

บทบาทของการกระตุ้นสัญญาณภายในสภาพแวดล้อมจุลภาคที่มีผลต่อการควบคุม การเพิ่มจำนวนและ
การคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดของ Limbal epithelial stem cell



นางสาวสุภาพร ครามจันทิก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Elucidating the role of activated niche signals in regulating Limbal epithelial stem cell
proliferation and maintenance

Miss Supaporn Khamchantuk



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

บทบาทของการกระตุ้นสัญญาณภายในสภาพแวดล้อม
จุลภาคที่มีผลต่อการควบคุม การเพิ่มจำนวนและการคง
คุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดของ Limbal epithelial stem
cell

โดย

นางสาวสุภาพร ครามจันทิก

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์นิพัทธ์ อิศรเสนา ณ
อยุธยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อภิวัฒน์ มุทิรางกูร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์นิพัทธ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. นายแพทย์เวสวัช เวสสโกวิท)

สุภาพร ครามจันทิก : บทบาทของการกระตุ้นสัญญาณภายในสภาพแวดล้อมจุลภาคที่มีผลต่อการควบคุม การเพิ่มจำนวนและการคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดของ Limbal epithelial stem cell (Elucidating the role of activated niche signals in regulating Limbal epithelial stem cell proliferation and maintenance) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. นพ.นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา, หน้า.

เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาที่อยู่บริเวณลิมบัส Limbal epithelial stem cells (LESCs) จำเป็นต่อการคงสภาพความใส และใช้เพื่อการซ่อมแซมผิวของกระจกตาเมื่อเกิดการบาดเจ็บ LESCs ในภาวะปกติอยู่ในสภาวะ quiescence แต่เมื่อกระจกตาได้รับบาดเจ็บ LESCs จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว กลไกในการกระตุ้น LESCs ให้ออกจากสภาวะ quiescence ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของ TGF- β 1 ซึ่งเป็น cytokine ที่เพิ่มขึ้นในขบวนการซ่อมแซมผิวกระจกตา มีต่อ keratocytes ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในสภาพแวดล้อมจุลภาคของเซลล์ LESCs และต่อ เซลล์ LESCs เอง การกระตุ้นเซลล์ LESCs ด้วย TGF- β 1 โดยตรง เป็นระยะเวลานานพบว่า TGF- β 1 เหนี่ยวนำให้เกิด epithelial to mesenchymal transition (EMT) และลดจำนวนโคโลนี (% Colony forming efficiency (%CFU)) ทำให้เซลล์ LESCs สูญเสียคุณสมบัติความเป็น stem cells ไป อย่างไรก็ตามเมื่อทำการกระตุ้น cornea keratocytes พบว่ามีการหลั่ง VEGF และ IL-6 ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น cornea keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 มีระดับการแสดงออกของ *NOG (NOGGIN)* และ *GREM1 (GREMLIN1)* สูงขึ้นอย่างมีระดับนัยสำคัญ ซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติของเซลล์ LESCs นอกจากนี้ยังพบว่า TGF- β 1 มีผลในการยับยั้งระดับการแสดงออกของ *P63 (Δ Np63 isoform)* ซึ่งส่งผลต่อขบวนการเพิ่มจำนวน, คุณสมบัติในการแบ่งเซลล์ได้อย่างต่อเนื่องในช่วงระยะเวลาที่ยาวนาน (self-renewal) และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและคุณสมบัติภายใน (differentiation) แต่อย่างไรก็ดี ผู้วิจัยพบว่าเมื่อทำการยับยั้ง TGF- β 1 ช่วยเพิ่มความสามารถในการเกิด self-renewal จึงทำให้สามารถ long-term culture เซลล์ LESCs ได้นานถึง 5 เดือนภายในนอกร่างกาย (*in vitro*) ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ LESCs ภายนอก ร่างกายจนสามารถเพาะเลี้ยงและขึ้นแผ่นกระจกตาได้จำนวนมาก

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5674101930 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: TGF-B1 / NICHE / LESC

SUPAPORN KHRAMCHANTUK: Elucidating the role of activated niche signals in regulating Limbal epithelial stem cell proliferation and maintenance.

ADVISOR: ASST. PROF. DR.NIPAN ISRASENA, MD.,Ph.D., pp.

Limbal epithelial stem cells localized at the limbus region of the cornea (LESCs). LESCs are essential for the maintenance of corneal transparency and therefore for vision. LESCs are slow cycling in physiologic state but can be stimulated to proliferate in response to corneal injury signals. However, the mechanisms responsible for LESCs activation are not well understood. The aims of the present study were to examine the effect of TGF- β 1, key cytokine during corneal wound healing, on LESCs niche cells (limbal stromal cells or keratocytes) and directly on LESCs. The study we demonstrate that prolonged exposure of LESCs to TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) changes and are the decreased LESCs colony formation efficiency (CFE) cause of loss stemness. However, from secretome activated keratocytes secreted more VEGF, IL-6 than control and activated *NOG (NOGGIN)* and *GREM1 (GREMLIN1)* high expression in keratocytes and affect the properties of LESCs cells. In addition, TGF- β 1 inhibits expression levels of Δ Np63 isoform, which results in proliferation, self-renews and differentiation in the corneal regeneration process. Thus, our study successful when TGF- β 1 inhibited support the self-renewal, LESCs could long-term culture. The knowledge from this study can be used to further develop LESCs *in vitro* culture, expand the capacity of the corneal culture and make it possible to grow in the future.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2016

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร. นิพัทธ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และช่วยเหลือให้คำแนะนำปรึกษาปัญหาต่างๆในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้จนสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผศ.พญ.วิลาวัลย์ พวงศรีเจริญ หัวหน้าภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้อนุมัติให้ทำการเก็บส่วน corneal scleral rim (Limbal ring) ที่เหลือไม่ใช้แล้วของดวงตาผู้บริจาคที่เสียชีวิตได้นำมาใช้ในการวิจัยในครั้งนี้

กราบขอบพระคุณ ศ. ดร. นพ.อภิวัฒน์ มุทิรางกูร ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ และ ดร. นพ. เวสารัช เวสสโกวิท ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบทุกท่านที่กรุณาสละเวลาและให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ดียิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ดร.แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ ผู้ดูแลและช่วยเหลือทุกอย่างตลอดเวลาที่ผ่านมา ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัดทุกท่าน ตลอดจน ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	2
สมมติฐานของงานวิจัย (Hypothesis).....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
รายละเอียดเกี่ยวกับ Limbal epithelial stem cell (LESCs).....	4
บทบาทและความสำคัญของสภาพแวดล้อมจุลภาค (Niche) และกลไกการถ่ายทอด สัญญาณระดับโมเลกุลภายในเซลล์ (signaling pathway) ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs) ในภาวะบาดเจ็บและซ่อมแซม	11
สภาพแวดล้อมจุลภาค (Niche).....	11
The Corneal Wound Healing Response	12
กลไกการถ่ายทอดสัญญาณระดับโมเลกุลภายในเซลล์ (signaling pathway).....	13
TGF- β Superfamily signaling	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	19
วัสดุและอุปกรณ์.....	19
เซลล์ที่ใช้ทดสอบ	19

อุปกรณ์.....	20
สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....	20
วิธีดำเนินงานวิจัย	20
1. การเตรียมเซลล์พี่เลี้ยง (Feeder cells).....	20
2. การแยก และเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) limbal stem cells จาก limbal ring	21
3. การแยกและเลี้ยงเซลล์ keratocytes.....	21
4. การสกัด RNA การสร้าง cDNA	22
5. การทำ real time PCR.....	23
6. การย้อม immunofluorescence.....	23
7. การทำ Chromatin immunoprecipitation	24
8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	25
9. ศึกษาผลกระทบของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs) โดยตรง	26
9.1 ศึกษาผล TGF- β 1 ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิด.....	26
9.2 ศึกษาผล TGF- β 1 ลดคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิด LESCs โดยทำให้เกิด EMT	26
9.3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ LESCs ระยะยาวภายนอกร่างกาย (Long-term culture) โดยการยับยั้ง TGF	27
10. ศึกษาผลกระทบทางอ้อมของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs).....	28
10.1 Inflammatory cytokine หลังมากขึ้นหลังจากที่ keratocytes ถูก กระตุ้นด้วย TGF- β 1.....	28

10.2	ศึกษาเซลล์ keratocytes มีการแสดงออกของ BMP antagonist มากขึ้น อย่างจำเพาะเมื่อสัมผัสกับ TGF- β 1.....	29
10.3	ศึกษาผล BMP antagonist ที่มีต่อการเกิด Differentiate ในเซลล์ LESCs	29
10.4	ศึกษาผลของ Gremlin ที่มีต่อ LESCs.....	31
11.	ศึกษาผลของ TGF- β 1 ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง p63 isoforms ในเซลล์ LESCs.....	31
บทที่ 4	การวิเคราะห์ข้อมูล	33
1.	ผลกระทบโดยตรงของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs).....	33
1.1	เซลล์ LESCs ลดความเป็น stemness เมื่อสัมผัสกับ TGF- β 1 โดยตรง.....	33
1.2	ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ LESCs ระยะยาวภายนอกร่างกาย (Long-term culture) โดยการยับยั้ง TGF ด้วย TGF inhibitor	36
2.	ผลกระทบทางอ้อมของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs).....	38
2.1	Inflammatory cytokine หลังมากขึ้นหลังจากที่เซลล์ keratocytes ถูกกระตุ้น ด้วย TGF- β 1	38
2.2	เซลล์ keratocytes มีการแสดงออกของ BMP antagonist มากขึ้นอย่างจำเพาะ เมื่อสัมผัสกับ TGF- β 1.....	39
2.3	BMP antagonist ที่มีต่อคุณสมบัติของเซลล์ LESCs	41
3.	กลไกที่ TGF- β 1 ควบคุม self-renewal ในเซลล์ LESCs.....	44
3.1	ผลของ TGF- β 1 ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง P63 isoforms ในเซลล์ LESCs.....	44
3.2	ตรวจสอบโปรตีน Smad2/3 จับบริเวณ Δ Np63 promoter.....	45
บทที่ 5	อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	48
	รายการอ้างอิง	50
	ภาคผนวก.....	56

ญ

หน้า

3t3 overexpress <i>NOG</i>	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	62



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง stem cell markers ใน human ocular surface epithelia ในบริเวณต่าง ๆ	10
ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด EMT	27
ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน (BMP antagonist)	29
ตารางที่ 4 แสดงไพรเมอร์ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ LSCs เจริญอยู่บน 3t3 gremlin.....	31
ตารางที่ 5 แสดงไพรเมอร์ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน P63 isoforms.....	32

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของชั้นต่าง ๆ ของผิวกระจกตา	5
ภาพที่ 2 แสดงภาพผิวกระจกตาในภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา (Limbal Stem Cell Deficiency-LSCD)	5
ภาพที่ 3 แสดงภาพก่อนและหลังการปลูกถ่ายด้วย autologous limbal cultures ซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี.....	6
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะโคโลนี 3 แบบของเซลล์ keratinocytes.....	7
ภาพที่ 5 แสดง Epithelium ของกระจกตาบริเวณ 3 บริเวณ คือ Corneal epithelium, Limbal epithelium, Conjunctival epithelium.....	7
ภาพที่ 6 แสดง Corneal Wound Healing cascade	13
ภาพที่ 7 เซลล์ในชั้น basal บริเวณ cornea epithelium และ limbal epithelium (limbus) แสดง TGF β -RII.....	14
ภาพที่ 8 แสดง TGF- β Superfamily signaling transduction.....	15
ภาพที่ 9 P63 transcription factor ทั้ง 6 isoform ประกอบด้วย 2 promoters คือ TA promotor และ Δ Np promotor.....	16
ภาพที่ 10 บทบาท Transcription factors P63 ต่อ corneal cell functions	17
ภาพที่ 11 แสดง %CFE และโคโลนีที่ย้อมด้วย Rhodamine B ของเซลล์ LSCs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1.....	34
ภาพที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ LSCs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1	35
ภาพที่ 13 แสดงการวิเคราะห์ผลโดยการย้อม Vimentin ด้วยเทคนิค immunofluorescence ของเซลล์ LSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1	35
ภาพที่ 14 แสดงผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด EMT เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ LSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 และเซลล์ LSCs ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1.....	36

ภาพที่ 15	เปรียบเทียบความสามารถในการเพาะเลี้ยงเซลล์ LESC ในระยะยาระหว่างเซลล์ LESC ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ TGF inhibitor (14 passage) กับเซลล์ LESC ที่เพาะเลี้ยงแบบไม่ใส่ TGF inhibitor (≥ 3 passage).....	37
ภาพที่ 16	แสดงผล flow cytometry ของเซลล์ LESC ที่ผ่านการทำ genome editing จะเห็นว่าสามารถตัด HLA ได้.....	37
ภาพที่ 17	แสดงผลปริมาณ cytokine ที่หลั่งจากเซลล์ keratocytes เมื่อถูกกระตุ้นด้วย.....	39
ภาพที่ 18	แสดงผล RT-PCR ในการแสดงออกของยีน <i>NOG</i> , <i>GREM</i> และ <i>VEGF</i> อย่างแตกต่างในเซลล์ keratocytes (A) เมื่อเทียบกับ dermal fibroblast (B) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1.....	40
ภาพที่ 19	แสดงผลระดับการแสดงออกของ <i>GREM</i> ใน stable cell line และลักษณะโคลนยีของเซลล์ LESC ที่เจริญบน stable cell line แต่ละ clone.....	42
ภาพที่ 20	แสดงการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค immunofluorescence ย้อมด้วยแอนติบอดี Vimentin.....	42
ภาพที่ 21	แสดงการเปรียบเทียบจำนวน %CFE ของเซลล์ LESC ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 gremlin#1, 3t3 gremlin#5 และเซลล์ 3t3	43
ภาพที่ 22	แสดงผลการแสดงออกของยีน <i>KRT1</i> , <i>KRT10</i> , <i>KRT12</i> และ <i>FN</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเซลล์ LESC ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 และ 3t3 gremlin#1	43
ภาพที่ 23	แสดงผล RT-PCR ของ $\Delta Np63$ isoforms	45
ภาพที่ 24	แสดงผล RT-PCR ของ <i>TAp63</i> isoform.....	45
ภาพที่ 25	แสดงผลการย้อม nuclear Smad2/3 โดยวิธี immunofluorescence ในเซลล์ LESC.....	46
ภาพที่ 26	แสดงผล fold enrichment ที่ได้จาก CHIP-RT PCR	47
ภาพที่ 27	แสดงลักษณะแผ่นกระจกตาที่มาจากชิ้นเนื้อขนาด 2x2 mm ทำการเพิ่มจำนวนและขึ้นแผ่นกระจกตา.....	49
ภาพที่ 28	แสดงลักษณะโคลนยีของเซลล์ LESC ที่เจริญบน 3t3 noggin ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มหรือกระจุกเซลล์.....	57

ภาพที่ 29	A: แสดงการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค immunofluorescence ย้อมด้วยแอนติบอดี $\Delta Np63\alpha$ ในเซลล์ LESC s B: แสดงการเปรียบเทียบจำนวน %CFE ของเซลล์ LESC s ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 และ 3t3 noggin	58
ภาพที่ 30	A: แสดงการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค immunofluorescence ย้อมด้วยแอนติบอดี K10 ในเซลล์ LESC s ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 และ 3t3 noggin B: แสดงผลการแสดงออกของยีน <i>KRT1</i> และ <i>KRT1</i> ด้วยเทคนิค RT-PCR.....	58
ภาพที่ 31	แสดงลักษณะเซลล์ LESC s ที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปหลังจากผ่านการย่อยด้วย 0.25% Trypsin/EDTA	59
ภาพที่ 32	แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน <i>NOG</i> ใน stable cell line ด้วย เทคนิค RT-PCR.....	60
ภาพที่ 33	แสดงลักษณะเซลล์ LESC s ที่เจริญบน 3t3 overexpress <i>NOG</i> ในแต่ละ clone...	60
ภาพที่ 34	แสดงผล microarray ของเซลล์ 3t3, 3t3 noggin, 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone1 และ 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone6; 3t3 noggin.....	61

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

/	Per
%	Percent
μ l	Microliter (s)
μ M	Micromoles
$^{\circ}$ C	Degree Celsius
Δ	Delta
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
ABCB5	ATP binding cassette subfamily B member
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
BCP	1-Bromo-3-chloropropane
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	base pair (s)
BSA	Bovine serum albumin
cDNA	Complementary DNA
%CFE	Percent colony forming efficiency
ChIP	Chromatin Immunoprecipitation
dNTP	Deoxy ribonucleotide triphosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
E-cad	E-cadherin
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
FBS	Fetal bovine serum

FN	Fibronectin
GRAM	Gremlin
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HLA	Human leukocyte antigen
IL	Interleukin
LESCs	Limbic epithelial stem cell
NaCl	Sodium chloride
NaHCO ₃	Sodium bicarbonate
N-cad	N-cadherin
ng	Nano gram (s)
nm	Nanometer
NOG	Noggin
ml	Milliliter(s)
mRNA	Messenger RNA
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse transcription
SMAD2/3	SMAD family member 2/3
TACs	Transient amplifying cells
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vim	Vimentin

