

Keupayaan Pembezaan Tiga Jenis Sel Primitif daripada Hasil Perbezaan Tempoh Proliferasi Darah Mencit

(Potential Differentiation of Three Types of Primitive Cells Originated from
Different Proliferation Terms of Mouse Blood)

INTAN ZARINA ZAINOL ABIDIN, SHAHRUL HISHAM ZAINAL ARIFFIN*,
ZAIDAH ZAINAL ARIFFIN & ROHAYA MEGAT ABDUL WAHAB

ABSTRAK

Kajian ini dilakukan bagi melihat keupayaan sel mononukleus sistem darah pusat membeza kepada sel osteoblas dan osteoklas secara in vitro bagi tiga tempoh proliferasi yang berbeza. Sel mononukleus sistem darah pusat dikulturkan di dalam medium pemilihan proliferasi bagi tiga tempoh proliferasi yang berbeza iaitu jangkamasa pendek (5 hari), sederhana (15 hari) dan panjang (30 hari). Keupayaan sel mononukleus untuk membeza kepada sel osteoblas dan osteoklas seterusnya diperhatikan pada setiap jenis sel ini. Medium proliferasi ditambah dengan faktor pembezaan asid askorbik dan β -gliserofosfat bagi membezakan sel mononukleus kepada sel osteoblas. Bagi pembezaan sel osteoklas pula, RANKL dan M-CSF ditambah ke dalam medium proliferasi. Bagi kawalan, sel yang sama digunakan tanpa penambahan faktor pembezaan. Viabiliti sel yang membeza daripada sel jangkamasa pendek, sederhana dan panjang menunjukkan sel-sel tersebut berupaya untuk bermandiri tanpa sebarang peningkatan yang signifikan sehingga 10 dan 14 hari dengan kehadiran faktor-faktor pembezaan tertentu di dalam medium pembezaan masing-masing. Analisis biokimia ke atas aktiviti alkali fosfatase (ALP) dan asid fosfatase rintang tartarat (TRAP) menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) apabila dikulturkan di dalam medium pembezaan masing-masing. Kesimpulannya, keupayaan sel primitif untuk membeza kepada sel osteoblas dan osteoklas matang adalah hampir sama bagi ketiga-tiga jenis jangkamasa proliferasi tetapi mempunyai kadar proliferasi yang berlainan iaitu 0.37, 0.55 dan 0.72 pembahagian/hari masing-masing bagi sel jangkamasa pendek, sederhana dan panjang. Sel mononukleus yang diasingkan daripada darah periferi ini sangat primitif kerana berpotensi untuk membeza kepada dua jenis sel matang yang berasal daripada sel stem yang berbeza, justeru boleh dikategorikan sebagai sel stem multipoten.

Kata kunci: Darah periferi; mencit; osteoblas; osteoklas; sel stem

ABSTRACT

The aim of this study was to differentiate central blood system mononucleated cells in vitro into osteoblast and osteoclast cells for three different proliferation terms of cells. The mononucleated cells were cultured in a selective proliferation medium for three different proliferation terms, i.e., short (5 days), medium (15 days) and long term (30 days) prior to analysis of osteoblast and osteoclast cells' differentiation potentialities. The proliferation medium was then supplemented with differentiation factors, i.e., ascorbic acid and β -glycerophosphate to differentiate mononucleated cells into osteoblast cells. For osteoclast assay, RANKL and M-CSF were added into proliferation medium. For control, the same cells were used without supplementation of respective differentiation factors. The viability of differentiated cells from short, medium and long types of cells showed that they were able to survive until 10 to 14 days in the presence of respective differentiation factors without significant increased in the specific differentiation medium. Biochemical analyses on both alkaline phosphatase (ALP) and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activities were significantly increased ($p < 0.05$) once cultured in their respective differentiation medium. In conclusion, the three types of primitive cells have the same potentiality to differentiate into mature osteoblast and osteoclast cells even though the proliferation rates are different, i.e. 0.37, 0.55 and 0.72 division/day for short, medium and long term cells respectively. Mononucleated cells isolated from peripheral blood are primitive enough to differentiate into two distinct types of mature cells which originated from two different stem cells lineage hence can be categorized as multipotent stem cells.

Keywords: Mice; osteoblast; osteoclast; peripheral blood; stem cells

PENGENALAN

Sel stem atau sel induk merupakan sel yang berupaya untuk membiak dengan sendiri melalui proses pembahagian

atau duplikasi dan membeza kepada pelbagai jenis sel. Sel stem mampu membahagi dan berkembang tanpa henti sehingga berupaya untuk membentuk manusia sempurna

seperti di dalam rahim wanita, atau tisu-tisu dan organ-organ yang khusus. Sel ini merupakan sel primitif yang berpotensi untuk menghasilkan pelbagai jenis sel lain bermula daripada yang lebih matang sehingga membentuk organisma lengkap. Sel stem boleh dibahagikan kepada dua jenis iaitu sel stem embrio dan sel stem dewasa (Weissman 2000; Tögel & Westenfelder 2007).

Perkembangan sel stem membolehkan sel ini dibahagikan kepada tiga jenis iaitu totipoten, pluripoten dan multipoten (Shanthly et al. 2006). Sel totipoten berasal daripada istilah “toti” yang bermaksud “total” dan membawa erti sempurna atau lengkap. Ini bermaksud sel totipoten di dalam rahim ibu mampu untuk terus membahagi sehingga menjadi janin. Selepas beberapa kali pembahagian sel, sel totipoten akan berkembang kepada sel pluripoten. Sel pluripoten pula berasal daripada perkataan “pluri” yang dikaitkan dengan perkataan “plural” yang membawa maksud “berbagai-bagai jenis”. Sel pluripoten ini berkebolehan untuk membahagi dan menghasilkan pelbagai jenis sel, tisu atau organ khusus. Walau bagaimanapun, sel ini tidak mampu untuk menjadi manusia baru yang lengkap. Ini bererti sel pluripoten tidak mempunyai keupayaan “total” seperti sel totipoten. Apabila membeza, sel pluripoten akan menjadi lebih komited untuk menjadi sesuatu jenis sel, tisu atau organ. Sel stem yang seterusnya adalah sel multipoten yang mempunyai keupayaan yang lebih khusus berbanding sel pluripoten. “Multi” bererti pelbagai iaitu pelbagai sel atau tisu yang boleh dibentuk daripada sel stem jenis ini, tetapi keupayaannya adalah terhad. Sel primitif seterusnya adalah sel progenitor yang berupaya untuk membahagi dan membeza kepada hanya satu jenis asal usul sel sahaja (Shahrul Hisham et al. 2005a, b). Sel pra-osteoblas dan pra-osteoklas merupakan sel progenitor yang tergolong dalam kumpulan sel primitif. Sel osteoblas dan osteoklas ini masing-masing bertanggungjawab di dalam pembentukan dan penyerapan tulang (Yamane et al. 2004). Sel pra-osteoblas dan pra-osteoklas yang digunakan di dalam penyelidikan ini merupakan sel primitif bagi sel-sel darah periferi. Sel pra-osteoblas dan pra-osteoklas ini akan dibezakan secara pengkulturan sel (*in vitro*) untuk menjadi sel osteoblas dan osteoklas matang.

