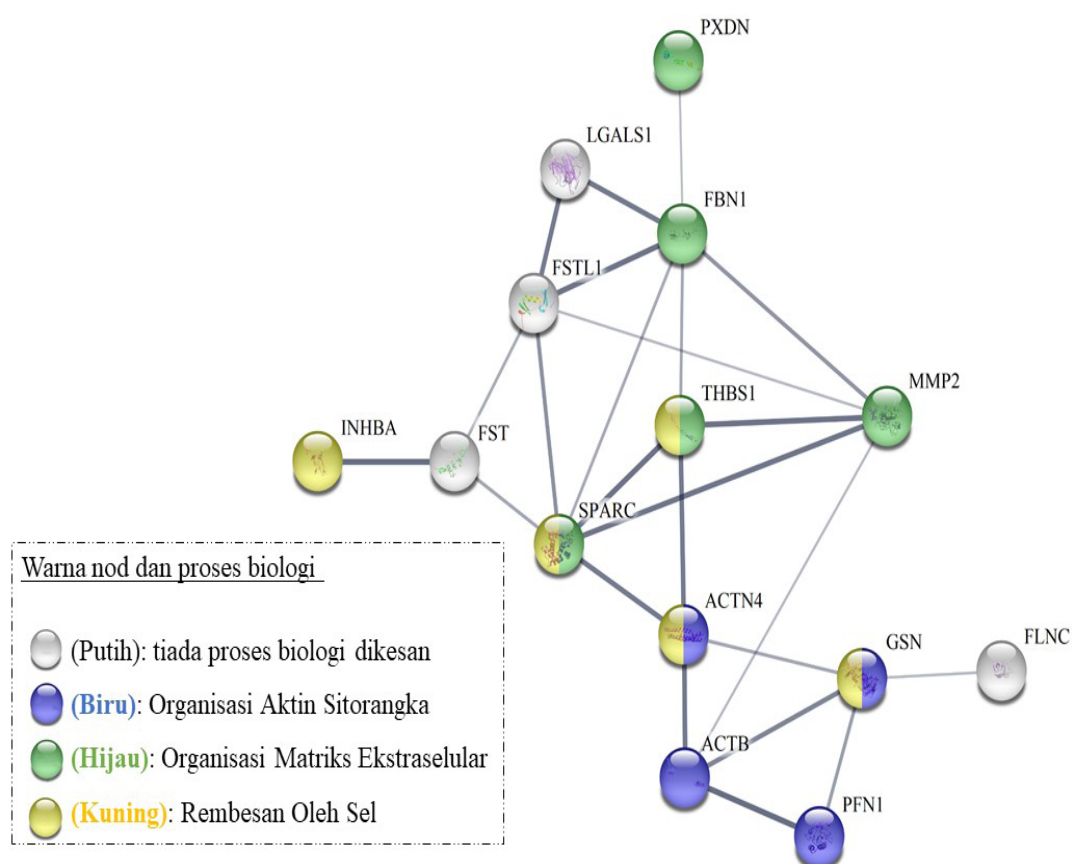
Sebanyak empat proses biologi dijadikan kriteria dalam pemilihan protein sekretom berkaitan osteoblas selepas menjalani tapisan protein sekretom iaitu pembezaan sel, pembangunan sistem rangka dan ikatan ion kalsium (Schmidt et al. 2016) serta organisasi matriks ekstrasel (Kim et al. 2013). Jadual 4 menunjukkan hanya enam protein sekretom yang terlibat dalam perubahan keamatan pengekspresan serta terlibat dalam salah satu kriteria proses biologi yang telah ditentukan. Penentuan proses biologi bagi setiap protein sekretom ini diperolehi daripada pangkalan data *UniProt* dan *PANTHER*. GSN, FST dan PXDN mengalami perubahan keamatan pengekspresan semasa rawatan asid askorbik selama 7 dan 21 hari berbanding kawalan negatif. GSN dan MMP2 pula mempunyai perubahan keamatan semasa rawatan asid askorbik selama 7 hari berbanding 21 hari. Kesimpulannya, sebanyak empat sekretom berkaitan osteoblas dikenal pasti bagi SHED, iaitu GSN, MMP2, FST dan PXDN (Jadual 4).