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Limbal epithelial stem cells (LESCs) จัดเป็น tissue-specific stem cell ชนิดหนึ่ง อยู่ในบริเวณ palisades of Vogt ซึ่งเต็มไปด้วยเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวสูง และอยู่ในชั้น basal ของบริเวณ Limbus epithelial ที่อยู่ระหว่างตาขาว (Conjunctiva) และผิวกระจกตา (Corneal) (Kinoshita et al., 2001) โดยเซลล์ LESCs จะทำหน้าที่ผลิตเซลล์ที่จะเจริญและพัฒนาไปเป็นเซลล์กระจกตา (Corneal epithelial) ในสภาวะปกติจะมีการแบ่งตัวน้อยมากเพื่อให้สามารถคงสภาพเดิมและรักษาระดับสมดุลของเซลล์ในระบบ แต่จะมีการแบ่งตัวมากขึ้นเมื่อมีการซ่อมแซมผิวกระจกตาที่สึกหรอหรือถูกทำลายไป โดยเซลล์ต้นกำเนิด (stem cell) หนึ่งเซลล์จะแบ่งตัวได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ตั้งต้นเดิมทุกประการหนึ่งเซลล์ และได้ Transient amplifying cells (TACs) อีกหนึ่งเซลล์ซึ่ง TACs cells เป็น cells ที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาจำกัด จากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนที่ไปสู่บริเวณกระจกตา เพื่อสร้างเป็นเซลล์ผิวกระจกตาใหม่ (Jones, Simons, & Watt, 2007)

ในภาวะเซลล์ต้นกำเนิดของผิวกระจกตาเสื่อม หรือ limbal stem cell deficiency สาเหตุเกิดจากถูกสารกรดหรือด่างเข้าตา (Chemical burns) กระจกตาติดเชื้ออย่างรุนแรง (Severe infectious keratitis) โรคสตีเวนส์จอห์นสัน (Stevens-Johnson Syndrome) (Tseng, 1989) (Graziella Pellegrini et al., 1997) ซึ่งมีอาการอักเสบเรื้อรังรุนแรงของเยื่อบุตา โรคหรือภาวะเหล่านี้ทำให้มีการทำลายเซลล์ LESCs ทั้งหมดหรือมีการพร่องหายไปบางส่วน ประกอบกับคุณสมบัติในการแบ่งตัวมาซ่อมแซมแผลที่เกิดขึ้นของเซลล์ LESCs หายไป ทำให้เกิดการอักเสบและมีแผลถลอกเรื้อรังของกระจกตา ตามมาด้วยเกิดการงอกของเยื่อบุตาขาว (Conjunctival invasion) พร้อมเส้นเลือดลึกลงเข้าไปในกระจกตา (Corneal vascularization) เรียกภาวะนี้ว่าผิวกระจกตาล้มเหลว (Ocular surface failure) หรือโรคผิวกระจกตา (Ocular surface diseases) ผลที่ตามมาจากสภาวะดังกล่าวทำให้กระจกตาขุ่นและผู้ป่วยสูญเสียการมองเห็นในที่สุด สำหรับการรักษารักษาโรคผิวกระจกตานั้นต้องอาศัยการปลูกถ่ายเซลล์ LESCs แต่ยังมีข้อจำกัดในการนำมาใช้คือพบว่าเมื่อนำเซลล์ LESCs มาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายจะมีการเพิ่มจำนวนได้อย่างจำกัด โดยพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้เพียง 1-2 passage และการคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจะสูญเสียเมื่อเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 1-2 เดือน นอกจากนี้ยังพบปัญหาการปลูกถ่ายเซลล์ LESCs ในบางกรณีได้ผลไม่ดี เช่น ในโรคสตีเวนส์จอห์นสัน พบว่าหลังจากการปลูกถ่ายเซลล์ LESCs แล้ว

แต่ผิวกระจกตาของผู้ป่วยกลับมาขุ่นอีก ซึ่งสาเหตุการที่ผิวกระจกตาทกลับมาขุ่นอีกครั้งอาจเกิดจาก เซลล์ LESC's ที่ปลุกถ่ายไปนั้นสูญเสียคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด แต่กลไกที่ทำให้เซลล์ LESC's ไม่สามารถคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดได้นั้นยังไม่ทราบว่าเกิดจากสาเหตุหรือกลไกใด หรืออาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมภายใน niche

การที่เซลล์ LESC's สามารถคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดได้ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะบาดเจ็บได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยบทบาท niche ของ LESC's เพื่อควบคุมความสมดุลให้กับเซลล์ LESC's ซึ่งความสมดุลดังกล่าวมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ในสภาวะที่ผิวกระจกตาได้รับบาดเจ็บหรือเกิดการเสียหาย จำเป็นต้องสร้างเซลล์ผิวกระจกตาใหม่เพื่อทดแทนเซลล์เก่าที่อาจตายจากสภาวะบาดเจ็บ โดย niche ถูกกระตุ้นทำให้สมดุลภายใน niche เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสัญญาณหรือกลไกในการรักษาสมดุลภายใน niche นั้นยังมีข้อมูลจำกัด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการ wound healing ในเซลล์ LESC's จะมีการหลั่งโปรตีนมากมาย ในการวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษา TGF- β 1 ซึ่งมีงานวิจัยหลายงานแสดงให้เห็นว่า TGF- β 1 มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับ stem cell ในภาวะ homeostasis ในหลาย ๆ อวัยวะ (Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004; W. Li, Hayashida, Chen, & Tseng, 2007) และยังมีข้อมูลว่า TGF- β 1 มีความสำคัญต่อกระบวนการ wound healing ของกระจกตา

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของ TGF- β 1 ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นในสภาวะบาดเจ็บของผิวกระจกตา มีผลต่อการคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์ LESC's และส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงภายใน niche ของเซลล์ LESC's อย่างไร niche signaling ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อถูกกระตุ้นมีผลต่อเซลล์ LESC's อย่างไร ทั้งนี้เพื่อจะนำไปสู่วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ LESC's เพื่อให้สามารถคงคุณสมบัติเซลล์ LESC's ได้ในระยะยาวในหลอดทดลอง และเพื่อเป็นแนวทางในการรักษาการโรคภาวะเซลล์ต้นกำเนิดของผิวกระจกตาเสื่อมโดยการฟื้นฟู niche ก่อนการปลุกถ่าย เซลล์ LESC's

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาบทบาทของ TGF- β signaling ที่มีต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนและคุณสมบัติของเซลล์ LESC's
2. เพื่อศึกษาการที่เซลล์ keratocytes ถูกกระตุ้นส่งผลกระทบต่อการรักษาสมดุลภายในสภาพแวดล้อม (niche), การแสดงออกของยีนและคุณสมบัติของเซลล์ LESC's อย่างไร
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง P63 และ smad4 signaling ในเซลล์ LESC's

สมมติฐานของงานวิจัย (Hypothesis)

1. TGF- β 1 เป็นตัวกระตุ้นเซลล์ keratocytes (stromal cell) หลังสารที่มีผลต่อการคงคุณสมบัติของเซลล์ LECs
2. BMP antagonist กระตุ้นเซลล์ LECs ที่อยู่ในสภาวะ quiescence เข้าสู่ cell cycle
3. การทำงานของ P63 อาจต้องการ Smad ในการควบคุมการแสดงออกของ target ยีนบางตัวสำคัญต่อ self-renewal

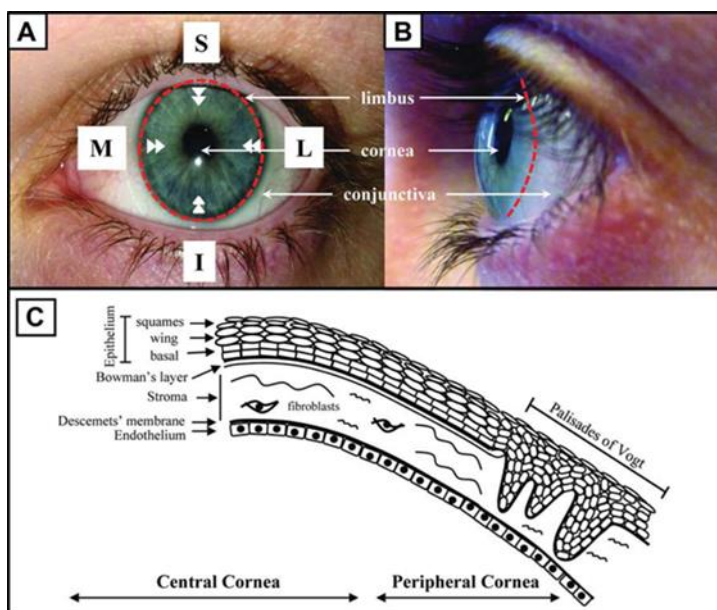


บทที่ 2

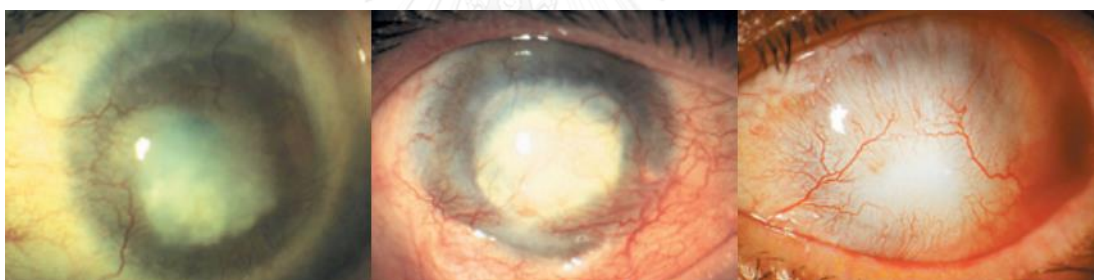
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รายละเอียดเกี่ยวกับ Limbal epithelial stem cell (LESCs)

กระจกตา (Corneal) มีโครงสร้างประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงตัวกันหลายชั้น (lamellar-structured) ประกอบด้วยชั้นของ epithelium, stroma และ endothelium ในชั้นของ epithelium เป็นชั้นที่อยู่ด้านนอกสุดของดวงตาหรือชั้นของเซลล์ผิวกระจกตา (Corneal epithelium) ประกอบด้วยเซลล์เรียงตัวเป็นชั้นจำนวน 3 ชั้นคือชั้น basal, wing และ squames (Ordonez & Di Girolamo, 2012) ชั้นถัดมาเป็นชั้นของ stroma ประกอบด้วยเซลล์ keratocytes โดยมี Bowman มีลักษณะเป็น membrane แบ่งแยกระหว่างชั้น epithelium และ stroma ในชั้น endothelium เป็นชั้นที่อยู่ด้านในสุด มีเพียงชั้นเดียวเท่านั้น และมี Descemets membrane กั้นระหว่าง stroma กับชั้น endothelium เซลล์ผิวกระจกตาจะมีการผลัดเปลี่ยนตลอดเวลา โดยเซลล์ชั้นบนจะหลุดลอกออกและถูกทดแทนด้วยเซลล์ในชั้นล่างถัดลงมา จะมีการแบ่งตัวและเจริญอยู่ตลอดเวลา มีเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา (Limbal epithelial stem cell-LESCs) อยู่บริเวณริมขอบกระจกตา (Cornea-limbal area) ทำหน้าที่เป็นเซลล์เริ่มต้นแบ่งตัวและเติบโตเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ผิวกระจกตาในชั้นต่าง ๆ ในภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา (Limbal Stem Cell Deficiency-LSCD) (Nishida et al., 2004) ในโรคบางชนิดเช่น Stevens–Johnson syndrome (Solomon et al., 2002) หรืออุบัติเหตุที่เกิดขึ้นกับดวงตามีผลทำให้มีการทำลายของเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา ส่งผลทำให้เกิดการเจริญของเยื่อตาขาว (Conjunctival invasion) พร้อมเส้นเลือดลุกล้ำเข้าไปในกระจกตา (Corneal vascularization) เราเรียกภาวะนี้ว่าผิวกระจกตาล้มเหลว (Ocular surface failure) หรือโรคผิวกระจกตา (Ocular surface diseases) ผลที่ตามมาจากสภาวะดังกล่าวทำให้กระจกตาขุ่นและผู้ป่วยสูญเสียการมองเห็นในที่สุด



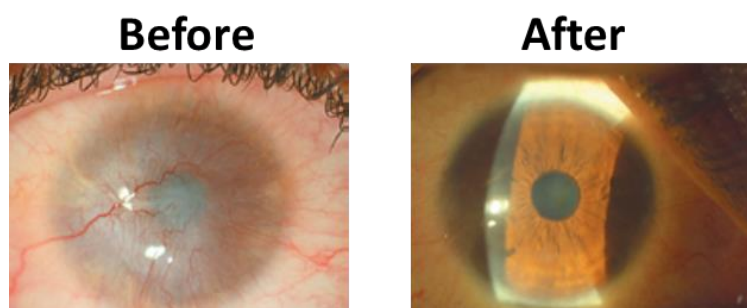
ภาพที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างของชั้นต่าง ๆ ของผิวกระจกตา (Ordonez & Di Girolamo, 2012)



ภาพที่ 2 แสดงภาพผิวกระจกตาในภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา (Limbal Stem Cell Deficiency-LSCD) (Rama et al., 2010)

Limbal epithelial stem cell (LESCs) จัดเป็น adult stem cell (Solomon et al., 2002) ซึ่งจะเจริญไปเป็นกระจกตา และสามารถสร้างเซลล์กระจกตาขึ้นมาใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่เสียหายได้ โดยลักษณะของเซลล์ LESCs นั้นมีรูปทรงลูกบาศก์มีขนาดเล็ก มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ เกือบเต็มเซลล์ สามารถแบ่งตัวได้ไม่จำกัด (self-renewal) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมภายนอกร่างกายสามารถเพิ่มจำนวนมีลักษณะเป็นโคโลนี (colony forming) นอกจากนี้คุณสมบัติของ stem cell จะแบ่งตัวช้า (slow cycling) ทำให้ย้อมติดสี DNA ได้นานกว่าเซลล์ชนิดอื่น ๆ (label-retaining cells) (Secker & Daniels, 2008; Solomon et al., 2002) การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจะได้ TACs เป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็วในระยะเวลาจำกัด

โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือเซลล์ถูกทำลาย มีการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นทดแทน (wound healing)

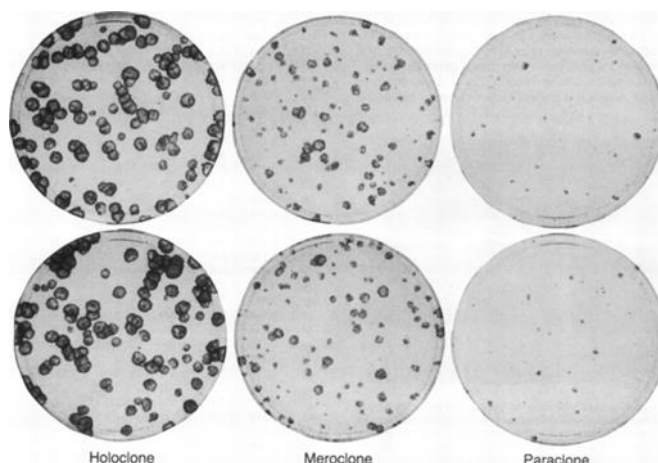


ภาพที่ 3 แสดงภาพก่อนและหลังการปลูกถ่ายด้วย autologous limbal cultures ซึ่งประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี (Rama et al., 2010)

โดยในปี 1989 Tseng และคณะสามารถแยกเซลล์ LSCs ออกมาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย (Tseng, 1989) ในปี 1997 Pellegrini และคณะสามารถปลูกถ่ายเซลล์ LSCs ให้กับผู้ป่วยที่มีภาวะขาดแคลนเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ผิวกระจกตา (Limbal Stem Cell Deficiency-LSCD) ได้สำเร็จ (Graziella Pellegrini et al., 1997) จากคุณสมบัติของเซลล์ LSCs ที่สามารถเจริญเป็นกลุ่มเซลล์ (clonogenic capacity หรือ colony forming) เมื่อเพาะเลี้ยงบน 3t3 feeder cells ในปี 1999 Pellegrini และคณะ ได้ทำการศึกษา epithelium ของกระจกตาในบริเวณต่างๆ พบสามารถเจริญเป็นโคโลนีได้ 3 แบบ เซลล์ในบริเวณ limbus เจริญเป็น holoclone มากที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์ในบริเวณอื่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบริเวณดังกล่าวมีเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดอยู่ (G. Pellegrini et al., 1999) โดยลักษณะโคโลนีของเซลล์ LSCs นั้นมีลักษณะคล้ายกับโคโลนีที่แยกได้จากเซลล์ keratinocytes โดยการศึกษา Barrandon and Green 1987 สามารถจำแนกลักษณะโคโลนีของเซลล์ keratinocytes ออกได้ 3 แบบ (Barrandon & Green, 1987) และพบว่าโคโลนีแต่ละแบบนี้แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของเซลล์ภายในโคโลนี ว่ามีความสามารถในการเพิ่มจำนวนและคงคุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดแตกต่างกันไปซึ่งลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นได้แก่