Pembezaan sel merupakan suatu proses pembentukan sel yang tidak khusus kepada sel yang khusus dari segi bentuk dan fungsi seperti sel jantung, sel hati atau sel otot (Passier & Mummery 2003; Shanthly et al. 2006). Pembezaan ini berlaku beberapa kali semasa pembentukan organisma multiselular di mana perubahan daripada satu zigot kepada suatu sistem sel dan tisu yang kompleks. Pembezaan sel juga berlaku di dalam organisma dewasa di mana sel stem dewasa akan membahagi dan membeza sepenuhnya membentuk sel-sel anak semasa pembedahan tisu dan juga penghasilan sel baru (Shanthly et al. 2006). Pembezaan sel berlaku apabila sel bertindakbalas dengan isyarat yang dihasilkan untuk mengubah saiz, bentuk, kepolaran dan aktiviti

metaboliknya. Pembezaan sel melibatkan sel primitif dan sel primitif di dalam mamalia dikenali sebagai sel stem dan sel progenitor.

Sel osteoblas merupakan sel mononukleus yang bertanggungjawab dalam pembentukan tulang (membina tulang) dan kaya dengan enzim alkali fosfatase (Kartsogiannis & Ng 2004). Osteoblas wujud apabila sel progenitor yang terdapat di dalam sumsum tulang atau darah periferi diarahkan untuk membeza di bawah pengaruh faktor-faktor pembezaan tertentu. Apabila osteoprogenitor mula untuk membeza, ia akan mula mengekspreskan penanda-penanda tulang seperti alkali fosfatase, osteokalsin, osteopontin, kolagen jenis I (Col1) dan sebagainya (Swaminathan 2001).

Osteoklas merupakan sel multinukleus yang mendegradasi dan menyerap tulang. Sel-sel ini terlibat di dalam kitar semulajadi penstrukturan semula tulang bersama-sama dengan sel osteoblas. Osteoklas berperanan dalam menggantikan tisu tulang dengan menyingkirkan matriks pemineralan tulang lama yang dikenali sebagai proses penyerapan tulang. Di dalam manusia, osteoklas dapat dipencilkan sama ada melalui sumsum tulang sel stem darah (hematopoietik) atau daripada monosit darah dan dikulturkan secara *in vitro* di dalam kehadiran kedua-dua RANKL dan M-CSF (Rivollier et al. 2004). Ciri utama bagi sel osteoklas adalah pengekspresan yang tinggi asid fosfatase rintang tartarat dan katepsin K. Sel osteoklas didapati kaya dengan enzim asid fosfatase rintang tartarat dan boleh bertindak sebagai penanda biokimia bagi pengesanan kehadirannya di dalam suatu populasi sel. Ketidakhadiran atau kehadiran di dalam kuantiti yang sedikit enzim ini juga boleh dijadikan sebagai penanda negatif bagi menunjukkan sesuatu populasi sel itu tidak mengandungi sel osteoklas (Athanasou 1996).

Justeru, kajian ini dilakukan untuk melihat keupayaan sel mononukleus darah periferi membeza kepada sel osteoblas dan osteoklas matang secara *in vitro* bagi tiga jenis sel pada tempoh proliferasi yang berbeza iaitu sel jangkamasa pendek, sel jangkamasa sederhana dan sel jangkamasa panjang. Seterusnya, analisis secara biokimia dilakukan untuk mengenalpasti keupayaan ketiga-tiga jenis sel membeza kepada sel matang.

BAHAN DAN KAEDAH

PENGASINGAN DAN PENGKULTURAN SEL PRIMITIF MONONUKLEUS SISTEM DARAH PUSAT

Mencit strain ICR yang berusia antara 4 hingga 6 minggu digunakan dalam kajian ini. Lebih kurang 1 mL sistem darah pusat diambil daripada jantung setiap mencit untuk diasingkan secara pengemparan ketumpatan dengan menggunakan Ficoll-Paque™ Plus. Sel yang diperolehi akan dikulturkan di dalam 1 mL medium proliferasi yang terdiri daripada *Alpha Minimal Essential Medium* (AMEM), 10% serum anak lembu (*Newborn Calf Serum*; NBCS) dan 2% penisilin/streptomisin. Sel tersebut seterusnya dieram

di dalam mikropelat 24 telaga pada suhu 37°C dengan kehadiran 5% CO₂ pada tiga jangkamasa proliferasi yang berlainan iaitu selama 5 hari (sel jangka masa pendek), 15 hari (sel jangka masa sederhana) dan 30 hari (sel jangkamasa panjang). Pengiraan sel viabel dilakukan dengan menggunakan kaedah Tripian biru.

PEMBEZAAN SEL PRIMITIF MONONUKLEUS KEPADA SEL OSTEOBLAS DAN OSTEOKLAS MATANG

Pembezaan ketiga-tiga sel primitif mononukleus dilakukan untuk membentuk sel osteoblas dan osteoklas matang secara *in vitro*. Bilangan sel yang diperlukan untuk setiap hari asai pembezaan ditetapkan pada 1×10⁵ sel/mL bagi setiap telaga. Sebanyak enam telaga daripada mikropelat 24 telaga diperlukan untuk melakukan asai pembezaan osteoblas ini. Lima telaga digunakan untuk pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoblas matang dengan menggunakan medium proliferasi yang ditambah dengan 50 µg/mL asid askorbik dan β-gliserofosfat 10 mM untuk mengaruh pembezaan sel kepada sel osteoblas. Lima telaga tersebut dibahagikan kepada masa yang berbeza iaitu hari ke-3, 5, 7, 10 dan 14. Hari 0 pembezaan merupakan hari di mana dilakukan penambahan asid askorbik dan β-gliserofosfat. Kultur-kultur tersebut dieram pada 37°C dengan 5% CO₂ di dalam udara. Satu telaga lagi digunakan sebagai kawalan di mana sel yang sama dikulturkan dengan medium proliferasi iaitu medium tanpa penambahan asid askorbik dan β-gliserofosfat.