Kajian oleh Choi et al. (2010) mendapati semasa sel BMMSC diaruh membentuk sel osteoblas, berlakunya perubahan keamatan terhadap protein sekretom namun kajiannya melibatkan hasil gabungan asid askorbik dan β -gliserofosfat. Kajian terdahulu melaporkan asid askorbik sahaja berupaya mengaruh pengekspresan aktiviti enzim ALP, proses pemineralan tulang dan gen berkaitan osteoblas secara *in vitro* (Intan Zarina et al. 2023; Shahrul Hisham et al. 2022; Siti Norhaiza et al. 2014). Asid askorbik turut menunjukkan peningkatan viabiliti sel dan potensi osteogenik yang lebih baik dalam kajian teknologi perancah sel (Shotorbani et al. 2018). Kajian ini juga menunjukkan aruhan terhadap SHED dengan hanya kehadiran asid askorbik berupaya menentukan protein sekretom berkaitan pembezaan osteoblas.

JADUAL 3. Ramalan pengenalpastian protein sekretom bagi SHED

| No | No Aksesan | Protein (Nama Gen) | <i>SignalP</i> ^{a)} | <i>SecretomeP</i> ^{b)} | <i>TMHMM</i> ^{c)} | Sekretom |
|----|------------|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------|
| 1 | P06396 | Gelsolin (GSN) | 0.844 | 0.553 | 5.987860 | ✓ |
| 2 | P06733 | Alfa-enolase (ENO1) | 0.001 | 0.268 | 0.00289 | ✗ |
| 3 | P07737 | Profilin-1 (PFN1) | 0.002 | 0.898 | 0.30853 | ✓ |
| 4 | P08253 | Kolagenase jenis IV 72 kDa (MMP2) | 0.991 | 0.514 | 2.035440 | ✓ |
| 5 | P19883 | Folistatin (FST) | 0.999 | 0.493 | 0.026620 | ✓ |
| 6 | P60709 | Aktin sitoplasmik 1 (ACTB) | 0.001 | 0.067 | 0.002460 | ✗ |
| 7 | Q14315 | Filamin-C (FLNC) | 0.004 | 0.915 | 1.672860 | ✓ |
| 8 | Q92626 | Homolog peroksidasin (PXDN) | 0.964 | 0.168 | 19.21809 | ✓ |

Protein sekretom jika memenuhi salah satu kriteria ramalan samada *SignalP* atau *SecretomeP* atau *TMHMM* v2.0. ^{a)} *SignalP* 5.0; Protein dirembeskan melalui tapak jalan klasik jika skor-D melebihi 0.450 (diwakili oleh **fon tebal**).^{b)} *SecretomeP* 2.0a; Protein yang mempunyai skor N-N melebihi 0.600 dianggap telah dirembeskan melalui tapak jalan bukan klasik (diwakili oleh **fon tebal**).^{c)} *TMHMM* v2.0; Protein diramal sebagai protein plasma apabila bilangan asid amino pada heliks transmembran melebihi 18.000 (diwakili oleh **fon tebal**)



Berdasarkan pangkalan data *Search Tools for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING)*, setiap sekretom diwakili oleh nod dan nama gen masing-masing. Warna nod mewakili proses biologi tertentu. Hubungan 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 3. Jaringan hubung kait sekretom berkaitan osteoblas bagi SHED

HUBUNG KAIT ANTARA SEKRETOM DAN TAPAK JALAN
Selain daripada proses biologi serta perubahan keamatan pengekspresan, hubung kait antara protein sekretom berpotensi untuk memberikan maklumat yang signifikan tentang perlakuan asid askorbik dalam pembezaan osteoblas. Kesemua empat protein sekretom berkaitan osteoblas bagi SHED didapati tersenarai dalam *STRING*. Hubung kait antara protein-protein sekretom yang dianalisis mendapati sejumlah sepuluh protein lain ditambah bagi SHED untuk melengkapkan jaringan hubung kait. Semua sekretom diwakili oleh simbol gen masing-masing. Setiap hubungan di antara protein menunjukkan nilai $p < 2.66 \times 10^{-15}$ sebagai protein yang signifikan (Rajah 4). Hubungan berfungsi pula telah diramalkan bagi semua sekretom berkaitan osteoblas hasil rawatan asid askorbik pada SHED (Rajah 3).