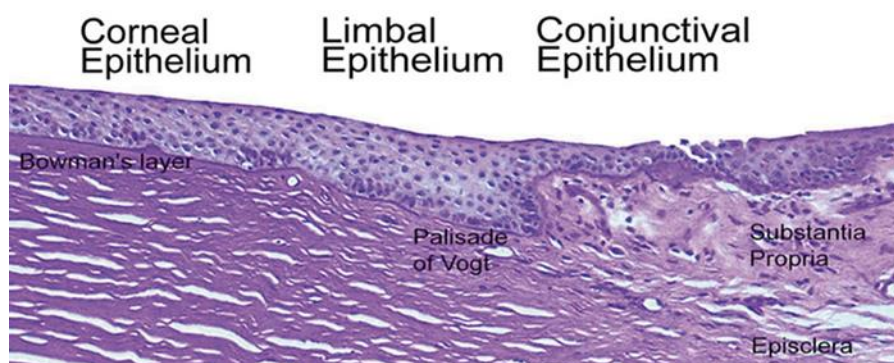
- Holoclone โคโลนีหนานูน มีขนาดใหญ่และขอบเรียบ ประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็ก 80-100 เซลล์ ซึ่งเป็น undifferentiated cells ที่เชื่อว่ามีคุณสมบัติในการ self-renewal และมี proliferative capacity สูง

- Meroclone มีขนาดเล็กกว่า Holoclon ขอบโคโลนีแผ่แบนไม่เรียบ เซลล์มีการลดหรือเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเป็น epithelium เชื่อว่าประกอบด้วย TACs
- Paraclone โคโลนีขนาดเล็กและประกอบด้วย terminally differentiating cells ที่หยุดการแบ่งตัว



ภาพที่ 4 แสดงลักษณะโคโลนี 3 แบบของเซลล์ keratinocytes (Barrandon & Green, 1987)

ชั้น epithelium ของกระจกตานั้นพบว่ามีลักษณะพิเศษ คือสามารถแบ่งออกได้ 3 บริเวณ คือ Corneal epithelium เป็นบริเวณ epithelium ของกระจกตา, Limbal epithelium หรือ Limbus เป็นบริเวณที่เชื่อว่าเป็นที่อยู่ของ LSCs โดยเรียงตัวอยู่ในชั้น basal, Conjunctival epithelium เป็นบริเวณ epithelium ของตาขาว (Lauweryns, van den Oord, & Missotten, 1993)



ภาพที่ 5 แสดง Epithelium ของกระจกตาบริเวณ 3 บริเวณ คือ Corneal epithelium, Limbal epithelium, Conjunctival epithelium (Nishida et al., 2004)

Limbal epithelium หรือ Limbus จะว่ามีบริเวณที่เรียกว่า Palisades of Vogt (Secker & Daniels, 2008) ในชั้น basal เป็นบริเวณที่อยู่ของเซลล์ LSCs ในบริเวณดังกล่าวรายล้อมด้วยเซลล์หลายชนิด ซึ่งประกอบด้วย melanocytes (Davanger & Evensen, 1971) ป้องกันการทำลายเซลล์จากรังสีอัลตราไวโอเล็ต และมี antigen-presenting Langerhan's cell (Baum, 1970) และ T-lymphocytes (Vantrappen, Geboes, Missotten, Maudgal, & Desmet, 1985) และแทรกอยู่ด้วย Limbal epithelial stem cells จะถูกรองรับด้วย stroma cells เป็นเซลล์ที่มีการแสดงออกของ integrin และ N-cadherin ในส่วนของ extra cellular matrix ในบริเวณ limbal basement membrane นั้นประกอบไปด้วย laminin-1, -5, $\alpha 2\beta 2$ chains, type IV collagen- $\alpha 1$, - $\alpha 2$, - $\alpha 5$ chains (Ljubimov et al., 1995; Tuori, Uusitalo, Burgeson, Terttunen, & Virtanen, 1996) นอกจากนี้ภายใต้ basement membrane นั้นเต็มไปด้วยเส้นเลือดและเส้นประสาทมากมาย แสดงให้เห็นว่า limbal basement membrane (Lawrenson & Ruskell, 1991) มีความสำคัญในการควบคุมระดับความเข้มข้นของ cytokine, growth factor และ signaling molecule ที่หลังจากเซลล์รอบข้างและหลอดเลือดให้เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ LSCs (Klenkler & Sheardown, 2004) จากการศึกษาพบว่าในแต่ละบริเวณมีการแสดงออกของ marker แตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณดังแสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่าในชั้น basal ในบริเวณของ cornea epithelium และ limbal epithelium (limbus) มีการแสดงออกของ TGF β -RII ซึ่งเป็น receptor ของ TGF- β

เมื่อพิจารณา marker ต่าง ๆ ที่แสดงออกอย่างจำเพาะในแต่ละบริเวณนั้นพบว่า marker สามารถบ่งบอกความเป็น stem cell และ differentia cell ได้ดังนี้

Stem cells makers

Cytokeratin pair K5 and K14: Cytokeratin หรือ Keratins ในกลุ่มของ cytoskeleton protein ที่สร้างเป็น intermediate filament อยู่ภายใน epithelial cells มีรูปแบบการแสดงออกเปลี่ยนไปตามการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และจะพบการแสดงออกของ K5/K14 ในชั้น basal ของ corneal, limbal และ conjunctival epithelium (Barnard, Apel, & Harkin, 2001) รวมถึงใช้เป็น marker ของเซลล์ keratinocyte (Wang, Hsueh, Yang, & Chen, 2003) ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในผิวหนังและใช้ในการแยก epidermal stem cells

Δ Np63 α : p63 เป็น homolog ของ p53 เป็น transcription factor มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงของ epithelium ในบริเวณกระจกตา Δ Np63 α isoform มีการแสดงออกอย่างจำเพาะในบริเวณชั้น basal ของ Limbal epithelium แต่ไม่พบในบริเวณ

Corneal epithelium (G. Pellegrini et al., 2001) และยังปรากฏใน Holoclone ซึ่งเป็นโคลนที่เกิดการแบ่งตัวของเซลล์ LESC's แต่ไม่พบใน paraclone ซึ่งเป็นโคลนของ TACs นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกในเซลล์ผิวหนังที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว

ABCG2 หรือ ATP binding cassette transporter มีการนำมาใช้เป็น marker ของเซลล์ต้นกำเนิดหลายชนิด มีการแสดงออกที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์และใน cytoplasm ของเซลล์ในชั้น basal บริเวณของ Limbal epithelium เท่านั้น ไม่พบในชั้น Suprabasal และไม่พบในบริเวณ Corneal epithelium (de Paiva, Chen, Corrales, Pflugfelder, & Li, 2005) เซลล์ที่มีการแสดงออก ABCG2 พบว่าสามารถเกิด colony-forming ได้สูงกว่าเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของ ABCG2 จึงเชื่อว่าน่าจะสามารถใช้เป็น stem cell maker สำหรับเซลล์ LESC's ได้

Keratin19: เชื่อว่าเป็น marker ของ proliferating keratinocytes ในผิวหนัง และ epidermal stem cell ใน hair follicles (Michel et al., 1996) พบว่าแสดงออกอย่างชัดเจนใน cytoplasm ของเซลล์ epithelial ในชั้น basal บริเวณ Limbal epithelium เท่านั้น ไม่พบในบริเวณ Corneal epithelium (Z. Chen et al., 2004)

ABCB5: ใช้เป็น marker ของ skin progenitor cells และ melanoma stem cells ซึ่งมีหน้าเกี่ยวข้องกับการควบคุม cellular differentiation นอกจากนี้ยังพบว่าในกระจกตา ABCB5 มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการ LSC maintenance, corneal development และ repair โดยพบในชั้น basal บริเวณ Limbal epithelium เท่านั้น ไม่พบในบริเวณ Corneal epithelium (Ksander et al., 2014)

Differentiation marker

Connexin43 เป็น Gap junction protein ช่วยในการขนส่งไอออน, metabolites ที่มีขนาดเล็กและ second messengers ระหว่างเซลล์ ใช้เป็น negative marker สำหรับเซลล์ LESC's (Z. Chen et al., 2004) เนื่องจากพบว่ามีแสดงออกในบริเวณ Corneal epithelium และบริเวณ Limbal epithelium ในชั้น suprabasal เท่านั้น Gap junction เป็นตัวกลางในการติดต่อสื่อสารระหว่างเซลล์และส่งผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโต การพัฒนา การเปลี่ยนแปลงและการรักษาสมดุลของเซลล์ ดังนั้น Connexin43 จึงแสดงออกใน differentiated corneal, TACs (Wolosin, Xiong, Schutte, Stegman, & Tieng, 2000) และการไม่ปรากฏของ Gap junction ในเซลล์ LESC's จึงถือเป็นกลไกหนึ่งของ stem cell ในการป้องกันการรบกวนจากเซลล์รอบข้าง

CytokeratinK3/K12 มีการแสดงออกอย่างจำเพาะในบริเวณ Corneal epithelium และปรากฏในเซลล์ที่กำลังเคลื่อนตัวจาก limbus ไปยังบริเวณ corneal stroma ซึ่งเป็นระยะที่

stem cell มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น TACs จึงถือว่าเป็น marker ของ corneal epithelial differentiation (Grueterich, Espana, & Tseng, 2003)

ตารางที่ 1 แสดง stem cell markers ใน human ocular surface epithelia ในบริเวณต่าง ๆ (Schlotzer-Schrehardt & Kruse, 2005)

Markers	Corneal epithelium		Limbal epithelium		Conjunctival epithelium	
	Basal	Suprabasal	Basal	Suprabasal	Basal	Suprabasal
Cytoplasmic/nuclear markers						
Keratin K3/K12	++	++	-	+	-	-
Keratin K5/K14	-or(+)	-	+	(+)	++	-
Keratin K19	-	-	++	-	(+)	++
Vimentin	-	-	++	(+)	-	-
α -enolase	(+)	-	++	(+)	++	-
Metallothionein	-	+	(+)	+	-	+
p63	(+)	-	++	(+)	(+)	-
Nestin	++	++	-	-	-	-
Cell surface markers						
Connexin 43	++	+	-	+	-	-
E-cadherin	++	++	(+)	++	(+) or +	++
P-cadherin	(+)	-	- or (+)	-	(+)	-
β -catenin	++	++	++	++	++	++
Integrin α 2	++	+	- or ++	+	++	++
Integrin α 3	++	+	- or ++	+	++	+
Integrin α 6	++	+	- or ++	+	++	+
Integrin α v	++	+	++	+	++	+
Integrin α 1	++	+	++	+	+	+
Integrin β 2	+	+	+	+	+	+
Integrin β 4	++	+	- or +	++	++	+

Integrin β 5	+	-	+	(+)	+	-
Integrin α 3 β 1	++	+	-or+	++	++	+
EGF-R	++	+	++	+	++	+
KGF-R bek	-	-	(+)	-	-	-
HGF-R met	(+)	-	(+)	-	-	-
NGF-R TrkA	+	(+)	+	-	- or(+)	-
Transferrin-R CD71	- or (+)	+	-or (+)	+	- or(+)	+
TGF- β -RI	++	+	++	+	++	(+)
TGF- β -RII	++	+	++	+	++	-
ABCG2	-	-	++	-	-	-

บทบาทและความสำคัญของสภาพแวดล้อมจุลภาค (Niche) และกลไกการถ่ายทอดสัญญาณระดับโมเลกุลภายในเซลล์ (signaling pathway) ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs) ในภาวะบาดเจ็บและซ่อมแซม

สภาพแวดล้อมจุลภาค (Niche)

Stem cell ทุกชนิดต้องการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (microenvironment หรือ niche) ต่อการอยู่รอดและควบคุมสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดต้องอาศัยปัจจัยสำคัญทั้งภายใน เช่น transcription factors และปัจจัยภายนอกได้แก่ cell signaling, growth factors และ cytokines จากเซลล์รอบข้างซึ่งรวมเรียกรวมสภาพแวดล้อมเหล่านี้ว่า niche โดยบทบาทของ niche จะควบคุมรักษาสมาคมเซลล์ในภาวะที่เซลล์ได้รับบาดเจ็บระหว่างสภาวะ quiescence กับสภาวะ activation ของเซลล์ต้นกำเนิด นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเกิด self-renewal การรักษาสภาพ undifferentiated ควบคุมการเพิ่มจำนวน (proliferation) และ cell fate decision (Fuchs, Tumber, & Guasch, 2004; Moore & Lemischka, 2006) แนวคิดเกี่ยวกับ stem cell niche นั้นเริ่มมาจากการศึกษา Hematopoietic stem cells (Moore & Lemischka, 2006) ซึ่งเชื่อว่ามีส่วนช่วยในการควบคุมสมบัติ quiescence ของ long term HSCs สำหรับ Epithelial stem cells มีการศึกษาถึง niche กันอย่างกว้างขวางและแม้ว่า Epithelial stem cells ในแต่ละอวัยวะจะมีความจำเพาะที่แตกต่างกัน จึงทำให้ยากต่อการระบุสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดได้ แต่ Epithelial stem cells ส่วนใหญ่จะมีปัจจัยในการควบคุมลักษณะทางชีวภาพร่วมกัน นอกจากนี้ยังมี cell adhesion molecules ต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญใน niche และมีบทบาทช่วยในการยึดเกาะ การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงไปเป็น

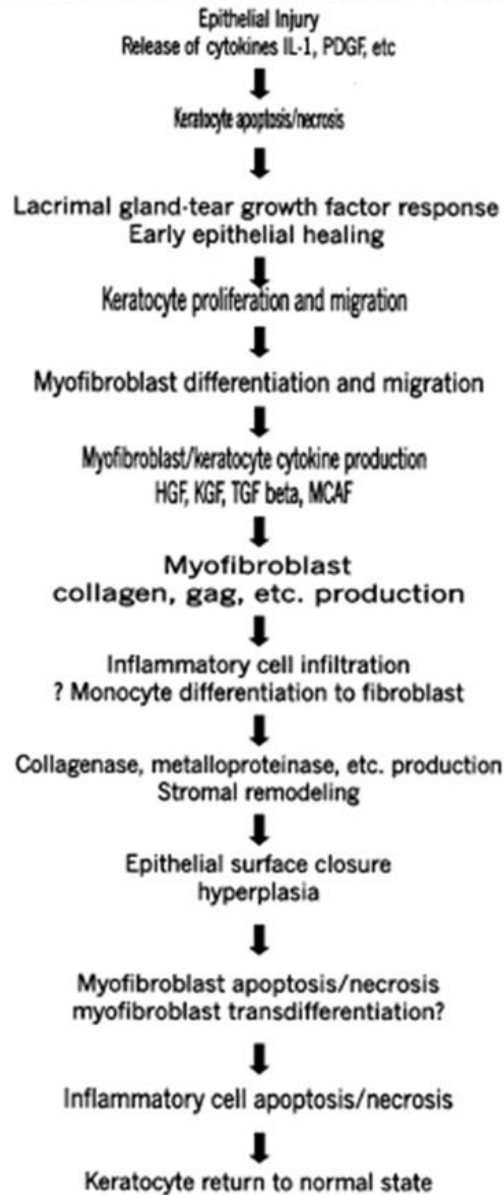
epithelial cells ที่สมบูรณ์ โดยธรรมชาติ limbal stem cell niche จะอยู่ในบริเวณ Palisades of Vogt ซึ่งเต็มไปด้วยเซลล์ที่มีการแบ่งตัวและอยู่ในชั้น basal ของ Limbus ซึ่งอยู่ระหว่าง Conjunctiva และ Corner ในกระบวนการซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหาย และ Transient amplifying cells (TACs) อีกหนึ่งเซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว ภายในระยะเวลาจำกัด และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเคลื่อนที่ไปสู่บริเวณกระจกตา เพื่อสร้างเป็น เซลล์ผิวกระจกตาใหม่

The Corneal Wound Healing Response

Wound healing คือกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อหลังจากเกิดบาดแผล กระบวนการ wound healing ของกระจกตานั้นจะมีการตอบสนองแบบ complex cascade ซึ่งเกี่ยวกับการ ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง cytokine กับ epithelial cells, keratocytes, corneal nerves, lacrimal glands, tear film และ immune cell ในบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บมีการหลั่งโปรตีน หรือ growth factor มากมายที่สำคัญกับกระบวนการ wound healing เช่น IL-1, epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF) พบว่าจะหลั่งมาจากเซลล์เหล่านี้ได้แก่ platelets, keratinocytes, macrophages (Katsuno, Lamouille, & Derynck, 2013)

จากกระบวนการ corneal wound healing cascade จะเห็นว่าเซลล์ keratocyte มีการหลั่ง TGF- β แต่ยังไม่มียข้อมูลว่า TGF- β ที่หลั่งมานั้นส่งผลต่อการคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ LSCs อย่างไร

CORNEAL WOUND HEALING CASCADE



ภาพที่ 6 แสดง Corneal Wound Healing cascade (Wilson et al., 2001)