Bagi asai pembezaan osteoklas untuk ketiga-tiga sel primitif pula, sebanyak lima telaga daripada mikropelat 24 telaga diperlukan. Empat telaga digunakan untuk pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoklas matang dengan menggunakan medium proliferasi yang ditambah dengan 50 ng/mL RANKL dan 25 ng/mL M-CSF yang berfungsi untuk mengaruh pembezaan sel mononukleus kepada sel osteoklas matang. Empat telaga tersebut dibahagikan kepada masa yang berbeza iaitu hari ke-3, 5, 7 dan 10. Hari 0 pembezaan merupakan hari di mana dilakukan penambahan RANKL dan M-CSF. Kultur-kultur tersebut dieram pada 37°C dengan 5% CO₂. Satu telaga lagi digunakan sebagai kawalan di mana sel yang sama dikulturkan dengan medium proliferasi namun tanpa penambahan sebarang faktor pembezaan. Viabiliti sel mononukleus di dalam medium proliferasi dan kedua-dua medium pembezaan diperhatikan dan ditentukan pada setiap hari pengasaian dengan menggunakan kaedah Tripian biru.

PENGASAIAN PENANDA BIODIAGNOSTIK ALKALI FOSFATASE (OSTEOBLAS) DAN ASID FOSFATASE RINTANG TARTARAT (OSTEOKLAS) DI DALAM MEDIUM PEMBEZAAN DAN MEDIUM PROLIFERASI

Pengasaian aktiviti enzim alkali fosfatase (ALP) untuk ketiga-tiga sel primitif dilakukan pada hari ke-3, 5, 7, 10 dan 14 di dalam medium pembezaan. Sebanyak 1×10⁵ sel daripada telaga kawalan dan pembezaan dicuci terlebih dahulu sebelum dieram di dalam 0.1 M penimbal

NaHCO₃-Na₂CO₃ (pH 10.0) yang mengandungi 0.1% Triton X-100, 2 mM MgSO₄ dan 6 mM *p*-nitrofenil fosfat (pNPP) selama 30 minit pada 37°C. Selepas 30 minit, sebanyak 1.5 M NaOH ditambahkan ke dalam campuran untuk menghentikan tindakbalas enzim-substrat. Seterusnya nilai ketumpatan optik bagi penghasilan produk *p*-nitrofenolat dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm.

Pengasaian aktiviti enzim asid fosfatase rintang tartarat (TRAP) dilakukan pada hari ke-3, 5, 7 dan 10 pembezaan untuk ketiga-tiga jenis sel mononukleus kepada sel osteoklas. Sel kawalan dan pembezaan diambil sebanyak 1×10⁵ sel untuk dicuci dengan PBS dan 50 µL penimbal sodium asetat (50 mM, pH 5.5) yang mengandungi 0.1% Triton X-100. Supernatan dibuang dan 500 µL PBS ditambahkan ke dalam setiap tiub dan disimpan pada suhu -20°C selama 30-60 minit. Aktiviti TRAP diasai menggunakan larutan supernatan ekstrak sel tersebut. Aktiviti enzim TRAP di dalam ekstrak sel diasai menggunakan *p*-nitrofenilfosfat (pNPP) sebagai substrat di dalam medium eraman yang mengandungi penimbal-penimbal berikut: 10 mM pNPP, 0.1 M Na-asetat (pH 5.8), 0.15 M KCl, 0.1% Triton X-100, 10 mM Na-tartrat, 1 mM asid askorbik dan 0.1 mM FeCl₃. Selepas satu jam penderaman pada 37°C, penambahan 0.3 M NaOH dilakukan untuk menghentikan tindak balas. Kandungan *p*-nitrofenolat diukur menggunakan ketumpatan optik yang dibaca pada jarak gelombang 405 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

HASIL DAN PERBINCANGAN

PENGKELASAN SEL PRIMITIF MONONUKLEUS SISTEM DARAH PUSAT

Kajian awal penyelidikan ini melibatkan pengasingan tiga jenis sel primitif iaitu sel jangkamasa pendek, sederhana dan panjang. Sel jangkamasa pendek, sederhana dan panjang masing-masing melibatkan sel yang telah dipilih melalui pengkulturan dalam medium proliferasi selama 5, 15 dan 30 hari. Pemerhatian terhadap kadar proliferasi pada setiap jenis sel ini menunjukkan keupayaan proliferasi yang berbeza. Oleh itu, sel-sel primitif ini dikelaskan kepada tiga jenis sel iaitu sel primitif jangkamasa pendek, sederhana dan panjang. Kajian oleh Morrison et al. (1997) mendapati sel jangkamasa pendek mempunyai kadar proliferasi yang sangat perlahan. Sel jenis ini mengambil masa yang agak panjang untuk menggandakan bilangannya berbanding dua populasi sel yang lain iaitu, populasi sel jangkamasa sederhana dan sel jangkamasa panjang. Walaupun kadar proliferasinya sangat perlahan, sel jangkamasa pendek yang mempunyai ciri Thy-1^{lo}Sca-1⁺Mac-1^{lo}CD4^{lo} merupakan sel yang paling banyak boleh ditemui di dalam suatu populasi sumsum tulang pada fasa S/G₂/M kitaran sel (Morrison et al. 1997). Dalam kajian ini, sel jangkamasa pendek yang didapati daripada sistem darah pusat mengalami proliferasi sel hampir 1.7 kali selepas 5 hari di dalam

medium proliferasi apabila dibandingkan dengan hari 0 pengkulturan. Pembahagian sel ini didapati berlaku lebih kurang 0.7 kali sepanjang 5 hari di dalam kultur. Oleh itu, kadar proliferasi sel berlaku pada 0.34/hari sepanjang 5 hari di dalam kultur iaitu purata 7.5 hari untuk setiap pembahagian sel (0.13 pembahagian/hari) (Jadual 1).

Terdapat populasi pertengahan untuk sel primitif darah periferi yang didapati berupaya untuk melakukan proliferasi dalam tempoh yang lebih lama berbanding sel jangkamasa pendek. Walau bagaimanapun, keupayaannya untuk berproliferasi adalah kurang daripada sel jangkamasa panjang (Morrison et al. 1997). Sel ini boleh didapati lebih banyak daripada sel jangkamasa panjang di dalam suatu populasi sel sumsum tulang. Sel dengan ciri Thy-1^{lo}Sca-1⁺Lin⁻Mac-1^{lo}CD4⁺ dikategorikan sebagai sel jangkamasa sederhana oleh Morrison et al. (1997) di mana 7% daripada populasi sel ini ditemui di dalam fasa S/G₂/M kitaran sel. Kadar proliferasi sel jangkamasa sederhana di dalam kajian ini didapati meningkat kepada 3.5/hari selepas 15 hari apabila dibandingkan dengan hari 0 pengkulturan. Pembahagian sel didapati berlaku lebih kurang 5.2 kali sepanjang 15 hari di dalam kultur iaitu purata 3.1 hari untuk membahagi (0.32 pembahagian/hari) (Jadual 1). Data ini menunjukkan kadar proliferasi yang lebih tinggi berbanding sel jangkamasa pendek.