Oleh itu, cadangan tapak jalan bagi SHED telah ditunjukkan dalam Rajah 3. Tapak jalan yang telah ditentukan dalam kajian ini menunjukkan penglibatan protein sekretom secara berkumpulan dalam suatu proses biologi. Walaupun semua empat protein sekretom

tersenarai dalam *STRING*, hanya tiga protein rembesan iaitu GSN, MMP2 dan PXDN dicadangkan terlibat dalam tiga tapak jalan (Jadual 5). Ketiga-tiga tapak jalan adalah signifikan (kadar penemuan palsu (FDR) dan nilai $p < 0.05$ *Bonferroni-corrected*) bagi SHED. Tapak-tapak jalan yang terlibat adalah Organisasi Aktin Sitorangka, Organisasi Matriks Ekstrasel dan Rembesan (Rajah 3). Dua tapak jalan berbeza bagi SHED menunjukkan kehadiran tapak jalan khusus kepada jenis sel dan meningkatkan kejituan ramalan interaksi sekretom (Lopes et al. 2011; Szklarczyk et al. 2018).

CALON PENANDA PROTEIN REMBESAN BERDASARKAN PERUBAHAN KEAMATAN PENGEKSPRESAN DAN *STRING*
Perubahan keamatan pengekspresan ditunjukkan bagi empat sekretom berkaitan osteoblas bagi SHED. Namun daripada *STRING*, hanya tiga protein rembesan SHED iaitu GSN, MMP2 dan PXDN dicadangkan terlibat dalam tiga tapak jalan (Jadual 5). GSN merupakan protein sitorangka dan vesikel matriks yang ditemui pada matriks

JADUAL 4. Perubahan keamatan protein SHED sewaktu pembezaan osteoblas

| No Rujukan (Protein Sekretom: Gen) | Proses biologi | Pengekspresan hari 7 | | Pengekspresan hari 21 | | Pengekspresan AA hari 7 dan 21 |
|---|------------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------------------|
| | | Vit C & -ve | Vit C & +ve | Vit C & -ve | Vit C & +ve | |
| P06396 (Gelsolin: GSN) | Ikatan ion kalsium | m | ↓ | ↑ | ↓ | ↓ |
| P08253 (Kolagenase jenis IV 72 kDa: MMP2) | Organisasi matriks ekstrasel | m | m | m | ↓ | ↓ |
| P19883 (Folistatin: FST) | Pembezaan sel | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | m |
| Q92626 (Homolog peroksidasin: PXDN) | Organisasi matriks ekstrasel | m | m | ↓ | m | m |

*Vit C: Asid Askorbik; +ve: Kawalan Positif; -ve: Kawalan Negatif, ↑: Pengekspresan meningkat, ↓: Pengekspresan menurun dan m: Pengekspresan sama

JADUAL 5. Tapak jalan protein sekretom SHED semasa pembezaan osteoblas

| Gen yang padan dalam jaringan interaksi | Tapak jalan |
|--|---|
| ACTB,ACTN4, GSN ,PFN1 | Organisasi aktin sitorangka (GO:0030036) |
| FBN1, MMP2 , PXDN ,SPARC,THBS1 | Organisasi matriks ekstrasel (GO:0030198) |
| ACTN4, GSN ,INHBA,SPARC,THBS1 | Rembesan oleh sel (GO:0032940) |

Fon tebal mewakili protein sekretom dan perubahan keamatan pengekspresan serta tersenarai dalam pengkalan data *STRING*

ekstrasel osteoblas (Thouverey et al. 2011; Xiao et al. 2007). Ia menjadi aktif apabila mengikat pada ion kalsium (Nag et al. 2013). Sementara itu, MMP2 merupakan enzim peleraai struktur kolagen sewaktu pemodelan matriks ekstrasel tulang (Liang et al. 2016). Kekurangan enzim MMP2 didapati merendahkan ketumpatan mineral dan kualiti tulang trabekular dalam kajian *in vivo* ke atas mencit (Madsen et al. 2013). Selain itu, PXDN diekspreskan oleh sel osteoblas bagi fungsi pemulihan tisu (Péterfi et al. 2009; Romanello et al. 2014). Ia dirembes dan dimendapkan sebagai jaringan fibril untuk meningkatkan kekuatan matriks ekstrasel (Péterfi et al. 2009).