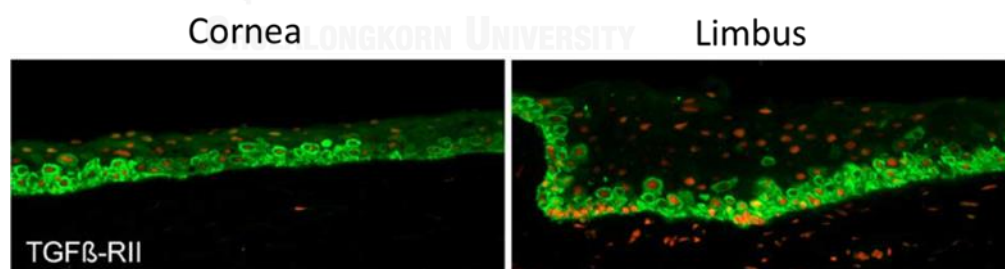
กลไกการถ่ายทอดสัญญาณระดับโมเลกุลภายในเซลล์ (signaling pathway)

ในสภาวะบาดเจ็บและภาวะที่ร่างกายต้องการสร้างเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนเซลล์เก่าที่ตายไป stem cell จำเป็นต้องสื่อสารกับ niche เพื่อให้เกิดกระบวนการ self-renewal และ fate decision ในการผลิต progeny โดยการสื่อสารนั้น stem cell ต้องอาศัยสัญญาณจากภายนอก (extrinsic signals) จากสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ (microenvironment) เช่น growth factor

ร่วมกับสัญญาณที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (intrinsic signals) เช่น signaling pathway, transcription factor โดยสามารถเกิดขึ้นแบบ cell-cell contact, cell-matrix contact หรือแบบ paracrine factor โดยผ่าน receptor มีการศึกษาเกี่ยวกับสัญญาณ (signaling pathway) ที่ใช้ในการสื่อสารระหว่าง stem cell กับ niche เช่น Sonic hedgehog (SHH) pathway, Wnt/ β -catenin pathway, Notch pathway และ TGF- β /BMP pathway (L. Li & Xie, 2005)

TGF- β Superfamily signaling

จากศึกษาพบว่าสัญญาณจาก TGF- β superfamily มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของตัวอ่อนเกี่ยวข้องกับ tissue homeostasis และ regeneration, immune responses, tumor suppression และกระบวนการ metastasis TGF- β superfamily ประกอบด้วย TGF- β s (TGF- β 1-3), bone morphogenetic proteins (BMPs), growth and differentiation factors (GDFs), anti-Müllerian hormone (AMH), Activins และ Nodal (Lapraz et al., 2006) ในการส่งสัญญาณนั้นจะส่งสัญญาณผ่านทาง Type I และ Type II Serine/Threonine kinase receptors (Schmierer & Hill, 2007) ทั้ง 2 ชนิดนี้จะอยู่เป็น Heterodimers กัน พบว่ามีการแสดงออกของ TGF β -RI และ TGF β -RII บริเวณ limbus มากกว่าบริเวณ central corneal epithelium อย่างเห็นได้ชัดในคนและหนู BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-7 โดย BMPRI และ BMPRII มีการแสดงออกใน human corneal epithelial cell และ keratocytes ซึ่ง BMPs ถูกพบมากบริเวณ stroma (Luo, Cui, Bian, & Yu, 2014)

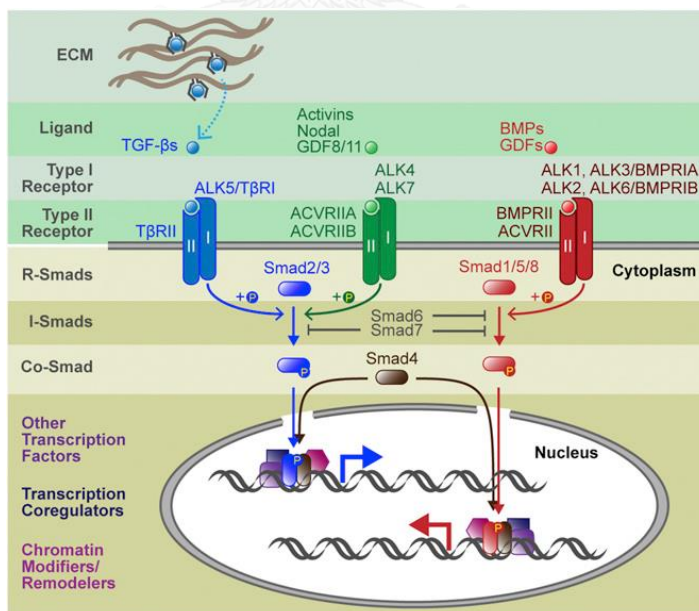


ภาพที่ 7 เซลล์ในชั้น basal บริเวณ cornea epithelium และ limbal epithelium (limbus) แสดง TGF β -RII (Schlotzer-Schrehardt & Kruse, 2005)

TGF β -RII เป็น receptor ที่จำเพาะสำหรับ TGF- β ligand หน้าที่ควบคุมการกระตุ้น downstream Smad และ non Smad pathways TGF β -RI จะถูก phosphorylated และไปเติมหมู่ phosphate ให้กับ receptor-regulated Smads (R-Smads) ส่วน BMPs ligand จับกับ Receptors คือ BMPRII ซึ่งเป็น receptor Type II ส่งผลให้ Type II ถูกกระตุ้นและเติม

หมู่ฟอสเฟสให้กับ Type I และส่งสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทาง BMP-Smad pathway หรือ BMP-MAPK pathway โดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ R-Smad โดยมี R-Smad1-8 ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นั้นแบ่งออกเป็น receptor-regulated Smad (R-smad) ได้แก่ Smad1, Smad5 และ Smad8 ซึ่งจะถูกระตุ้นโดย BMP-type I receptor ในขณะที่ A-Smad ได้แก่ Smad2 และ Smad3 จะถูกระตุ้นโดย activin และ TGF- β -RI โดยมี Smad4 เป็น Co-Smad เมื่อ R-Smads ถูกระตุ้น จะอยู่ในรูป heteromeric complexes กับ Co-Smad (Smad4) และจะ Translocate ไปยัง nucleus ไปจับกับ transcription factors, transcriptional co-activators หรือ co-repressors เพื่อควบคุมการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (Oshimori & Fuchs, 2012) Smad complex หรือ Smad binding element นั้นไม่เพียงพอต่อการควบคุม endogenous promoter สำหรับ target gene จำเป็นจะต้องจับกับ DNA binding transcription factor ตัวอื่นๆ ในการควบคุมการแสดงออกของยีน

ในการส่งสัญญาณเข้าสู่นิวเคลียสทั้งใน BMP และ TGF- β /activin signaling pathway และมี inhibitor Smad (I-Smad) ได้แก่ Smad6 และ Smad7 ทำหน้าที่ยับยั้ง BMP และ TGF- β /activin signaling โดย I-Smad จะแย่ง R-Smad ในการเข้าจับกับ activated type I receptor หรือเข้าจับกับ activated R-Smad เพื่อขัดขวางการเข้าจับกับ Co-Smad (Oshimori & Fuchs, 2012)

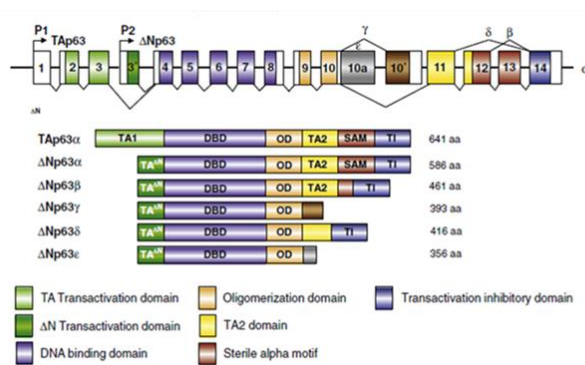


ภาพที่ 8 แสดง TGF- β Superfamily signaling transduction (Oshimori & Fuchs, 2012)

จากการศึกษาพบว่าทั้ง TGF- β signaling และ BMP signaling ใช้ co-Smad หรือ Smad4 ร่วมกัน มี common target ร่วมกัน แต่การศึกษาพบว่า intracellular concentration ของ Smad4 มีจำกัด (Miyazono, Maeda, & Imamura, 2005) ดังนั้น TGF- β signaling และ BMP signaling จำเป็นต้องแย่งจับ Smad4 ดังนั้น molecular mechanism ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมสมบัติในเซลล์ LECSs อาจเกิดจากการแย่งจับ Smad4 ของ TGF- β และ BMP signaling

P63 transcription Factor

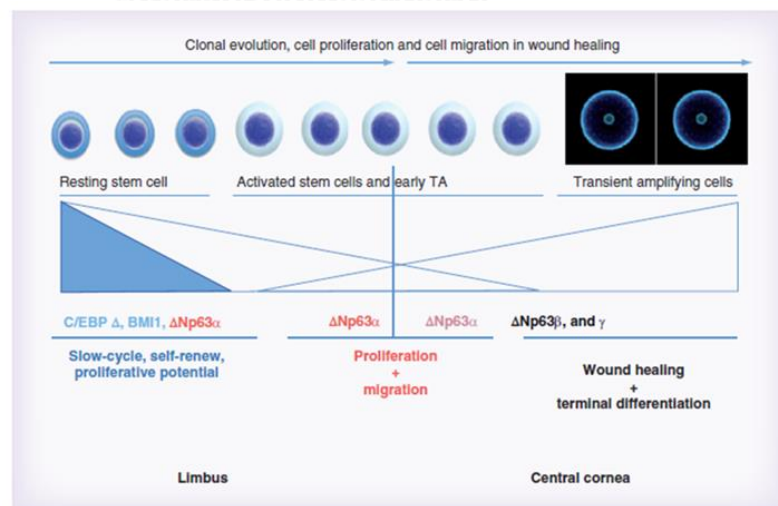
P63 อยู่ใน family เดียวกับ P53 ใน human *P63* gene จะ located ที่ chromosome 3q27 และประกอบด้วย 15 exons ยาว 250 kb *P63* ประกอบด้วย 2 promoters คือ TA promotor และ Δ Np promotor ทำให้โปรตีน P63 มีทั้งหมด 6 isoform คือ TAp63 α , β , γ Δ Np63 α , β , γ ซึ่ง TAp63 ประกอบด้วย transactivation domain แต่ Δ Np63 isoform นั้นจะไม่มีส่วนของ transactivation domain (Di Iorio et al., 2005) ซึ่งทั้ง *P63* และ *P53* จะ encode โปรตีนที่ทำหน้าที่คล้ายกัน และควบคุม common target gene สำหรับ p63 α protein จะมีส่วนของ steria alpha motif (SAM) domain ซึ่งส่วนดังกล่าวนี้จะไม่พบใน P53 และเชื่อว่าบริเวณดังกล่าวก่อให้เกิดกระบวนการ developmental และจากลำดับเบสที่คล้ายกันของ TAp63 และ P53 จึงสามารถที่จะจับและ transactivation ของ P53 target gene จำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามโปรตีน TAp63 สามารถจับ DNA โดยผ่านทางารตอบสนองต่อ elements เกี่ยวข้องกับ P63 แต่จะไม่เกี่ยวข้องกับ P53 สาเหตุที่ขาด TA domain ของ Δ Np63 มีรายงานว่าสามารถจะ block p53 หรือ TAp63-mediated



ภาพที่ 9 P63 transcription factor ทั้ง 6 isoform ประกอบด้วย 2 promoters คือ TA promotor และ Δ Np promotor (Kouwenhoven, van Bokhoven, & Zhou, 2015)

P63 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการรักษาสภาพความเป็น stem cell แต่อย่างไรทั้งหมด 6 isoform มีการแสดงออกแตกต่างกันหรือมีบทบาทต่างกันในแต่ละบริเวณ (site specific) (Wang et al., 2005) แต่ละ isoform จำเป็นสำหรับ maintenance ความสามารถในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ LESC และ ความสามารถในการ migrate ไปยัง corneal โดย TAp63 แสดงออกในระดับสูงในบริเวณ limbus และลดลงประมาณ 10 เท่าในบริเวณ peripheral corneal และจะไม่พบการแสดงออกเลยในบริเวณ central corneal สำหรับ $\Delta Np63$ พบการแสดงออกในระดับสูงในบริเวณ limbus และจะลดลงประมาณ 35% ในบริเวณ peripheral cornea และจะไม่พบการแสดงออกเลยในบริเวณ central corneal (Wang et al., 2005)

$\Delta Np63\alpha$ เป็น maker stem cell มีความสำคัญต่อ self-renewal (SC pool) เป็น isoform ที่พบมากที่สุดว่าในเซลล์ LESC ที่เจริญแบบ holoclones และจำนวน α^+ cell จะลดน้อยลงในโคลนแบบ meroclones และไม่พบเซลล์ดังกล่าวเลยใน paraclones นอกจากนี้พบว่า $\Delta Np63\beta$ และ $\Delta Np63\gamma$ สามารถพบได้ในโคลนแบบ paraclones ยังพบว่า $\Delta Np63\beta$ และ $\Delta Np63\gamma$ เริ่มปรากฏในชั้น suprabasal และพบส่วนน้อยบริเวณ limbus แต่อย่างไรก็ดีพบว่าสามารถพบทั้ง 2 isoform บริเวณ limbus และ corneal ได้ เมื่ออยู่ในภาวะที่ผิวกระจกตาถูกกระตุ้น $\Delta Np63\beta$ และ $\Delta Np63\gamma$ นั้นไม่ใช่ maker ของ stem cell แต่น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับ epithelial differentiation ในขั้นตอน corneal regeneration (Di Iorio et al., 2005)



ภาพที่ 10 บทบาท Transcription factors P63 ต่อ corneal cell functions (G. Pellegrini et al., 2016)

ความสำคัญ *p63* ต่อการสร้าง epithelia ในระยะ embryo มีการแสดงออกใน ectodermal surfaces ของ limb buds, branchial arches และ epidermal appendages ใน mouse embryo พบว่าในหนูที่ไม่มีการแสดงออกของ *p63* (*p63*^{-/-}) หนูจะตายจากสาเหตุ dehydration จากการไม่สามารถพัฒนา stratified epithelial barrier ได้ (Yang et al., 1999)

ในภาวะบาดเจ็บหรือเซลล์ได้รับความเสียหาย มีรายงานว่า wound healing process ของเซลล์ผิวหนังเกี่ยวข้องกับ $\Delta Np63$ /BMP-7 signaling pathway โดยผ่านการควบคุมของ metrilin-2 ซึ่งเป็นโปรตีนใน extracellular matrix บริเวณ basement membrane และเชื่อมโยงอยู่กับ collagens, proteoglycan, laminin จึงมีบทบาทสำคัญในการรวมตัวของ matrix เนื่องจากในระหว่างการซ่อมแซมเซลล์ผิวหนังต้องมีการสลายตัวของ extracellular matrix รอบๆ บาดแผลเพื่อให้เซลล์จากชั้นล่างสามารถเคลื่อนตัวไปแทนที่เซลล์ที่เสียหายได้สะดวก จึงมีการ down-regulate ของ $\Delta Np63$ และ BMP-7 ในช่วงแรกของ wound healing process (Ichikawa, Suenaga, Koda, Ozaki, & Nakagawara, 2008) และจากการศึกษาพบว่า target gene ของ transcription factor *p63* ในกระบวนการ wound healing ในเซลล์ human airway epithelial basal cells ซึ่งเกี่ยวข้องกับ epithelial repair และ differentiation (Warner et al., 2013)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

เซลล์ที่ใช้ทดสอบ

Limbal epithelial stem cell (LESCs) และ Keratocytes

ได้รับความอนุเคราะห์ชิ้นเนื้อ limbal tissue ที่เหลือใช้จาก ผศ. พญ. วิลาวัลย์ พวงศรีเจริญ ภาควิชา จักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยทางฝ่ายจักษุวิทยา จะเป็นผู้ทำการเก็บส่วน corneoscleral rim (limbal ring) ที่เหลือไม่ใช้แล้วของดวงตาผู้บริจาคที่เสียชีวิต การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนใน DMEM/F12 medium, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 2.5 µg/ml NaHCO₃, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 5 mg/ml human insulin in, 20 ng/ml EGF, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37°C มี 5% CO₂

3t3 cell line (mouse embryonic fibroblast cell line)

ได้จาก The American Type Cell Culture (ATCC) ใช้เป็น feeder cells สนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ LESCs การเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน 3t3 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย DMEM-High glucose, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37°C มี 5% CO₂

สารเคมี

Smad2/3 Antibody (D7G7) rabbit mAb (Cell Signaling Technology), p63- α Antibody rabbit mAb (Cell Signaling Technology), E-cadherin Antibody (24E10) rabbit mAb (Cell Signaling Technology), Vimentin Antibody rabbit mAb (Cell Signaling Technology), anti-human cytokeratin 1/10 Ms IgG1 (Millipore), Rhodamine B , Bio-Plex Assays (Bio-Rad), Bovine serum albumin (Sigma-Aldrich), Tween-20 (Sigma-Aldrich), 10xPBS (Apsalagen Co.,Ltd), DMEM-high glucose (Gibco, USA), fetal bovine serum (Gibco, USA), L-glutamine (Gibco, USA), penicillin-streptomycin (Gibco, USA), 1x versene (Gibco, USA), 0.25% Trypsin (Gibco, USA), Dulbecco modified Eagle medium/F12 (DMEM/F12) (GE Healthcare Life Science), Hydrocortisone (Sigma-Aldrich), Sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich), Insulin in (Gibco, USA), Dispase II (Gibco, USA), Mitomycin C (Sigma-Aldrich), Recombinant Human EGF Protein (R&D Systems),