Di dalam kajian yang melibatkan sel sumsum tulang mendapati wujudnya populasi sel primitif yang boleh dikategorikan sebagai paling primitif. Sel ini didapati berupaya untuk berproliferasi dalam jangkamasa yang panjang, oleh itu berupaya untuk menghasilkan progeni yang lebih banyak berbanding sel daripada jangkamasa sederhana (Morrison et al. 1997). Walau bagaimanapun, hanya 4% sel jenis ini (dengan ciri Thy-1^{lo}Sca-1⁺Lin⁻Mac-1^{lo}CD4⁺c-kit⁺) yang boleh didapati di dalam populasi sel sumsum tulang. Sel stem yang paling primitif adalah sel yang berupaya untuk membentuk populasi sel dalam jangkamasa yang panjang (Morrison et al. 1997). Sel jangkamasa panjang di dalam kajian ini menunjukkan sel ini mengalami proliferasi 4446.8 kali selepas 30 hari pada kadar 148.2/hari apabila dibandingkan dengan permulaan pengkulturan (hari 0). Pembahagian sel berlaku lebih kurang 11.9 kali sepanjang 30 hari di dalam kultur. Oleh itu, sel primitif ini memerlukan 2.5 hari untuk melakukan sekali proses pembahagian sel (0.4 pembahagian/hari) (Jadual 1). Menunjukkan kadar proliferasi yang paling tinggi berbanding kedua-dua jenis jangkamasa sel.

VIABILITI SEL PRIMITIF MONONUKLEUS DI DALAM MEDIUM PEMBEZAAN BERBANDING MEDIUM PROLIFERASI

Kajian viabiliti dilakukan bagi melihat keupayaan ketiga-tiga jenis sel ini untuk membeza kepada sel osteoblas dan osteoklas secara *in vitro* apabila dikulturkan di dalam medium masing-masing. Sel mononukleus daripada proliferasi jangkamasa pendek, sederhana dan panjang dikulturkan pada 1.0×10^5 sel/mL di dalam medium proliferasi dengan penambahan 50 µg/mL asid askorbik dan β-gliserofosfat 10 mM untuk asai pembezaan osteoblas manakala 50 ng/mL RANKL dan 25 ng/mL M-CSF ditambah bagi medium pembezaan osteoklas. Jumlah sel yang sama dikulturkan di dalam medium proliferasi tanpa sebarang penambahan faktor-faktor pembezaan sebagai asai kawalan. Bagi sel jangkamasa pendek, pembezaan bermula selepas 5 hari pengkulturan. Manakala bagi sel jangkamasa sederhana, pembezaan dilakukan selepas 15 hari dan sel jangkamasa panjang pula pada hari ke-30. Rajah 1 menunjukkan viabiliti sel mononukleus di dalam medium proliferasi berbanding kedua-dua medium pembezaan bermula dari hari 0 sehingga 14.

Hasil yang diperolehi melalui sel jangkamasa pendek menunjukkan berlakunya peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) di dalam bilangan sel apabila dikulturkan di dalam medium proliferasi pada hari ke-10 dan 14 berbanding dengan hari permulaan pengkulturan (hari 0). Peningkatan bilangan sel viabel ini merupakan suatu petunjuk bahawa sel-sel tersebut mempunyai keupayaan untuk melakukan proliferasi. Manakala bilangan sel mononukleus yang dikulturkan di dalam kedua-dua medium pembezaan osteoblas dan osteoklas tidak menunjukkan sebarang peningkatan yang signifikan ($p > 0.05$) di dalam bilangan sel viabel apabila bilangan sel pada hari ke-10 (sel di dalam medium pembezaan osteoklas; †) dan ke-14 (sel di dalam medium pembezaan osteoblas; §) dibandingkan dengan sel pada hari 0 (Rajah 1a).

Viabiliti bagi sel mononukleus jangkamasa sederhana yang dikulturkan di dalam medium proliferasi juga menunjukkan peningkatan bilangan sel viabel yang signifikan ($p < 0.05$). Walau bagaimanapun, apabila sel mononukleus jangkamasa sederhana ini dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas didapati bilangan sel viabel adalah hampir sama iaitu tiada peningkatan yang signifikan berlaku ($p > 0.05$; §). Hasil yang serupa juga diperolehi apabila sel tersebut dikulturkan di dalam

JADUAL 1. Kadar proliferasi dan pembahagian sel bagi setiap jenis sel primitif mononukleus sistem darah pusat mencit

Jenis Sel Primitif Mononukleus	Kadar Proliferasi (Peningkatan sel berbanding kultur asal/hari)	Kadar Pembahagian Sel (Bilangan pembahagian sel/hari)
Sel Jangkamasa Pendek	0.34	0.13
Sel Jangkamasa Sederhana	3.50	0.32
Sel Jangkamasa Panjang	148.2	0.40

medium pembezaan osteoklas, tiada sebarang peningkatan yang signifikan ($p > 0.05$; ‡) di dalam bilangan sel viabel (Rajah 1b).

Bagi sel mononukleus jangkamasa panjang yang dikulturkan di dalam kedua-dua medium pembezaan dan medium proliferasi juga menunjukkan hasil yang hampir sama dengan sel jangkamasa pendek dan sederhana. Bilangan sel viabel di dalam medium proliferasi menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) sepanjang 10 dan 14 hari pengkulturan berbanding hari 0. Manakala tiada peningkatan sel viabel yang ditunjukkan apabila sel mononukleus jangkamasa panjang ini dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas (§) dan juga osteoklas (‡) ($p > 0.05$) (Rajah 1c).