Semua penemuan terdahulu mengukuhkan lagi peranan GSN, MMP2 dan PXDN bagi SHED dalam pelbagai aspek penting ketika pembezaan osteoblas seperti pembentukan matriks ekstrasel, pemineralan ion kalsium dan pemodelan semula tulang. Kesemua tiga protein rembesan dalam kajian ini melibatkan aruhan hanya 10 µg/mL asid askorbik sahaja. Oleh itu, asid askorbik sahaja berupaya mengaruh penanda protein rembesan berkaitan osteoblas. Maka, GSN, MMP2 dan PXDN berpotensi untuk digunakan sebagai penanda protein rembesan SHED semasa pembezaan osteoblas dalam asid askorbik. Penanda protein rembesan yang dicadangkan berpotensi untuk digunakan dalam kajian regenerasi melibatkan penyakit berkaitan tulang.

KESIMPULAN

Aruhan asid askorbik terhadap SHED berupaya menghasilkan pengekspresan gen osteoblas iaitu *BSP* dan *COL1* pada 7 dan 21 hari. Daripada analisis jaringan *STRING* bagi SHED, tiga protein rembesan berkaitan osteoblas iaitu GSN, MMP2 dan PXDN didapati berinteraksi dalam tiga tapak jalan semasa perlakuan asid askorbik iaitu Organisasi Aktin Sitorangka, Organisasi Matriks Ekstrasel dan Rembesan. Kesemua tiga protein rembesan terlibat sebagai penanda osteoblas dan asid askorbik berpotensi menghasilkan penanda protein rembesan SHED berkaitan osteoblas.

PENGHARGAAN

Penghargaan diberikan kepada pembiayaan kewangan kajian ini iaitu geran penyelidikan GUP-2017-002 daripada Universiti Kebangsaan Malaysia dan geran penyelidikan CRG/01/01/2018 dari University of Cyberjaya.

RUJUKAN

- Baker, J.A., Wong, W.C., Eisenhaber, B., Warwicker, J. & Eisenhaber, F. 2017. Charged residues next to transmembrane regions revisited: “positive-inside rule” is complemented by the “negative inside depletion/outside enrichment rule”. *BMC Biol.* 15(1): 66. doi:10.1186/s12915-017-0404-4
- Brandizzi, F. & Barlowe, C. 2013. Organization of the Er-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14(6): 382-392. doi:10.1038/nrm3588
- 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. doi:10.1002/elps.201300126
- Chen, Y.Y., He, S.T., Yan, F.H., Zhou, P.F., Luo, K., Zhang, Y.D., Xiao, Y. & Lin, M.K. 2016. Dental pulp stem cells express tendon markers under mechanical loading and are a potential cell source for tissue engineering of tendon-like tissue. *International Journal of Oral Sciences* 8(4): 213-222. doi:10.1038/ijos.2016.33
- 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. doi:10.1002/pmic.200601024
- 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. doi:10.1021/pr901110q
- Cypher, T.J. & Grossman, J.P. 1996. Biological principles of bone graft healing. *J. Foot Ankle Surg.* 35(5): 413-417. doi: 10.1016/s1067-2516(96)80061-5
- Dalmer, T.R.A. & Clugston, R.D. 2019. Gene ontology enrichment analysis of congenital diaphragmatic hernia-associated genes. *Pediatr. Res.* 85(1): 13-19. doi:10.1038/s41390-018-0192-8
- 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. doi:10.1111/wrr.12602
- Deracinois, B., Flahaut, C., Duban-Deweere, S. & Karamanos, Y. 2013. Comparative and quantitative global proteomics approaches: An overview. *Proteomes* 1(3): 180-218. doi:10.3390/proteomes1030180
- 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. doi:10.1038/s41598-017-07467-3
- Farinawati, Y., Ng, W.C., Nur Atmaliya, L., Shahrul Hisham, Z.A. & Rohaya, M.A.W. 2022. Higher concentration of ascorbic acid as a sole induction factor for osteogenesis on MC3T3-E1 cell model. *Sains Malaysiana* 51(5): 1449-1464. doi:10.17576/jsm-2022-5105-15