Recombinant Human TGF-beta 1 (R&D Systems), TGF inhibitor (Stemgent Inc.), agarose (vivantis, Malaysia), dimethylsulfoxide (Biobasic inc, Canada), ethidium bromide (Biobasic inc, Canada), boric (Biobasic inc, Canada), triton X-100 (research organic inc), ethanol (Biobasic inc, Canada), isopropanol (Biobasic inc, Canada), Taq DNA polymerase (500 U/ μ l), GeneRulerTM 100 bp DNA ladder (ThermoScientific, USA), GeneRuler TM 1 Kbp DNA ladder (ThermoScientific, USA), Trizol reagent (Molecular Research Center; MRC), DNA extraction kit (qiagen, USA), plasmid mini prep kit (quiagen, USA) , two-step qRT-PCR kit with SYBER green (invitrogen, USA), Formaldehyde (Sigma-Aldrich), Normal goat serum (Gibco, USA), SimpleChIP[®] Enzymatic Chromatin IP Kits (Cell Signaling Technology), DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) (ThermoScientific, USA),

อุปกรณ์

Adjustable pipette 1-10 μ l, 2-20 μ l, 10-100 μ l, 20-200 μ l และ 100-1000 μ l (Eppendorf, France), biohazard laminar-flow hood (nuair, USA), cell culture dish: diameter 100 mm, 6-well cell culture plate, และ 24-well cell culture (Corning, USA), electrophoresis (Bio Rad, USA), freezer - 80^oC (ThermoFisher Scientific, USA) refrigerator 4^oC, 20^oC, , Fluorescence microscope (Carl Zeiss, Germany), gel documentation (Bio-Rad, USA), Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific Inc.), hemocytometer (Resistant, Germany), microcentrifuge (Eppendorf, Germany), tube: 15 และ 50 ml (Corning Incorporation, USA), T25 และ T75 tissue culture flasks (Corning, USA)

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. การเตรียมเซลล์ที่เลี้ยง (Feeder cells)

เลี้ยงเซลล์ 3T3 (mouse embryo fibroblast cell line) จนประมาณร้อยละ 80-90 ของภาชนะ T75 หยุดการเจริญเติบโต โดยการใส่ mitomycin C ความเข้มข้น 10 μ g/ml นำบ่มที่อุณหภูมิ 37^oC เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบเวลาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ 0.25%

Trypsin/EDTA เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-High glucose, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ประมาณ 1 ml ทำการนับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวน 1×10^6 cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm เขย่าให้เซลล์กระจายให้ทั่ว นำเซลล์ไปบ่มและเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะก่อนนำมาใช้เป็นเซลล์พี่เลี้ยง

2. การแยก และเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิ (primary cells) limbal stem cells จาก limbal ring

นำ limbal ring ซึ่งได้รับมาจากภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาล้างด้วย PBS 2 รอบ จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ Dispase II ความเข้มข้น 1.2 U/ml ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ครบเวลาดูดเอนไซม์ Dispase II ทิ้งและย่อยต่อด้วยเอนไซม์ 0.05% trypsin/EDTA เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อครบเวลาดูดพ่นให้ได้เซลล์เดี่ยว หยุดปฏิกิริยาดำเนินการด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตา (DMEM/F12 medium, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 2.5 µg/ml NaHCO₃, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 5 mg/ml human insulin, 20 ng/ml EGF, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin) นำเซลล์ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml นำเซลล์ทั้งหมดเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์พี่เลี้ยงที่เตรียมไว้แล้ว นำไปเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อระยะเวลาประมาณ 10-14 วัน จะได้เซลล์ปฐมภูมิเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป โดย limbal ring ที่นำมาใช้ในการศึกษาได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน IRB No.302/58

3. การแยกและเลี้ยงเซลล์ keratocytes

นำ limbal ring หลังจากย่อยส่วนของ epithelium ออกหมดแล้ว นำมาตัดส่วนบริเวณส่วนเนื้อเยื่อตาขาวออก จะเหลือบริเวณที่เรียกว่า Limbus ซึ่งอยู่ระหว่างตาขาวและตาดำ นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ Dispase II ความเข้มข้น 1.2 U/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาดำเนินการด้วย 1x PBS 2 รอบ จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาวางบนจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วย 10 µg/ml laminin ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM/F12 medium, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 2.5 µg/ml NaHCO₃, 0.5 µg/ml hydrocortisone, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin) พอท่วมชิ้นเนื้อ จากนั้นรอให้เซลล์ที่มีลักษณะ fibroblast เจริญออก

จากชั้นเนื้อ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเพาะเซลล์ จากนั้นจึงนำ เซลล์ที่ได้ไปใช้ในการในศึกษาต่อไป

4. การสกัด RNA การสร้าง cDNA

วิธีการสกัด RNA

- โดยเริ่มจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งเดิม 1 ml Trizol ลงในแต่ละ well ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายใส่ tube ขนาด 1.5 ml
- เติม 100 μ l bromochloropropane (BCP) ผสมให้เข้ากันโดยการ invert tube จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ครบเวลานำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 12000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที
- ดูดเก็บส่วนใสด้านบนประมาณ 400 μ l ใส่ RNase-free microcentrifuge tubes เติม 500 μ l isopropanol เก็บที่ -20 °C ซ้ำมคืนเพื่อตกตะกอน RNA
- นำมาปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 1 ml 75% ethanol นำไปปั่นที่ความเร็ว 7500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที (2 ครั้ง)
- ดูด 75% ethanol ทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที ละลายตะกอน RNA ด้วย 50 μ l RNA storage จากนั้นนำ RNA ที่ได้มาสร้างเป็น cDNA

วิธีการสร้างสาย cDNA

- คำนวณความเข้มข้น RNA ให้ได้ 1 μ g จากนั้นเติม 1 μ l oligo dT และเติม nuclease-free water ให้มีปริมาตรรวม 12 μ l จากนั้นนำ tube ไปทำการ Heat ที่ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที
- เตรียม master mix ประกอบด้วย 4 μ l Buffer RT, 2 μ l dNTP 10 mM, 0.5 μ l ribolock และ 0.5 μ l dH₂O ครบเวลาเตรียม master mix ลงในแต่ละ tube นำ tube ไป Heat ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที
- ครบเวลานำ tube มาเติม 1 μ l reverse transcriptase (Revert Aid H Minus M-Mul V) นำ tube ใส่เครื่อง thermal cycle เพื่อสร้างสาย cDNA ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที

5. การทำ real time PCR

นำสาย cDNA ที่สังเคราะห์ได้ของแต่ละตัวอย่างปริมาณ 2 μl ผสมกับน้ำปริมาณ 8.5 μl จากนั้นเติม SYBER Green (invitrogen, USA) ปริมาณ 12.5 μl และ Primer forward และ reverse อย่างละ 1 μl ปริมาตรรวม 25 μl ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปใส่เครื่อง Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System เพื่อวิเคราะห์โดยตั้งโปรแกรม ดังนี้

อุณหภูมิ	เวลา	รอบ
95.0 °C	10:00 นาที	1
95.0 °C	0:15 นาที	40
57.0 °C	0:30 นาที	
72.0 °C	0:45 นาที	

6. การย้อม immunofluorescence

ก่อนขั้นตอนการ fixed ด้วย 4% formaldehyde ทำการดูด medium เก่าทิ้งจากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย 1X PBS จำนวน 3รอบ

1. ขั้นตอนการ fixed

- เติม 300 μl 4% formaldehyde ลงใน well และบ่ม 15 นาที อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาดูด 4% formaldehyde ทิ้งล้างด้วย 1X PBS 3 ครั้ง

2. ขั้นตอนการ permeabilization

- permeabilization ด้วย 0.1% หรือ 0.3% triton X-100 in 1xPBS 300 μl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที ครบเวลา ดูดทิ้ง ตามด้วยขั้นตอน blocking

3. ขั้นตอน blocking

- blocking buffer; 1x PBS+5% normal goat serum +0.3% triton x-100
- เติม blocking buffer ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 นาที

4. ขั้นตอนการลง primary antibody

- Antibody dilution buffer : 1x PBS+1% BSA+0.3% Triton x-100

- ทูต blocking solution ที่เติม primary antibody ที่ทำการ diluted ด้วย Antibody dilution buffer ประมาณ 250-300 μ l เติมลงใน well นำไปบ่มที่ 4 °C ซ้ำมคืน ในที่มืด

5. ขั้นตอนการย้อม secondary antibody

- ทูต primary antibody ที่ทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย rinse buffer: 1x PBS+0.05% tween-20 ประมาณ 5 รอบ รอบละ 5 นาที
- นำ secondary antibody ละลายใน Antibody dilution buffer ประมาณ 250-300 μ l และเติมนลงใน well นำไปบ่มอุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 2 ชม.
- ทูต secondary antibody ที่ทิ้ง และล้างเซลล์ด้วย rinse buffer 5-7 รอบ

6. ขั้นตอนการย้อม nucleus

- นำ DAPI ละลายใน Antibody dilution buffer (1:1000) ปริมาณ 500 μ l เติมนลงใน well และบ่มเป็นเวลา 5 นาที
- ทูต DAPI ที่ทิ้งและล้างด้วย 1x PBS 2 ครั้ง
- จุ่ม cover slip ลงใน ethanol เพื่อล้างน้ำและฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้จนแห้ง
- เติมน antiphase ลงบนสไลด์ และวาง cover slip คิวว่าลงบนสไลด์.
- นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง Fluorescence microscope

7. การทำ Chromatin immunoprecipitation

ขั้นตอน Cross-linking

- โดยการใส่ 37% formaldehyde ปริมาตร 540 μ l ลงใน culture dish ขนาด 15 ml ที่มี medium เลี้ยงเซลล์อยู่ 20 ml วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
- ครบเวลาเติม 10x glycine ปริมาตร 2 ml วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที
- ครบเวลาทูต Medium ที่ทิ้ง จากนั้นล้างด้วย ice-cold PBS ปริมาตร 10 ml จำนวน 2 รอบ
- จากนั้นใส่ ice-cold PBS+Protease inhibitor cocktail (PIC) ปริมาตร 2 ml จากนั้นทำการ scrape เซลล์
- ทูตสารละลายทั้งหมดนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอน

ขั้นตอน Chromatin digestion

- นำตะกอนมาละลายใน lysis buffer ปริมาตร 1ml จากนั้นนำไปวางในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
- ครบเวลาเติม Micrococcal nuclease ปริมาตร 0.5 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที ครบเวลาหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.5 M EDTA ปริมาตร 10 μ l
- นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสทิ้ง
- ละลายตะกอนด้วย CHIP buffer+PIC ปริมาตร 100 μ l จากนั้นนำวางในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ครบเวลานำไป sonicate
- ปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่
- ดูดสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ขนาด DNA โดย electrophoresis

ขั้นตอน Chromatin Immunoprecipitation

- นำสารละลายที่ได้มา incubate กับ antibody ที่เราสนใจในการศึกษา ที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน
- ครบเวลาทำการล้าง antibody โดยโปรตีนที่เราสนใจจะถูกจับอยู่กับ antibody ซึ่ง antibody จะถูก taq ไรต์ด้วย magnetic beads ดังนั้นโปรตีนที่ไม่จับกับ antibody จะถูกล้างออก จะเหลือเฉพาะโปรตีนที่เราสนใจเท่านั้น
- จากนั้นทำการ reversal of cross-link โดยขั้นตอนนี้จะเป็นการเอาโปรตีนออก ให้เหลือเฉพาะ DNA โดยนำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 30 นาที
- ครบเวลาเติม 5M NaCl ปริมาตร 6 μ l และ Proteinase K ปริมาตร 2 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- นำสารละลายที่ได้ ซึ่งขั้นตอนนี้จะเหลือเพียง DNA จากนั้นนำ DNA นี้ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดย Spin Column
- นำ DNA ที่ได้ส่งไปวิเคราะห์โดย RT-PCR

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การแจกแจงแบบ Student's *t* โดยโปรแกรม SPSS โดยค่า *p* value < 0.05

9. ศึกษาผลกระทบของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs)

โดยตรง

9.1 ศึกษาผล TGF- β 1 ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิด

การศึกษานี้เพื่อศึกษาผลของ TGF- β 1 นั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงหรือมีผลต่อการคงคุณสมบัติการเป็นเซลล์ต้นกำเนิดอย่างไรต่อเซลล์ LESCs ซึ่งการเจริญเป็นโคโลนีและจำนวนโคโลนีนั้นจะเป็นสิ่งสำคัญต่อการจะบ่งบอกถึงคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยทำการเตรียมเซลล์ 3t3 สำหรับเป็นเซลล์ที่เลี้ยง นับจำนวนเซลล์ให้ได้ 6×10^5 cells/well เลี้ยงใน 6 well plate จำนวนทั้งหมด 6 well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ จากนั้นจึงค่อยนำเซลล์ LESCs จำนวน 3000 เซลล์ ลงไปเลี้ยง ทำการใส่ TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองคือ

1. control ไม่ใส่ TGF- β 1
 2. TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นล้างด้วย 1x PBS เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่
 3. TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นล้างด้วย 1x PBS เติมหอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่
- โดยทั้ง 3 ชุดการทดลองทำเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนี

$$\%CFE = \frac{\text{จำนวนโคโลนีทั้งหมด/well} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ที่ seeded/well}}$$

9.2 ศึกษาผล TGF- β 1 ลดคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิด LESCs โดยทำให้เกิด

EMT

การศึกษาที่ผลของ TGF- β 1 ลดคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดโดยทำให้เกิด EMT หรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาโดยนำ primary cell ของเซลล์ LESCs ทำการย่อย จากนั้นนับจำนวนเซลล์ให้ได้ 5000 เซลล์ ใส่ลงในเซลล์ที่เลี้ยง 3t3 ที่ทำการ treat ด้วย Mitomycin C เรียบร้อยแล้ว เลี้ยงเซลล์ประมาณ 5-7 วัน ให้เซลล์เจริญเป็นโคโลนี จากนั้นใส่ TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการย่อยเซลล์ที่เลี้ยงออกด้วย 1x versene โดยเริ่มจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นจึงทำการเติม 500 μ l 1x versene บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใช้ไปเปิดดูจุดพันเอาส่วนของเซลล์ที่เซลล์หลุดออกทั้งหมดจากนั้นทำล้างด้วย 5 ml

1x PBS 2 รอบ จากนั้นนำไปสกัด RNA และวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนโดยการทำ RT-PCR และวิเคราะห์ผลอื่นร่วมด้วยคือพิจารณาจาก morphology และ Immunofluorescence ตารางที่ 2 แสดงไพรเมอร์ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด EMT

ยีน	ลำดับ sequences	ขนาด fragment (bp)
<i>E-cad</i>	F5'-TGC CCA GAA AAT GAA AAA GG-3'	200
	R5'-GTG TAT GTG GCA ATG CGT TC-3'	
<i>N-cad</i>	F5'-ACA GTG GCC ACC TAC AAA GG-3'	201
	R5'-CCG AGA TGG GGT TGA TAA TG-3'	
<i>FN</i>	F5'-CAG TGG GAG ACC TCG AGA AG-3'	168
	R5'-TCC CTC GGA ACA TCA GAA AC-3'	
<i>Vim</i>	F5'-GAG AAC TTT GCC GTT GAA GC-3'	163
	R5'-GCT TCC TGT AGG TGG CAA TC-3'	
<i>SNAIL</i>	F5'-CCT CCC TGT CAG ATG AGG AC-3'	234
	R5'-CCA GGC TGA GGT ATT CCT TG-3'	
<i>SLUG</i>	F5'-GGG GAG AAG CCT TTT TCT TG-3'	158
	R5'-TCC TCA TGT TTG TGC AGG AG-3'	
<i>GAPDH</i>	F5'- CTT GTT CCA GGC CTG ATG TT -3'	603
	R5' - ACG AGA CTC CTT CTC TGT GG -3'	

E-cad, E-cadherin; *N-cad*, N-cadherin; *FN*, Fibronectin; *Vim*, Vimentin; *GAPDH*, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

9.3 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ LSCs ระยะยาวภายนอกร่างกาย (Long-term culture) โดยการยับยั้ง TGF

นำเซลล์ LSCs ที่ได้จากโคโลนี primary cells นำมาย่อยด้วย 0.25% Trypsin/EDTA เป็นเวลา 2 นาที ปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที นับจำนวนเซลล์จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ 3000 เซลล์ เพาะเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงใน 6-well plate โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี TGF inhibitor หรือไม่มี จากนั้นทำการเลี้ยงให้เจริญเป็นโคโลนีเป็นเวลาประมาณ 10-14 วัน นับเป็น passage 1 ครบระยะเวลาทำการย่อยโคโลนี (passage 1) นับจำนวนเซลล์ 3000 เซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ที่เลี้ยงใน 6-well plate โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี TGF inhibitor หรือไม่มี จากนั้นทำการเลี้ยงให้เจริญเป็นโคโลนีเป็นเวลาประมาณ 10-14 วัน นับเป็น passage 2 ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่พบโคโลนี โดยในแต่ละ passage เมื่อครบเวลาทำการย้อมโคโลนีด้วย Rhodamine B

10. ศึกษาผลกระทบทางอ้อมของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs)