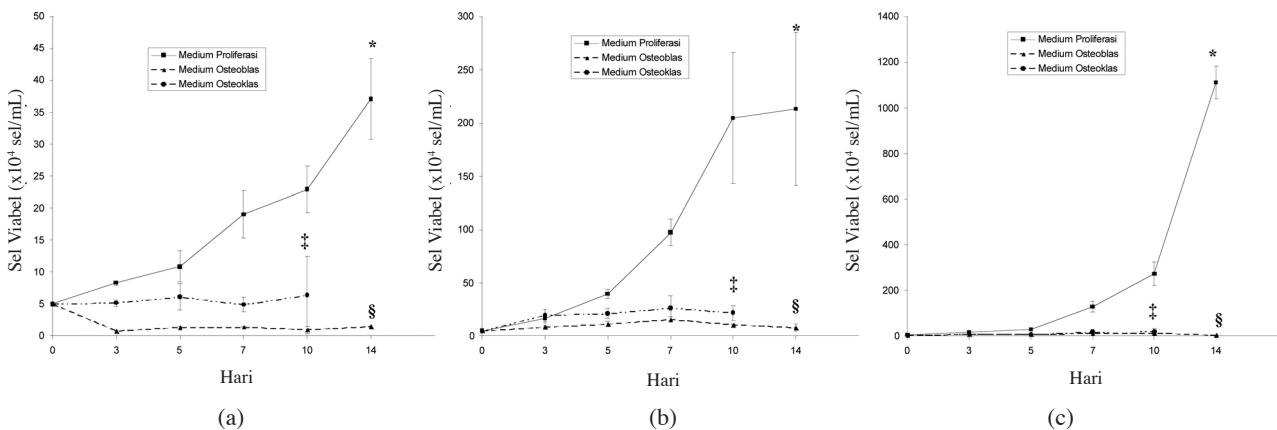
Analisis kadar proliferasi yang dilakukan ke atas setiap jenis sel di dalam medium proliferasi menunjukkan kadar proliferasi yang berbeza. Sel di dalam medium proliferasi menunjukkan peningkatan bilangan sel viabel apabila dibandingkan dengan hari 0. Kadar proliferasi bagi sel jangkamasa pendek adalah 7.4 atau 0.37 pembahagian/hari (Rajah 1a). Manakala kadar proliferasi bagi sel jangkamasa sederhana adalah 14.2 atau 0.55 pembahagian/hari (Rajah 1b) dan sel jangkamasa panjang pula mengalami kadar proliferasi sel hampir 37 atau 0.72 pembahagian/hari (Rajah 1c). Kadar proliferasi bagi sel jangkamasa panjang di dalam medium proliferasi adalah paling tinggi di antara ketiga-tiga jenis sel ini. Ini menunjukkan seperti dalam kajian Morrison et al. (1997) sel jangkamasa panjang berupaya menghasilkan progeni yang lebih banyak berbanding sel jangkamasa sederhana dan diikuti jangkamasa pendek.

PENGASAIAN PENANDA BOKIMIA SEL OSTEOLAS (ALKALI FOSFATASE) DI DALAM MEDIUM PEMBEZAAN OSTEOLAS DAN MEDIUM PROLIFERASI

Alkali fosfatase merupakan penanda biokimia bagi sel osteoblas. Oleh itu, pengasaian aktiviti alkali fosfatase dilakukan pada hari ke-3 sehingga 14 bagi mengesan kehadiran enzim alkali fosfatase pada sel yang dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas. Aktiviti alkali fosfatase bagi 1.0×10^5 sel/mL untuk sel mononukleus daripada proliferasi jangkamasa pendek, sederhana dan panjang diukur sepanjang 14 hari pembezaan. Aktiviti enzim alkali fosfatase bagi setiap jenis proliferasi sel ini menunjukkan peningkatan graf peratusan yang hampir sama (Rajah 2).

Aktiviti alkali fosfatase bagi sel mononukleus jangkamasa pendek yang dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas didapati meningkat secara mendadak bermula dari hari ke-3 sehingga 14. Berlaku peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) pada hari ke-14 apabila aktiviti enzim alkali fosfatase pada sel yang dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas dibandingkan dengan sel di dalam medium proliferasi (Rajah 2a).

Aktiviti alkali fosfatase bagi sel mononukleus jangkamasa sederhana juga menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) pada hari ke-10 dan 14 pengkulturan di dalam medium pembezaan osteoblas. Pada hari ke-14, aktiviti enzim alkali fosfatase bagi sel yang dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas adalah 19 kali lebih tinggi apabila dibandingkan dengan medium proliferasi yang bertindak sebagai kawalan (Rajah 2b).



RAJAH 1. Viabiliti sel primitif di dalam medium pembezaan osteoblas, pembezaan osteoklas dan proliferasi bagi sel (a) jangkamasa pendek, (b) jangkamasa sederhana, dan (c) jangkamasa panjang. Analisis statistik ujian t berpasangan dilakukan berbanding hari 0 (*); sel di dalam medium proliferasi menunjukkan peningkatan yang signifikan berbanding hari 0 ($p < 0.05$) manakala ‡; sel di dalam medium osteoklas; dan §; sel di dalam medium osteoblas menunjukkan nilai yang tidak signifikan berbanding hari 0 ($p > 0.05$)) ($n=3$; sel di dalam medium osteoblas dan osteoklas; $n=6$; sel di dalam medium proliferasi). Kadar proliferasi bagi sel yang dikulturkan di dalam medium proliferasi adalah 0.37 pembahagian/hari (sel jangkamasa pendek), 0.55 pembahagian/hari (sel jangkamasa sederhana) dan 0.72 pembahagian/hari (sel jangkamasa panjang)

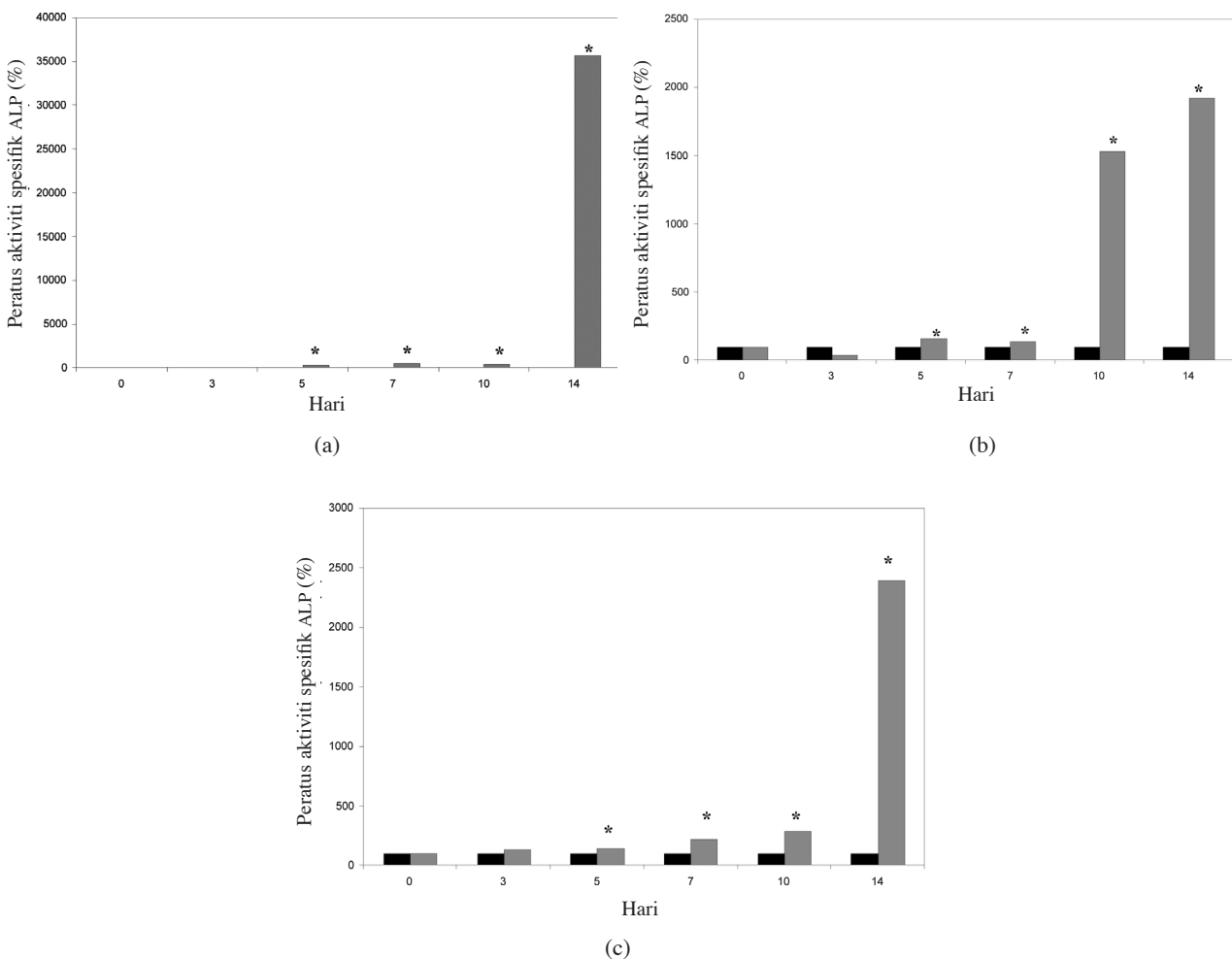
Hasil yang hampir sama juga diperoleh apabila sel jangkamasa panjang dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas. Aktiviti enzim alkali fosfatase pada hari ke-14 didapati 24 kali lebih tinggi bagi sel mononukleus yang dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas apabila dibandingkan dengan medium proliferasi (Rajah 2c). Berdasarkan kajian Wang et al. (1999), peningkatan aktiviti enzim alkali fosfatase yang mendadak pada hari ke-14 adalah disebabkan pada masa tersebut sel osteoblas telah membeza sepenuhnya kepada sel matang.