- 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. doi:10.22074/cellj.2015.513
- 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. doi:10.1016/j.bbagen.2014.01.010
- 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. doi:10.1038/s41413-018-0019-6
- Iaquinta, M.R., Mazzoni, E., Bononi, I., Rotondo, J.C., Mazziotta, C., Montesi, M., Sprio, S., Tampieri, A., Tognon, M. & Martini, F. 2019. Adult stem cells for bone regeneration and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 268. doi:10.3389/fcell.2019.00268
- Intan Zarina, Z.A., Manogaran, T., Rohaya, M.A.W., Saiful Anuar, K., Muhammad Dain, Y., Farinawati, Y., Zaidah, Z.A., Anis Nabilah, J. & Shahrul Hisham, Z.A. 2023. Label-free quantitative proteomic analysis of differential expressed osteoblast-related proteins in dental pulp stem cells from deciduous and permanent teeth. *Current Stem Cell Research and Therapy* 18(3): 417-428. doi:10.2174/1574888X17666220627145424
- Intan Zarina, Z.A., Manogaran, T., Rohaya, M.A.W., Farinawati, Y. & Shahrul Hisham, Z.A. 2022. A comparative analysis of ascorbic acid-induced cytotoxicity and differentiation between SHED and DPSC. *Current Stem Cell Research and Therapy* 17(6): 576-588. doi:10.2174/1574888X17666220124141310
- Jafary, F., Hanachi, P. & Gorjipour, K. 2017. Osteoblast differentiation on collagen scaffold with immobilized alkaline phosphatase. *International Journal of Organ Transplantation Medicine* 8(4): 195-202.
- 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. doi:10.1111/cpr.12333
- 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. doi:10.1002/jcp.24123
- 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. doi:10.1242/jcs.213686
- Koh, B., Nadiyah, S., Sharifah Nursyazwani Shahirah, W.I., Roszalina, R., Siti Salmiah, M.Y., Ruzzymah, B.H.I., Shahrul Hisham, Z.A., Rohaya, M.A.W. & Muhammad Dain, Y. 2021. Mesenchymal stem cells: A comprehensive methods for odontoblastic induction. *Biological Procedure Online* 23(1): 1-13. doi:10.1186/s12575-021-00155-7
- Kruger, T.E., Miller, A.H. & Wang, J. 2013. Collagen scaffolds in bone sialoprotein-mediated bone regeneration. *The Scientific World Journal* 2013: Article ID. 812718: 6. doi:10.1155/2013/812718
- Launay, G., Ceres, N. & Martin, J. 2017. Non-interacting proteins may resemble interacting proteins: Prevalence and implications. *Sci. Rep.* 7(1): 40419. doi:10.1038/srep40419
- Liang, H.P.H., Xu, J., Xue, M. & Jackson, C.J. 2016. Matrix metalloproteinases in bone development and pathology: Current knowledge and potential clinical utility. *Metalloproteinases in Medicine* 3: 93-102. doi:10.2147/MNM.S92187
- Lopes, T.J.S., Schaefer, M., Shoemaker, J., Matsuoka, Y., Fontaine, J.F., Neumann, G., Andrade-Navarro, M.A., Kawaoka, Y. & Kitano, H. 2011. Tissue-specific subnetworks and characteristics of publicly available human protein interaction databases. *Bioinformatics* 27(17): 2414-2421. doi:10.1093/bioinformatics/btr414
- Madsen, D.H., Jurgensen, H.J., Ingvarsen, S., Melander, M.C., Albrechtsen, R., Hald, A., Holmbeck, K., Bugge, T.H., Behrendt, N. & Engelholm, L.H. 2013. Differential actions of the endocytic collagen receptor uPARAP/Endo180 and the collagenase MMP-2 in bone homeostasis. *PLoS ONE* 8(8): e71261. doi:10.1371/journal.pone.0071261
- Nag, S., Larsson, M., Robinson, R.C. & Burtneck, L.D. 2013. Gelsolin: The tail of a molecular gymnast. *Cytoskeleton (Hoboken)* 70(7): 360-384. doi:10.1002/cm.21117
- Nur Atmaliya, L., Rohaya, M.A.W., Shahrul Hisham, Z.A., Nurrul Shaqinah, N., Seng, F.L. & Farinawati, Y. 2022. Comparison between hydroxyapatite and polycaprolactone in inducing osteogenic differentiation and augmenting maxillary bone regeneration in rats. *PeerJ* 10: e13356. doi:10.7717/peerj.13356
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0194847
- Péterfi, Z., Donkó, A., Orient, A., Sum, A., Prókai, A., Molnár, B., Veréb, Z., Rajnavölgyi, E., Kovács, K.J., Müller, V., Szabó, A.J. & Geiszt, M. 2009. Peroxidase is secreted and incorporated into the extracellular matrix of myofibroblasts and fibrotic kidney. *Am. J. Pathol.* 175(2): 725-735. doi:10.2353/ajpath.2009.080693
- Rohaya, M.A.W., Nur Akmal, M.R., Sahidan, S., Intan Zarina, Z.A., Zaidah, Z.A. & Shahrul Hisham, Z.A. 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. doi:10.7717/peerj.3180
- Romanello, M., Piatkowska, E., Antoniali, G., Cesaratto, L., Vascotto, C., Iozzo, R.V., Delneri, D. & Brancia, F.L. 2014. Osteoblastic cell secretome: A novel role for progranulin during risedronate treatment. *Bone* 58: 81-91. doi:10.1016/j.bone.2013.10.003