10.1 Inflammatory cytokine หลังมากขึ้นหลังจากที่ keratocytes ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1

เพื่อทำการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องของเซลล์ keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ในการสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ LESCs ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาก่อนหลัง cytokine โดยใช้ Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 21-plex Assay (Bio-rad) สามารถตรวจ cytokine ได้ 15 ชนิด โดยทำการวิเคราะห์ cytokine ที่หลังจากเซลล์ keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 50 ng/ml นานเป็นเวลา 3 วัน โดยเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 1000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4° C จากนั้นเก็บส่วนใส สำหรับเป็น sample เตรียมสาร standard โดยการทำให้ serial dilution จากนั้นทำการ pre-wet filter plate ด้วย 100 μ l bio-plex assay buffer เติม 1x beads ปริมาตร 50 μ l โดยเป็น magnetic beads ลงในแต่ละ well จากนั้นล้างด้วย 100 μ l wash buffer จำนวน 2 ครั้ง เติม samples, standards, blank ปริมาตร 50 μ l ลงใน well ที่มี 1x beads ปิด plate ให้สนิทนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบเวลานำมาล้างด้วย 100 μ l wash buffer จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม 25 μ l antibody ลงในแต่ละ well นำไปเขย่าที่ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลานำมาล้างด้วย 100 μ l wash buffer จำนวน 3 ครั้ง เติม 50 μ l SA-PE ลงในแต่ละ well นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 100 μ l wash buffer จำนวน 3 ครั้ง ทำการละลาย beads ด้วย 125 μ l assay buffer นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจึงนำ plate ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Bio-Plex® MAGPIX™

10.2 ศึกษาเซลล์ keratocytes มีการแสดงออกของ BMP antagonist มากขึ้นอย่างจำเพาะเมื่อสัมผัสกับ TGF- β 1

ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลของ TGF- β 1 ต่อ BMP antagonist คือ Noggin, Gremlin ในเซลล์ keratocytes ด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้เซลล์จาก 2 แหล่ง เพื่อเปรียบเทียบผลการแสดงออกของยีนคือ keratocytes และ dermal fibroblast โดยเริ่มจากการนับจำนวนเซลล์ทั้ง 2 ชนิดให้ได้ 5×10^5 เซลล์ เพาะเลี้ยงใน 6-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM/F12 medium, 10% (v/v) Fetal bovine serum, NaHCO₃ 2.5 μ g/ml, hydrocortisone 0.4 μ g/ml, human insulin in 5 mg/ml, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวจะใส่ TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml และ 50 ng/ml จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C, 5% คาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการสกัด RNA เพื่อนำไปสร้าง cDNA และวิเคราะห์ผลโดย real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน (BMP antagonist)

ยีน	ลำดับ sequences	ขนาด fragment (bp)
GREM1	F5'-ATC AAC CGC TTC TGT TAC GG-3'	197
	R5'-ATG CAA CGA CAC TGC TTC AC-3'	
NOG	F5'-CAC TAC GAC CCA GGC TTC AT-3'	212
	R5'-CTC CGC AGC TTC TTG CTT AG-3'	
VEGF	F5'-ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG-3'	444
	R5'-TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA-3'	
GAPDH	F5'- CTT GTT CCA GGC CTG ATG TT -3'	603
	R5'- ACG AGA CTC CTT CTC TGT GG -3'	

GREM1; *GREMLIN1*, *NOG*; *NOGGIN*, *VEGF*; Vascular endothelial growth factor, *GAPDH*; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

10.3 ศึกษาผล BMP antagonist ที่มีต่อการเกิด Differentiate ในเซลล์ LSCs สร้าง stable cell line ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Noggin และ Gremlin

1. Cloning ยีน *GREM* หรือ *NOG* เข้าสู่ pcDNA3.1 vectors เพื่อเป็นการ overexpression
 - นำ pcDNA3.1 vectors มาตัดด้วยเอนไซม์ *Xba* I ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลาตลอดคืน
 - นำ vectors ที่ผ่านการตัด มา Ligate เข้ากับยีน *GREM* หรือ *NOG* ด้วยเอนไซม์ T4 Ligase ทำการบ่มที่ 4°C ตลอดคืน
 - นำ Ligate reaction ที่ได้มาทำการ Transformation เข้าสู่ competent bacteria (TOP10 strain) Spread ลงบน LB agar plate ที่มี ampicillin และบ่มที่ตู้บ่ม 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง
 - ตรวจสอบความถูกต้องโดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นใส่ลงใน 15 ml tube ที่มี 5 ml LB broth ที่มี ampicillin บ่มที่ความเร็วรอบ 200 rpm 37°C เป็นเวลา 14-16 ชั่วโมง
 - ปั่นตกตะกอนแบคทีเรียที่ได้ และทำการสกัด plasmid
 - นำ plasmid 1 µg มาตัดด้วยเอนไซม์ *Xba* I เป็นเวลา 30 นาที
 - Run agarose gel electrophoresis เพื่อทำการแยกชิ้น DNA หลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ
 - ยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสอีกทีด้วยการส่ง sequencing
2. Transfection เข้าสู่เซลล์ 3t3
3. คัดเลือก stable cell line
 - หลังจากการ transfection เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ ทำการเพาะเลี้ยงต่ออีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
 - ทำการ split เซลล์ประมาณ 25% confluent เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียา Geneticin เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาทุก ๆ 3-4 วัน
 - จนกระทั่งมีโคโลนีของเซลล์ที่ resistant ต่อ Geneticin จึงทำการเลือกโคโลนีและทำการเพาะเลี้ยงใน 96-well plates

10.4 ศึกษาผลของ Gremlin ที่มีต่อ LESC

นำ stable cell line (3t3 gremlin) มาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยงของเซลล์ LESC โดยการทำ Colony forming assay โดยการย่อย primary cell ของเซลล์ LESC จำนวน 1000 เซลล์ ลงบนเซลล์ 3t3 gremlin เลี้ยงต่อเป็นเวลา 14 วัน ครอบคลุมเวลาทำการนับจำนวน colony และตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR

ตารางที่ 4 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ LESC เจริญอยู่บน 3t3 gremlin

ยีน	ลำดับ sequences	ขนาด fragment (bp)
KRT1	F5'-CCA GCC AGA GTA GGA CCA GT-3'	150
	F5'-TGC AGC AAA ACA AGG AAA TG-3'	
KRT10	F5'-AAT GAA AAA GTA ACC ATG CAG AAT CTG-3'	151
	R5'-CAC GAG GCT CCC CCT GAT-3'	
GAPDH	F5'- CTT GTT CCA GGC CTG ATG TT -3'	603
	R5'- ACG AGA CTC CTT CTC TGT GG -3'	

11. ศึกษาผลของ TGF- β 1 ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง p63 isoforms ในเซลล์ LESC

การศึกษานี้เพื่อศึกษาว่า TGF- β 1 มีผลต่อ Transcriptions factor p63 isoforms หรือไม่ อย่างไร เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า TGF- β 1 มีผลต่อการคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิด และยังทำให้เกิด EMT ในเซลล์ LESC ซึ่ง Transcriptions factor p63 isoforms ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดในเซลล์ LESC คือ Δ Np63 α ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาโดยการนำเซลล์ LESC ที่เจริญเป็นโคโลนีบนเซลล์ที่เลี้ยงไม่เกิน 8 วัน จากนั้นทำการทดสอบสาร ดังนี้ control, TGF- β 1 20 ng/ml, TGF inhibitor 0.5 μ M เป็น 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจะย่อยเซลล์ที่เลี้ยงออกด้วย 1x versene จากนั้นสกัด RNA

ตารางที่ 5 แสดงไพรเมอร์ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน *P63* isoforms

ยีน	ลำดับ sequences	ขนาด fragment (bp)
<i>TAp63</i>	TGT TCA GTT CAG CCC ATT GA	<i>TAp63</i> α 1,484
	5' for <i>TAp63</i> α , <i>TAp63</i> β and <i>TAp63</i> γ	<i>TAp63</i> β 1,471
$\Delta Np63$	GGA AAA CAA TGC CCA GAC TC	<i>TAp63</i> γ 1,264
	5' for $\Delta Np63$ α , $\Delta Np63$ β and $\Delta Np63$ γ	$\Delta Np63$ α 1,389
<i>TA</i> / $\Delta Np63$ α	ATG ATG AAC AGC CCA ACC TC-3'	$\Delta Np63$ β 1,376
	3' for <i>TAp63</i> α and $\Delta Np63$ α	$\Delta Np63$ γ 1,168
<i>TA</i> / $\Delta Np63$ β	CAG ACT TGC CAG ATC CTG A	
	3' for <i>TAp63</i> β and $\Delta Np63$ β	
<i>TA</i> / $\Delta Np63$ γ	GGG TAC ACT GAT CGG TTT GG	
	3' for <i>TAp63</i> γ and $\Delta Np63$ γ	
<i>GAPDH</i>	F 5'- CTT GTTC CAG GCC TGA TGT T -3'	603
	R 5'- ACG AGA CTC CTT CTC TGT GG -3'	

บทที่ 4

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ผลกระทบโดยตรงของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs)

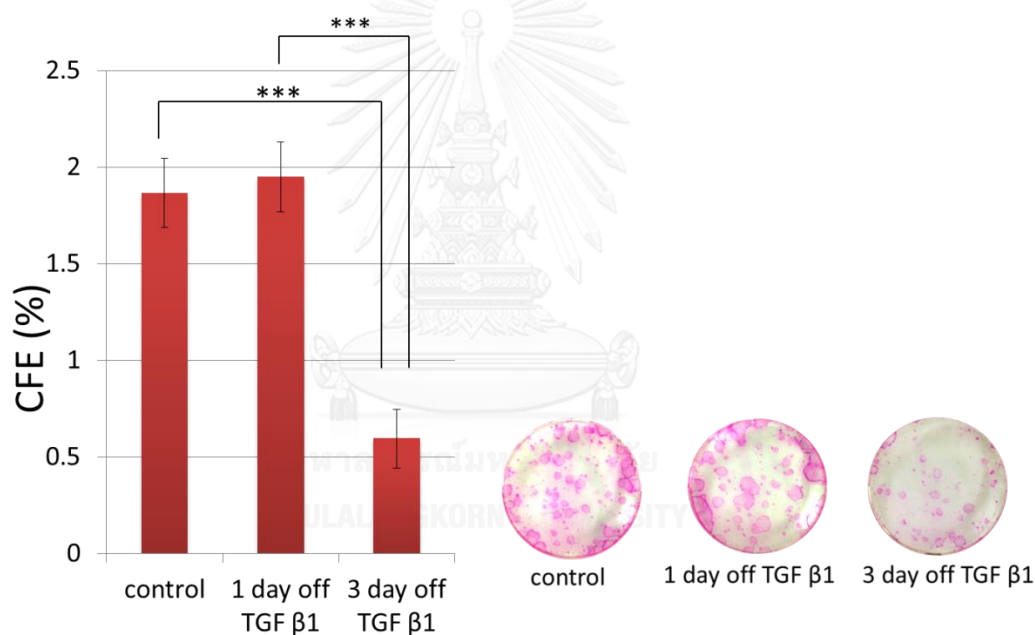
1.1 เซลล์ LESCs ลดความเป็น stemness เมื่อสัมผัสกับ TGF- β 1 โดยตรง

TGF- β 1 เป็น growth factors/cytokines ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ wound healing ของกระจกตา จะถูกหลั่งออกมาเมื่อ corneal epithelium ได้รับความบาดเจ็บ TGF- β 1 จะไปกระตุ้นเซลล์ keratocytes ส่งผลทำให้เซลล์ LESCs แบ่งตัวและเคลื่อนที่ไปซ่อมแซมบริเวณที่กระจกตาบาดเจ็บ แต่อย่างไรก็ดียังไม่ทราบแน่ชัดถึงผลของ TGF- β 1 ต่อคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ LESCs เมื่อสัมผัสโดยตรงกับ TGF- β 1 เป็นระยะเวลานาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลดังกล่าว โดยทำการศึกษาผลของ TGF- β 1 ต่อความสามารถ self-renewal ของเซลล์ LESCs โดยทดสอบผลกระทบของ TGF- β 1 ต่อ clonogenic potential ในเซลล์ LESCs ที่เลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยง 3t3 ผลการทดลองพบว่าเซลล์ LESCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 เป็นเวลา 3 วัน colony forming ลดลงถึง 3.1 เท่า อย่างมีนัยสำคัญ (P value < 0.0001) เมื่อเทียบกับเซลล์ LESCs ที่ไม่ถูกกระตุ้น (ภาพที่ 11)

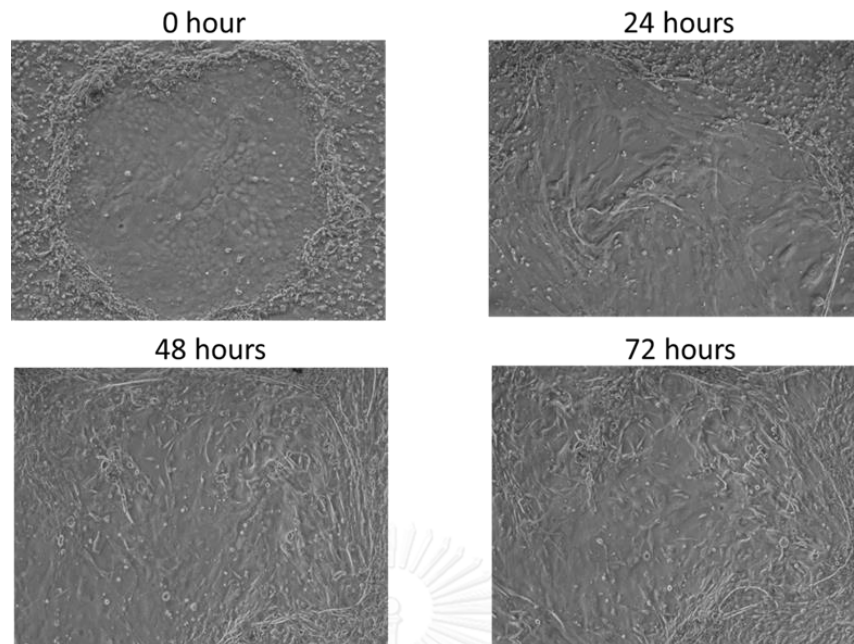
เพื่อศึกษากลไกในการสูญเสีย clonogenic potential ของเซลล์ LESCs เนื่องจาก TGF- β 1 มีบทบาทสำคัญในการเกิด epithelial-mesenchymal transition (EMT) ของ epithelial cell ในหลายชนิด ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของ TGF- β 1 ต่อการเกิด EMT ในเซลล์ LESCs เมื่อสัมผัสโดยตรง ทำการทดลองให้เซลล์ LESCs เจริญเป็นโคโลนีประมาณ 5-7 วัน จากนั้นให้เซลล์ LESCs ได้สัมผัส TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml ผลแสดงให้เห็นว่าเซลล์ LESCs จะค่อยๆเปลี่ยนแปลงรูปร่างจาก epithelium ไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย fibroblast เมื่อระยะเวลาผ่านไป ผลแสดงดังภาพที่ 12 และเมื่อนำไปวิเคราะห์โดยการย้อม immunofluorescence พบว่าเซลล์ LESCs ที่สัมผัสกับ TGF- β 1 มีการย้อมติดโปรตีน Vimentin ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการเกิด EMT พบว่าเซลล์ LESCs ย้อมติด Vimentin มากขึ้นเมื่อเซลล์สัมผัสกับ TGF- β 1 เป็นเวลานานขึ้น ในขณะที่เซลล์ LESCs ที่ไม่ได้สัมผัสกับ TGF- β 1 ย้อมไม่ติด Vimentin ดังภาพที่ 13 เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ EMT markers ที่

สำคัญ 4 ชนิดคือ *N-cad*, *VIM*, *SLUG* และ *SNAIL* ในเซลล์ LSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 เทียบกับเซลล์ LSCs ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าในเซลล์ LSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีปริมาณการแสดงออกของ *N-cad*, *VIM*, *SLUG* และ *SNAIL* มากขึ้น 10.3 เท่า, 9.28 เท่า, 4.95 เท่า และ 7.66 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 14)