Analisis biokimia dilakukan untuk mengesan kehadiran sel osteoblas di dalam medium pembezaan yang mengandungi asid askorbik dan β -gliserofosfat. Kajian oleh Wang et al. (1999) dan Zhao et al. (2005) menunjukkan titisan sel pra-osteoblas mencit; MC3T3-E1, yang dikulturkan di dalam medium proliferasi (dengan kehadiran asid askorbik dan β -gliserofosfat) menghasilkan peningkatan kepada aktiviti alkali fosfatase selepas 10 dan 14 hari di dalam medium tersebut. Tambahan pula osteoblas aktif dilihat menghasilkan enzim alkali fosfatase

(Kartsogiannis & Ng 2004), oleh itu peningkatan aktiviti alkali fosfatase digunakan sebagai penanda biologi bagi kehadiran osteoblas. Dalam kajian ini, ketiga-tiga jenis sel mononukleus didapati mempunyai keupayaan yang sama untuk membeza kepada sel osteoblas memandangkan wujudnya peningkatan pada aktiviti alkali fosfatase sepanjang 14 hari sel tersebut dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoblas (Rajah 2).

PENGASAIAN PENANDA BOKIMIA SEL OSTEOKLAS
(ASID FOSFATASE RINTANG TARTARAT) DI DALAM
MEDIUM PEMBEZAAN OSTEOKLAS
DAN MEDIUM PROLIFERASI

Pengasaan asid fosfatase rintang tartarat dilakukan memandangkan peranannya sebagai penanda biokimia bagi sel osteoklas. Di dalam kajian ini, aktiviti asid fosfatase rintang tartarat bagi 1.0×10^5 sel/mL untuk sel mononukleus daripada proliferasi jangkamasa pendek, sederhana dan panjang diukur sepanjang 10 hari di dalam medium pembezaan osteoklas dan medium proliferasi.



RAJAH 2. Aktiviti alkali fosfatase (ALP) bagi sel mononukleus di dalam medium proliferasi dan medium osteoblas bagi sel (a) jangkamasa pendek, (b) jangkamasa sederhana, dan (c) jangkamasa panjang. *Analisis statistik ujian t berpasangan dilakukan berbanding hari 0 menunjukkan peningkatan sel yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding sel kawalan ($n=3$; sel di dalam medium osteoblas; $n=3$; sel di dalam medium proliferasi)

■ Medium proliferasi (kawalan); ■ Medium pembezaan osteoblas

Asai pembezaan mengandungi medium proliferasi dan penambahan 50 ng/mL RANKL dan 25 ng/mL M-CSF, manakala asai kawalan hanya mengandungi medium proliferasi.