- 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. doi:10.1074/mcp.M115.049718
- Shahrul Hisham, Z.A., Manogaran, T., Rohaya, M.A.W., Saiful Anuar, K., Intan Zarina, Z.A., Farinawati, Y., Muhammad Dain, Y. & Zaidah, Z.A. 2022. Profil protein sekretom sel stem pulpa gigi manusia semasa aruhan asid askorbik. *Sains Malaysiana* 51(7): 2173-2186. doi:10.17576/jsm-2022-5107-19
- Shahrul Hisham, Z.A., Thanalechumi, 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. doi:10.17576/jsm-2019-4809-06
- 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. doi:10.1038/s41598-019-39650-z
- Shotorbani, B.B., André, H., Barzegar, A., Zarghami, N., Salehi, R. & Alizadeh, E. 2018. Cell sheet biofabrication by co-administration of mesenchymal stem cells secretome and vitamin C on thermoresponsive polymer. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 29(11): 170. doi:10.1007/s10856-018-6180-z
- Siti Norhaiza, H., Siti Norsaidah, I., Rohaya, M.A.W., Intan Zarina, Z.A., Sahidan, S., Zaidah, Z.A., Mohamad, A.R. & Shahrul Hisham, Z.A. 2014. Ascorbic acid induces osteoblast differentiation of human suspension mononuclear cells. *Cytotherapy* 16(5): 674-682. doi:10.1016/j.jcyt.2013.07.013
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J. & von Mering, C. 2018. String V11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 47(D1): D607-D613. doi:10.1093/nar/gky1131
- Thouverey, C., Malinowska, A., Balcerzak, M., Strzelecka-Kiliszek, A., Buchet, R., Dadlez, M. & Pikula, S. 2011. Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells. *J. Proteomics* 74(7): 1123-1134. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.005
- Xiao, Z., Camalier, C.E., Nagashima, K., Chan, K.C., Lucas, D.A., De La Cruz, M.J., Gignac, M., Lockett, S., Issaq, H.J., Veenstra, T.D., Conrads, T.P. & Beck, G.R., Jr. 2007. Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. *J. Cell Physiol.* 210(2): 325-335. doi:10.1002/jcp.20826

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