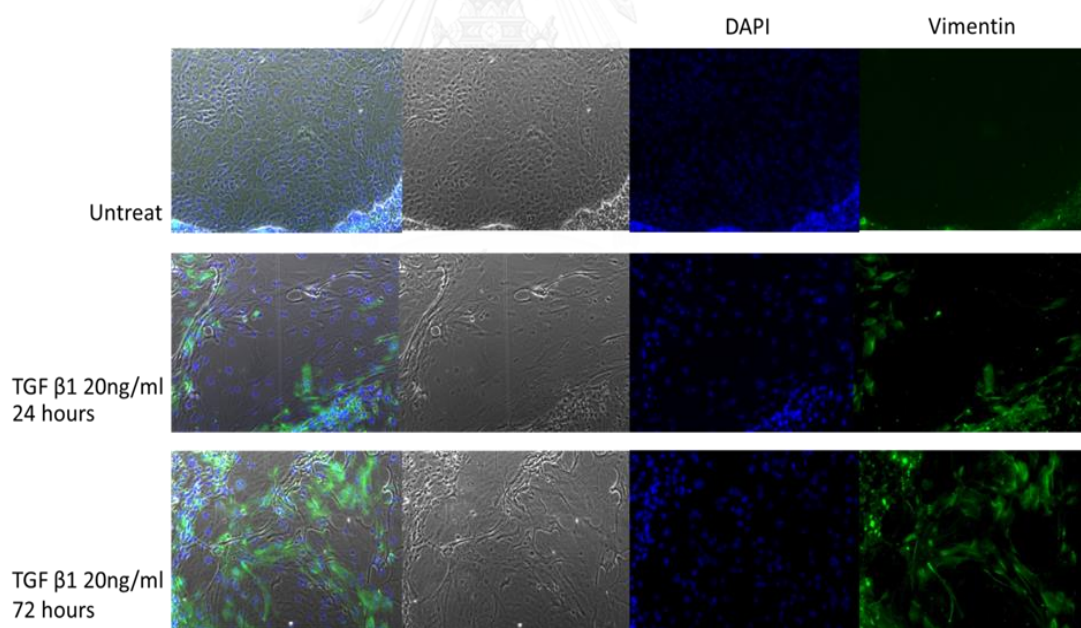
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลล์ LSCs ที่สัมผัสกับ TGF- β 1 เป็นระยะเวลาานานจะมีผลทำให้เซลล์ LSCs เกิด colony forming ลดลง หรือ clonogenic potential ลดลง ซึ่งส่วนหนึ่งของการสูญเสีย self-renewals น่าจะเกิดจากการเกิด EMT



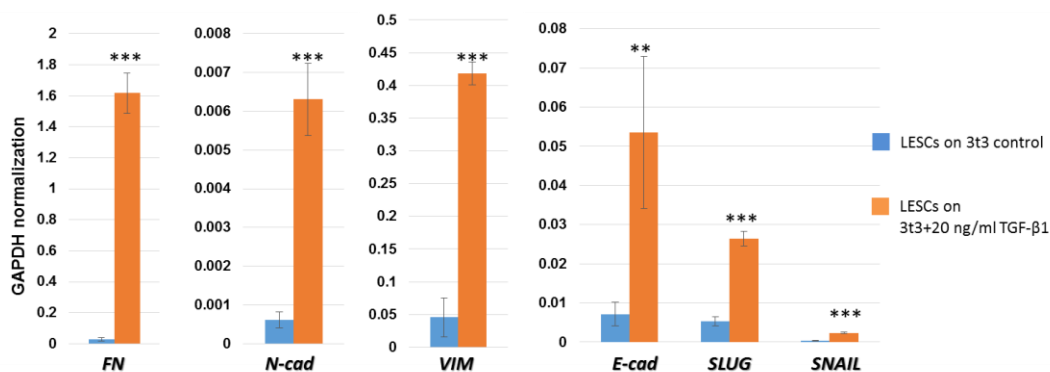
ภาพที่ 11 แสดง %CFE และโคโลนีที่ย้อมด้วย Rhodamine B ของเซลล์ LSCs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 1 วัน และ 3 วัน (***) $P < 0.0001$)



ภาพที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ LESC's เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 แสดงการวิเคราะห์ผลโดยการย้อม Vimentin ด้วยเทคนิค immunofluorescence ของเซลล์ LESC's ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง; เซลล์ LESC's ที่ถูกกระตุ้นจะติด Vimentin เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป

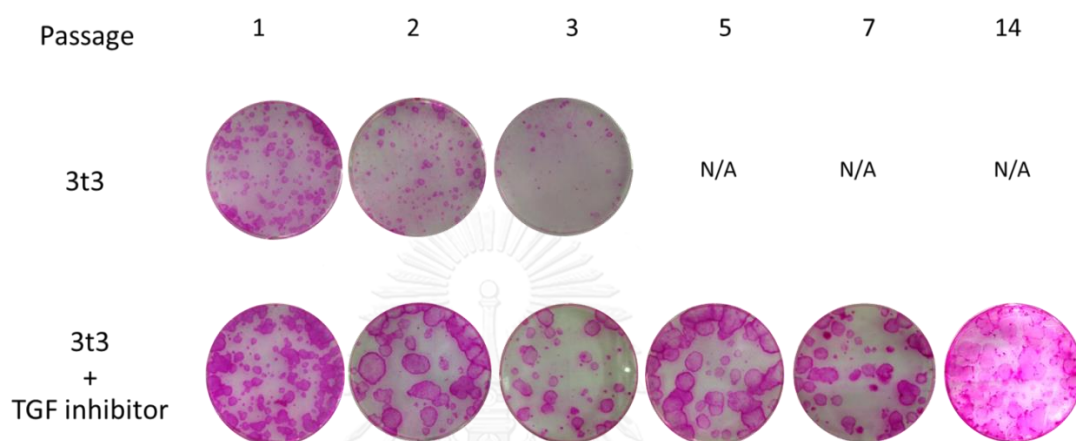


ภาพที่ 14 แสดงผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด EMT เปรียบเทียบระหว่างเซลล์ LSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml และเซลล์ LSCs ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1; เซลล์ LSCs ที่ถูกกระตุ้นมีระดับการแสดงของ EMT markers เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (***) $P < 0.0001$, **) $P < 0.05$)

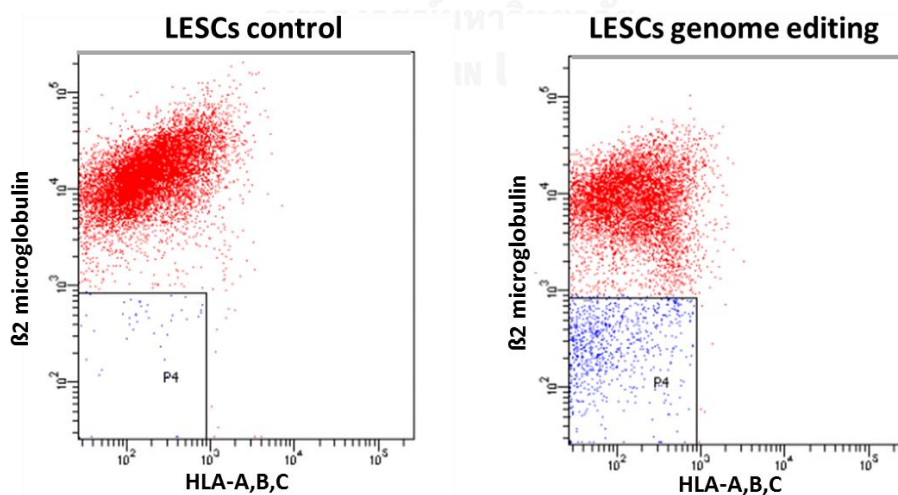
1.2 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ LSCs ระยะยาวภายนอกร่างกาย (Long-term culture) โดยการยับยั้ง TGF ด้วย TGF inhibitor

แผ่นกระจกตาที่สร้างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ LSCs ภายนอกร่างกาย (*In vitro*) ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความปลอดภัยทางคลินิก (Rama et al., 2010) อย่างไรก็ตาม เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ LSCs ของมนุษย์ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัด ไม่สามารถคงคุณสมบัติ self-renewal ระยะยาวในหลอดทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงเกิน 3 passage มักเกิด clonal evolution เซลล์ไม่แบ่งตัวจึงเป็นข้อจำกัดในการที่จะนำเซลล์ LSCs ไปผลิตแผ่นกระจกตาจำนวนมาก สมมุติฐานว่า TGF- β 1 ที่มีอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเป็นสาเหตุดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ LSCs ร่วมกับ TGF inhibitor เปรียบเทียบกับไม่ใส่ TGF inhibitor โดยทำการเพาะเลี้ยงบนเซลล์ที่เลี้ยงเซลล์ 3t3 โดยใส่เซลล์ LSCs จำนวนเท่ากันคือ 3000 เซลล์ ในทุกๆ ครั้งของการ passage และทำการ passage ทุกๆ 10 วัน จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ LSCs ที่เพาะเลี้ยงแบบไม่ได้ทำการใส่ TGF inhibitor สามารถเพาะเลี้ยงได้เพียง 3 passage เท่านั้น แต่กลับพบว่าเซลล์ LSCs ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ TGF inhibitor สามารถเพาะได้มากถึง 14 passage โดยที่ยังพบลักษณะโคลนที่เป็น holoclone แสดงให้เห็นว่าสามารถคงคุณสมบัติการเกิด self-renewal ได้ การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง TGF- β 1 ส่งเสริมทำให้เซลล์ LSCs เกิด self-renewal ในภาวะเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายได้ ทางผู้วิจัยได้ทำการต่อยอดความสำเร็จใน

การ long-term culture โดยการนำเซลล์ LSCs ไปทำ genome editing โดยเทคนิค crisper cas9 ซึ่งเทคนิคนี้มาใช้กับเซลล์ที่โตไม่ดีจะทำให้เซลล์ที่ใส่ crisper cas9 หยุดโตหรือตาย ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงที่ผู้วิจัยพบทำให้เซลล์ LSCs ที่ใส่ crisper cas9 แล้วยังสามารถเพิ่มจำนวนได้ ทั้งนี้เพื่อนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้เพื่อสร้างแผ่นกระจกตาที่ไม่มี HLA



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบความสามารถในการเพาะเลี้ยงเซลล์ LSCs ในระยะยาวระหว่างเซลล์ LSCs ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ TGF inhibitor (14 passage) กับเซลล์ LSCs ที่เพาะเลี้ยงแบบไม่ใส่ TGF inhibitor (≥ 3 passage)



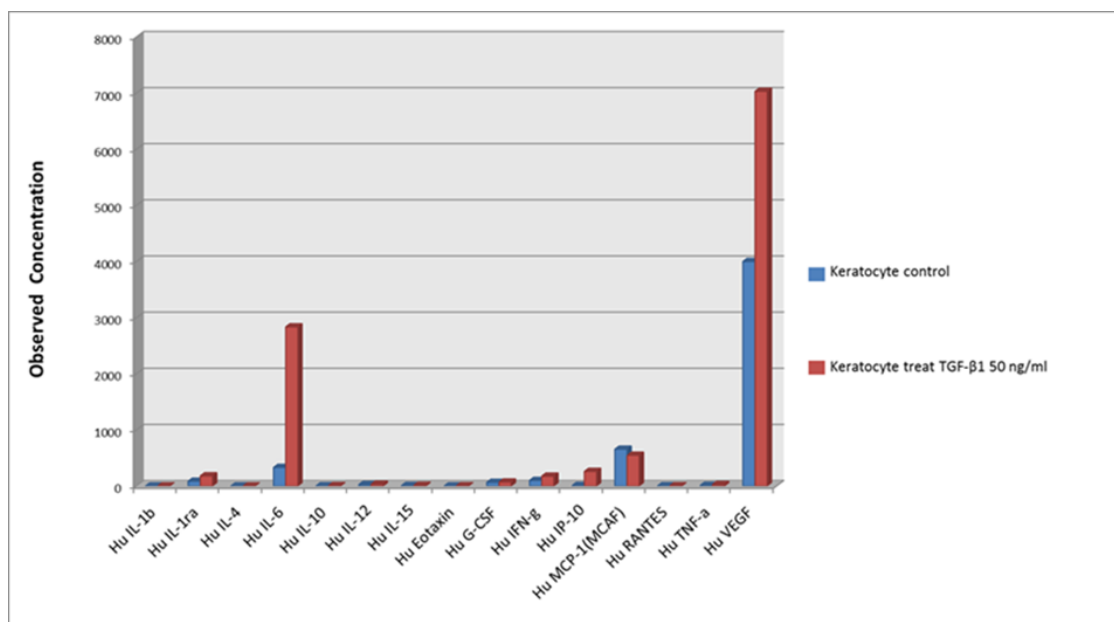
ภาพที่ 16 แสดงผล flow cytometry ของเซลล์ LSCs ที่ผ่านการทำ genome editing จะเห็นว่าสามารถตัด HLA ได้

2. ผลกระทบทางอ้อมของ TGF- β 1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs)

ในภาวะบาดเจ็บเซลล์ LESCs ที่อยู่ภาวะ quiescence จะถูกกระตุ้นให้เข้าสู่ cell cycle เป็นที่ทราบกันดีว่า TGF- β 1 มีผลต่อเซลล์ keratocytes เช่น cell migration, proliferation เป็นต้น ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาผลการเปลี่ยนของเซลล์ keratocytes หลังจากตอบสนองด้วย TGF- β 1 ซึ่งอาจมีส่วนในการกระตุ้นเซลล์ LESCs

2.1 Inflammatory cytokine หลังมากขึ้นหลังจากที่เซลล์ keratocytes ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1

เพื่อทำการศึกษาเซลล์ keratocytes ที่ ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการหลั่ง cytokine จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF basic, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1(MCAF), MIP-1a, PDGF-bb, MIP-1b, RANTES, TNF-a, VEGF โดยใช้ Bio-Plex Assays เพื่อวิเคราะห์ cytokine ที่หลั่งจากเซลล์ keratocytes เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 50 ng/ml นานเป็นเวลา 3 วัน หลังจากนั้นเก็บ media ไปทำการวิเคราะห์ พบว่าเซลล์ keratocytes ในสถานะที่ถูกกระตุ้น มีการหลั่ง IL-6 และ VEGF ในระดับที่สูงกว่าเซลล์ keratocytes ที่ไม่ถูกกระตุ้น คือ 8.59 เท่า และ 1.758 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงใน ภาพที่ 18 การทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเซลล์ keratocytes จะมีการหลั่ง Inflammatory cytokine เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง VEGF ซึ่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Angiogenesis ซึ่งการเกิด Angiogenesis ในผิวกระจกตานี้อาจนำไปสู่การสูญเสียการมองเห็น

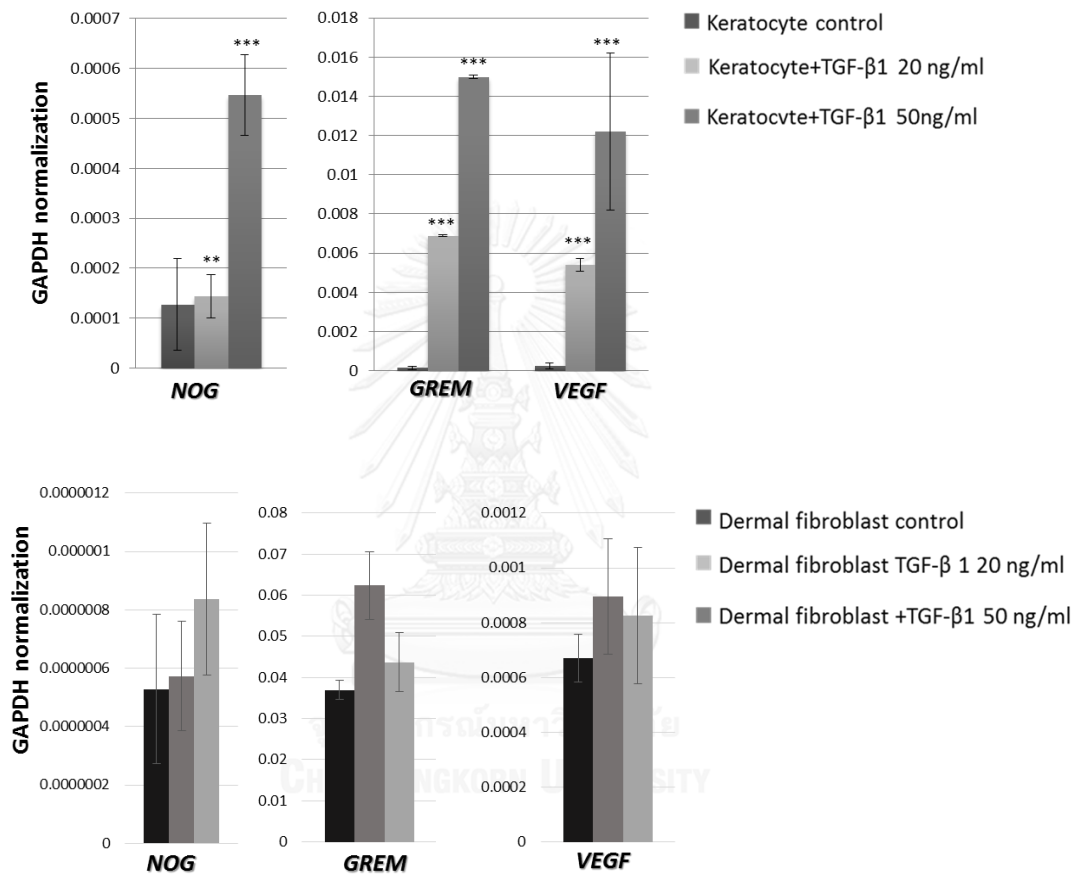


ภาพที่ 17 แสดงผลปริมาณ cytokine ที่หลังจากเซลล์ keratocytes เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 50 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโดย Bio-Plex Assays

2.2 เซลล์ keratocytes มีการแสดงออกของ BMP antagonist มากขึ้นอย่างจำเพาะเมื่อสัมผัสกับ TGF- β 1