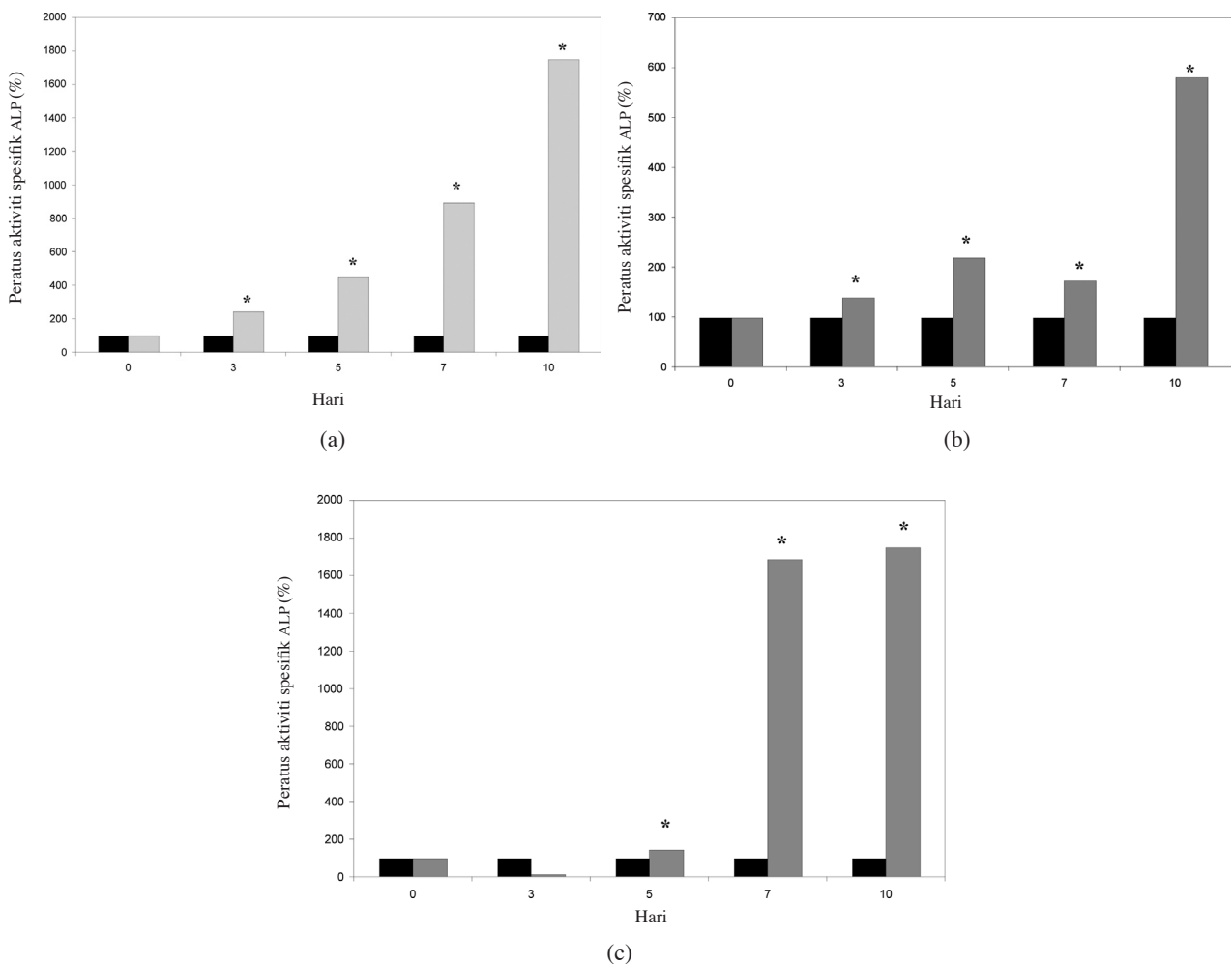
Graf yang ditunjukkan pada Rajah 3a merupakan peratusan aktiviti asid fosfatase rintang tartarat bagi sel mononukleus jangkamasa pendek. Peratus aktiviti spesifik asid fosfatase rintang tartarat sepanjang 10 hari pembezaan bagi sel yang dikulturkan di dalam medium pembezaan osteoklas didapati meningkat secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding sel di dalam asai kawalan (Rajah 3a). Pada hari ke-10, peratus aktiviti spesifik asid fosfatase rintang tartarat bagi sel tersebut adalah 17.5 kali lebih tinggi apabila dibandingkan dengan sel yang dikulturkan di dalam medium proliferasi (kawalan) (Rajah 3a). Sel dalam asai kawalan diandaikan sebagai 100% aktiviti asid fosfatase rintang tartarat sepanjang tempoh pengasaian.

Bagi sel jangkamasa sederhana, walaupun berlaku sedikit penurunan aktiviti spesifik asid fosfatase rintang tartarat pada hari ke-7, aktiviti spesifik enzim ini masih

menunjukkan peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) pada hari ke-10 pengkulturan (Rajah 3b). Hasil peningkatan yang diperolehi adalah sama dengan sel jangkamasa pendek yang juga mengalami peningkatan pada hari-10 pengkulturan.

Bagi sel jangkamasa panjang, aktiviti spesifik asid fosfatase rintang tartarat turut menunjukkan peningkatan bermula pada hari ke-5 hingga 10 bagi sel di dalam medium pembezaan osteoklas (Rajah 3c). Peningkatan aktiviti spesifik enzim ini yang bermula pada hari ke-5 menunjukkan sel mononukleus mungkin sedang komited untuk membeza kepada sel osteoklas.

Peningkatan aktiviti asid fosfatase rintang tartarat yang signifikan menjadi petunjuk bahawa sel mononukleus mula mengalami pembezaan kepada sel osteoklas. Ini berdasarkan kepada kajian Faccio et al. (2003) yang menunjukkan kewujudan beberapa sel osteoklas multinukleus pada hari ke-3 dan sel ini membeza sepenuhnya kepada sel osteoklas matang pada hari ke-10. Kajian oleh Perez-Amodio et al. (2005) pula menunjukkan peningkatan kepada



RAJAH 3. Aktiviti asid fosfatase rintang tartarat (TRAP) bagi sel mononukleus dari darah periferi di dalam medium proliferasi dan medium osteoklas bagi sel (a) jangkamasa pendek, (b) jangkamasa sederhana, dan (c) jangkamasa panjang. *Analisis statistik ujian t berpasangan dilakukan berbanding hari 0 menunjukkan peningkatan sel yang signifikan ($p < 0.05$) berbanding sel kawalan ($n=3$; sel di dalam medium osteoklas; $n=3$; sel di dalam medium proliferasi)

■ Medium proliferasi (kawalan); ■ Medium osteoklas

aktiviti spesifik enzim asid fosfatase rintang tartarat dan pengekspresan gen *Trap* yang signifikan pada hari ke-5 dan ke-7 sewaktu pengkulturan pembezaan titisan sel primitif monosit kepada sel osteoklas. Faktor pembezaan RANKL dan M-CSF merupakan faktor penting dalam mengaruh proses osteoklastogenesis secara *in vitro* (Athanasou 1996). Asid fosfatase rintang tartarat merupakan enzim metaloprotein yang tergolong di dalam kumpulan asid fosfatase dan diekspreskan oleh sel osteoklas (Honig et al. 2006). Asid fosfatase rintang tartarat adalah produk bagi osteoklas dan merupakan penanda biokimia bagi penyerapan tulang (Nakasato et al. 1999). Sel osteoklas telah dikenalpasti mempunyai tahap pengekspresan enzim asid fosfatase rintang tartarat yang tinggi (Perez-Amodio et al. 2005). Aras aktiviti asid fosfatase rintang tartarat yang tinggi juga didapati wujud semasa metabolisma penyerapan tulang yang aktif (Halleen et al. 2000; Janckila et al. 2003). Dalam kajian ini, peningkatan enzim asid fosfatase rintang tartarat di dalam medium pembezaan osteoklas dikesan seawal hari ke-3 sehingga 10. Peningkatan aktiviti asid fosfatase rintang tartarat yang dikesan pada perlakuan sel mononukleus dari darah periferi di dalam medium pembezaan osteoklas menunjukkan bahawa sel ini mengalami pembezaan kepada sel osteoklas matang di bawah aruhan faktor pembezaan iaitu RANKL dan M-CSF.

Kajian ini menunjukkan sel mononukleus daripada ketiga-tiga tempoh proliferasi didapati berupaya untuk membeza kepada sel multinukleus osteoklas memandangkan sel yang dikulturkan di dalam medium tersebut telah menghasilkan peningkatan aktiviti asid fosfatase rintang tartarat yang signifikan ($p < 0.05$) bermula daripada hari ke-3 sehingga 10 berbanding hari 0 yang bertindak sebagai aktiviti basal, iaitu 100% (Rajah 3).

KESIMPULAN

Sel mononukleus daripada sistem darah pusat mencit pada sel jenis jangkamasa pendek (5 hari), sederhana (15 hari) dan panjang (30 hari) didapati berupaya untuk mengalami kadar proliferasi yang berbeza secara *in vitro* di dalam medium proliferasi. Analisis yang dilakukan dalam kajian ini membuktikan bahawa kesemua jenis sel primitif mononukleus yang dikulturkan di dalam medium proliferasi berupaya untuk membeza kepada sel osteoblas dan osteoklas matang dengan kehadiran faktor-faktor pembezaan tertentu. Keupayaan ketiga-tiga sel primitif untuk membeza kepada sel osteoblas dan osteoklas matang juga hampir sama. Oleh itu, kesemua jenis sel mononukleus ini didapati sangat primitif kerana berupaya untuk berkembang membentuk dua jenis sel matang daripada asal usul yang berbeza.

Sel osteoblas merupakan sel yang berasal daripada sel stem mesenkima manakala sel osteoklas pula adalah sel yang berasal daripada pembezaan sel stem hematopoietik. Hasil penemuan ini seterusnya dapat mengkatégorikan bahawa kesemua jenis sel mononukleus sistem darah pusat mencit ini adalah lebih primitif daripada sel stem

mesenkima dan sel stem hematopoietik yang dikategorikan sebagai sel stem multipoten.

PENGHARGAAN

Penulis merakamkan penghargaan kepada MOSTI, UKM di atas dana penyelidikan (02-01-02-SF0156, 02-01-02-SF0245 dan UKM-GUP-BTK-07-15-197) dan Muhammad Dain Yazid kerana membantu dalam penerbitan manuskrip ini.

RUJUKAN

- Athanasou, N.A. 1996. Cellular Biology of Bone-Resorbing Cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* 78-A(7): 1096-1112.
- Faccio, R., Takeshita, S., Zallone, A., Ross F.P. & Teitelbaum, S.L. 2003. c-FMS and the $\alpha_v\beta_3$ integrin collaborate during osteoclast differentiation. *The Journal of Clinical Investigation* 111(5): 749-758.
- Halleen, J.M., Alatalo, S.L., Suominen, H., Cheng, S., Janckila, A.J. & Väänänen, H.K. 2000. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research* 15(7): 1337-1345.
- Honig, A., Rieger, L., Kapp, M., Krockenberger, M., Eck, M., Dietl, J. & Kämmerer, U. 2006. Increased tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) expression in malignant breast, ovarian and melanoma tissue: an investigational study. *BMC Cancer* 6:199 doi:10.1186/1471-2407-6-199.
- Janckila, A.J., Nakasato, Y.R., Neustadt, D.H. & Yam, L.T. 2003. Disease-specific expression of tartrate-resistant acid phosphatase isoforms. *Journal of Bone and Mineral Research* 18(10): 1916-1919.
- Kartsogiannis, V. & Ng, K.W. 2004. Cell lines and primary cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and Cellular Endocrinology* 228(1-2): 79-102.
- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Hemmati, H.D., Wright, D.E. & Weissman, I.L. 1997. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* 124(10): 1929-1939.
- Nakasato, Y.R., Janckila, A.J., Halleen, J.M., Vaananen, H.K., Walton, S.P. & Yam, L.T. 1999. Clinical Significance of Immunoassays for Type-5 Tartrate-resistant Acid Phosphatase. *Clinical Chemistry* 45(12): 2150-2157.
- Passier, R. & Mummery, C. 2003. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research* 58(2): 324-335.
- Perez-Amodio, S., Vogels, I.M.C., Schoenmaker, T., Jansen, D.C., Alatalo, S.L., Halleen, J.M., Beertsen, W. & Everts, V. 2005. Endogenous expression and endocytosis of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) by osteoblast-like cells. *Bone* 36(6): 1065-1077.
- Rivollier, A., Mazzorana, M., Tebib, J., Piperno, M., Aitsiselmi, T., Roubardin-Combe, C., Jurdic, P. & Servet-Delprat, C. 2004. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* 104(13): 4029-4037.
- Shahrol Hisham Zainal Ariffin, Rohaya Megat Abdul Wahab, Intan Zarina Zainol Abidin, Sahidan Senafi, Nor Muhammad Mahadi & Zaidah Zainal Ariffin. 2005a. Sel Stem Dalam Perkembangan Darah. *Sains Malaysiana* 34(1): 21-26.

- Shahrul Hisham Zainal Ariffin, Rohaya Megat Abdul Wahab, Ismanizan Ismail, Nor Muhammad Mahadi & Zaidah Zainal Ariffin. 2005b. Stem Cells, Cytokines And Their Receptors. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 13(1): 1-13.
- Shanthly, N., Aruva, M.R., Zhang, K., Mathew, B. & Thakur, M.L. 2006. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 50(3): 205-216.
- Swaminathan, R. 2001. Biochemical markers of bone turnover. *Clinica Chimica Acta* 313(1-2): 95-105.
- Tögel, F. & Westenfelder, C. 2007. Adult Bone Marrow-Derived Stem Cells for Organ Regeneration and Repair. *Development Dynamics* 236(12): 3321-3331.
- Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P.H. & Franceschi, R.T. 1999. Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Preosteoblast Subclones with distinct In Vitro and In Vivo Differentiation/Mineralization Potential. *Journal of Bone and Mineral Research* 14(6): 893-903.
- Weissman, I.L. 2000. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287: 1442-1446.
- Yamane, T., Okuyama, H., Tsuneto, M., Hemmi, H., Yamazaki, H. & Hayashi, S.I. 2004. Osteoclast lineage. Dlm. *Handbook of stem cells*, Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomson, J. & West., M. London: Elsevier Academic Press.
- Zhao, Y., Guan, H., Liu, S.F., Wu, R.C. & Wang, Z. 2005. Overexpression of QM induces cell differentiation and mineralization in MC3T3-E1. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28(8): 1371-1376.
- Intan Zarina Zainol Abidin & Shahrul Hisham Zainal Ariffin*
Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor, Malaysia
- Zaidah Zainal Ariffin
Jabatan Mikrobiologi
Fakulti Sains Gunaan
Universiti Teknologi MARA
40450 Shah Alam, Selangor, Malaysia
- Rohaya Megat Abdul Wahab
Jabatan Ortodontik, Fakulti Pergigian
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
50300 Kuala Lumpur, Malaysia
- *Pengarang untuk surat-menyurat; email: hisham@ukm.my
- Diserahkan: 24 Mac 2009
Diterima: 13 Julai 2009