สัญญาณที่มาจาก niche มีบทบาทสำคัญในการควบคุม quiescence, self-renewal และ fate decision ในหลายๆ เซลล์เช่น skin, gut, intestine และ bone marrow พบว่า BMP antagonist ที่มาจาก niche สามารถกระตุ้น self-renewal ใน dermal papilla (Zhang et al., 2006) ใน hair follicle พบว่า BMP antagonist สัญญาณที่ส่งจาก niche จะกระตุ้นให้ stem cell ออกจากภาวะ quiescence (Genander et al., 2014) ดังนั้นผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาผลของ TGF- β 1 ต่อ BMP antagonist คือ Noggin และ Gremlin ในเซลล์ keratocytes โดยทำการกระตุ้นเซลล์ keratocytes ด้วย TGF- β 1 ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml และ 50 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการสกัด RNA ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NOG*, *GREM* และ *VEGF* การศึกษาพบว่าเมื่อทำการกระตุ้นเซลล์ keratocytes ด้วย TGF- β 1 ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *NOG*, *VEGF* และ *GREM* มากขึ้น 1.13 เท่า, 22 เท่า และ 45.9 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ keratocytes ที่ไม่ถูกกระตุ้น และจะมีการแสดงออกมากขึ้นเป็น 4.29 เท่า, 50 เท่า และ 99 เท่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้น TGF- β 1 เป็น 50 ng/ml จากการศึกษาจึงพบว่าการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *NOG*, *VEGF* และ *GREM* โดย TGF- β 1 จะมีความจำเพาะในเซลล์ keratocytes เท่านั้น เนื่องจากใน dermal fibroblast

ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 พบการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เซลล์ keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกยีน *NOG*, *VEGF* และ *GREM* แตกต่างจาก dermal fibroblast (ภาพที่ 18) แต่อย่างไรก็ดียังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวส่งผลอย่างไรต่อเซลล์ LSCs



ภาพที่ 18 แสดงผล RT-PCR ในการแสดงออกของยีน *NOG*, *GREM* และ *VEGF* อย่างแตกต่างในเซลล์ keratocytes (A) เมื่อเทียบกับ dermal fibroblast (B) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml และ 50 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน (***) $P < 0.0001$, ** $P < 0.05$)

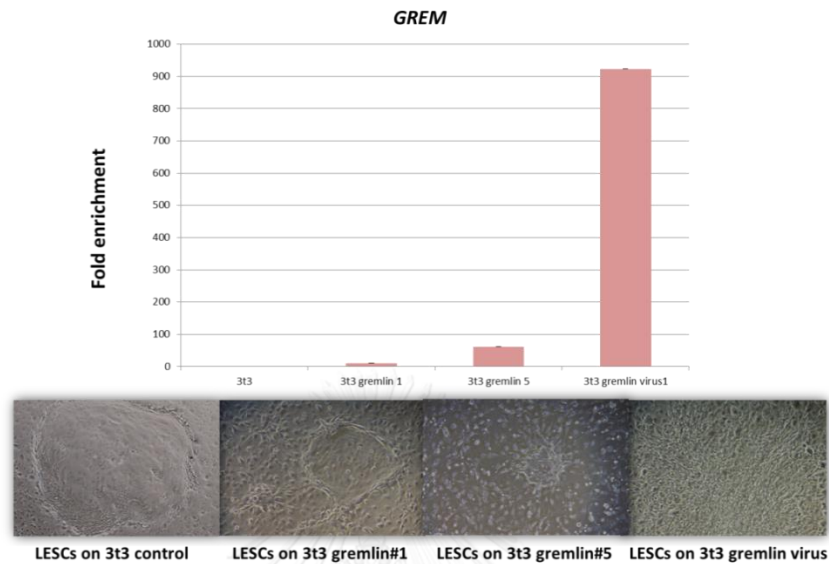
2.3 BMP antagonist ที่มีต่อคุณสมบัติของเซลล์ LSCs

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการที่เซลล์ keratocytes มีการแสดงออกของ *NOG* และ *GREM* มากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย $TGF-\beta 1$ แต่อย่างไรก็ดียังไม่มีการศึกษาว่าในสภาวะที่เซลล์ keratocytes มีการแสดงออกของ *NOG* และ *GREM* ในปริมาณมากจะมีผลอย่างไรต่อเซลล์ LSCs ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาโดยการสร้าง stable line โดยใช้ 3t3 overexpress *NOG* และ *GREM*

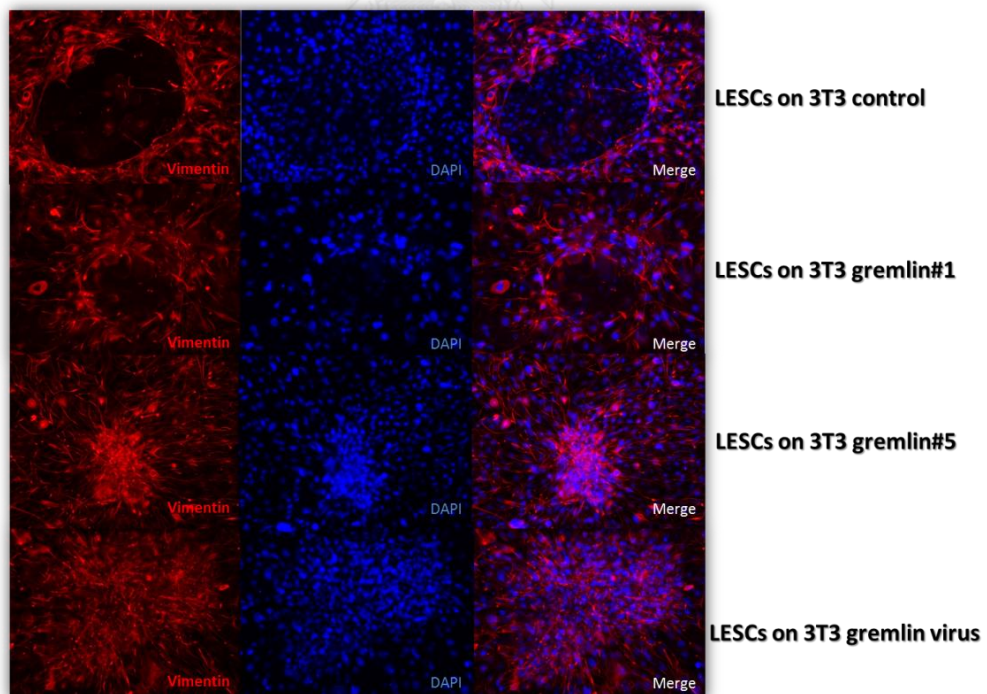
จากการศึกษาผลของเซลล์ keratocytes เมื่อถูกกระตุ้นด้วย $TGF-\beta 1$ มีการแสดงออกของ *GREM* เพิ่มขึ้นอย่างมากและจำเพาะกับเซลล์ keratocytes ศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเพิ่มขึ้นของ gremlin ส่งผลต่อค่า IOP (Intraocular pressure) และ upregulate ECM protein (Fibronectin) ใน trabecular meshwork (TM) ของหนู และนำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิด ocular hypertension (McDowell et al., 2015) ผู้วิจัยศึกษาผลของ Gremlin ต่อเซลล์ LSCs โดยการสร้างและคัดเลือก stable cell line ที่มีการแสดงออกของโปรตีน Gremlin ในเซลล์ 3t3 จำนวน 5 โคลน คัดเลือกคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของปริมาณโปรตีนที่แตกต่างคือ 3t3 gremlin#1 มีการแสดงออกของ *GREM* เพิ่มขึ้น 8 เท่า เมื่อเทียบกับ control และ 3t3 gremlin#5 เพิ่มขึ้น 19.5 เท่าเมื่อเทียบกับ control และ 3t3 gremlin virus เพิ่มขึ้น 57 เท่า จากนั้นนำเซลล์ LSCs เพาะเลี้ยงบน stable cell line พบว่า stable cell line ในแต่ละ clone ให้ลักษณะโคโลนีที่ต่างกัน โดยพบว่าใน stable cell line ที่มีการแสดงออกของ *GREM* ในปริมาณต่ำ (3t3 gremlin#1) พบโคโลนีมีลักษณะเป็น holoclone อยู่บ้าง แต่ใน 3t3 gremlin#5 เริ่มพบโคโลนีที่มีลักษณะ holoclone น้อยลงแต่จะพบโคโลนีที่เป็น aboard colony และใน 3t3 gremlin virus ไม่พบลักษณะโคโลนีที่เป็น holoclone แต่กลับพบว่าโคโลนีส่วนใหญ่เป็น fibroblast แสดงดังภาพที่ 19 และพบว่าโคโลนีที่มีลักษณะเป็น fibroblast ย้อมติดแอนติบอดีต่อโปรตีน Vimentin (ภาพที่ 20)

เมื่อทดสอบความสามารถในการเกิด clonogenic potential บน stable cell line จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ LSCs ที่เลี้ยงบนเซลล์ 3t3 gremlin#1 มีความสามารถในการเกิด colony forming เพิ่มขึ้น 2.27 เท่า เมื่อเทียบกับ control อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.0001$) และเซลล์ LSCs ที่เลี้ยงบนเซลล์ 3t3 gremlin#5 เพิ่มขึ้น 1.55 เท่า เมื่อเทียบกับ control อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แสดงดังภาพที่ 21 แต่เมื่อนำเซลล์ LSCs ที่เจริญบน 3t3 gremlin#1

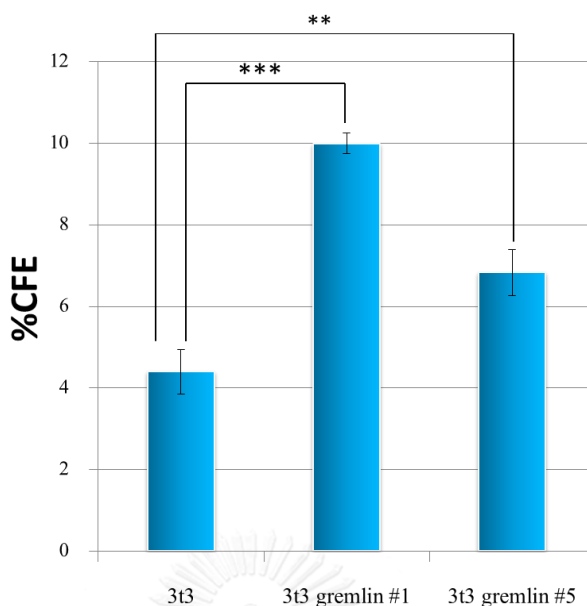
วิเคราะห์การแสดงออกของ *KRT1*, *KRT10*, *KRT12* และ *FN* พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเป็น 2.4 เท่า, 4.3 เท่า, 6.36 เท่า และ 2.42 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับ 3t3 control (ภาพที่ 22)



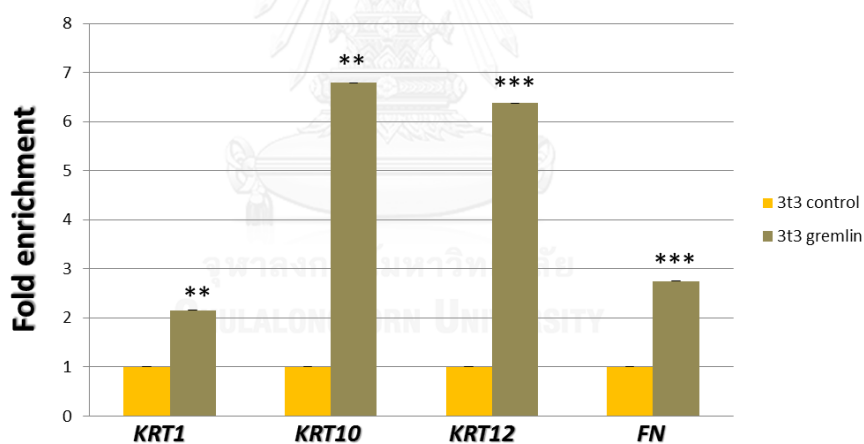
ภาพที่ 19 แสดงผลระดับการแสดงออกของ *GREM* ใน stable cell line และลักษณะโคโลนีของ เซลล์ LESCs ที่เจริญบน stable cell line แต่ละ clone



ภาพที่ 20 แสดงการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค immunofluorescence ย้อมด้วยแอนติบอดี Vimentin



ภาพที่ 21 แสดงการเปรียบเทียบจำนวน %CFE ของเซลล์ LSCs ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 gremlin#1, 3t3 gremlin#5 และเซลล์ 3t3 (** $P < 0.05$), *** $P < 0.0001$)



ภาพที่ 22 แสดงผลการแสดงออกของยีน *KRT1*, *KRT10*, *KRT12* และ *FN* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเซลล์ LSCs ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 และ 3t3 gremlin#1 (** $P < 0.05$), *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.05$)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณการแสดงออกของยีน *GREM* มีผลต่อการเกิดโคโลนีของเซลล์ LSCs และ Gremlin เพิ่ม clonogenic potential แต่พบว่าเซลล์ LSCs มีการแสดงออกของ differentiation marker (*KRT12*), EMT marker (*FN*) และ epidermis

(*KRT1*, *KRT10*) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ LSCs ที่เพาะเลี้ยงบน 3t3 control การที่เซลล์ LSCs มีการแสดงออกของ epidermis marker ในระดับที่สูง แสดงให้เห็นว่า Gremlin อาจเกี่ยวข้องกับเกิด Squamous metaplasia ในกระจกตา แต่อย่างไรก็ดีจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานดังกล่าวต่อไป

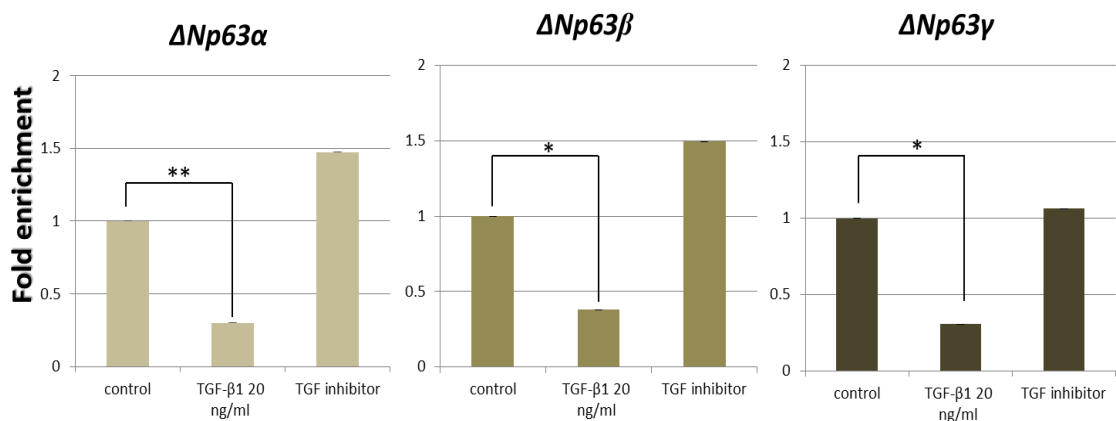
แต่จากผลการศึกษา 3t3 overexpress *NOG* นั้นยังไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากของมูลที่ได้ยังไม่ชัดเจน (ผลการทดลองแสดงในภาคผนวก)

3. กลไกที่ TGF- β 1 ควบคุม self-renewal ในเซลล์ LSCs

P63 เป็น master regulatory gene ของ self-renewal ของ epithelia cell หลายชนิด รวมทั้งเซลล์ LSCs โดยเฉพาะ Δ Np63 isoform (Memmi et al., 2015) จากการที่ TGF- β 1 ผลต่อการเกิด self-renewal ในเซลล์ LSCs ดังนั้นผู้วิจัยว่า TGF- β 1 อย่งไรต่อ Δ Np63 isoform

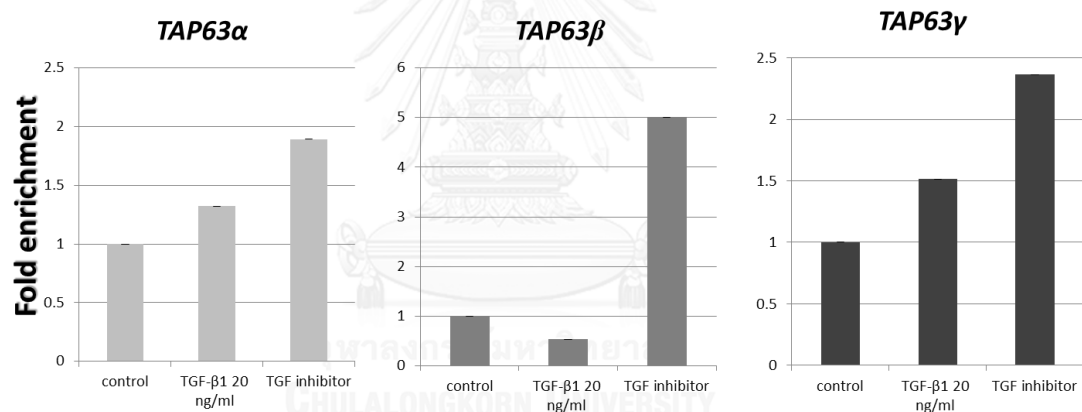
3.1 ผลของ TGF- β 1 ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง P63 isoforms ในเซลล์ LSCs

จากการทดลองผลของ TGF- β 1 ที่ต่อ *P63* isoforms โดยการใส่ TGF- β 1 20 ng/ml, TGF inhibitor ในขณะที่เซลล์ LSCs เจริญเป็นโคโลนีบนเซลล์ที่เลี้ยง 3t3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูการแสดงออกของยีน *P63* isoforms พบว่าเซลล์ LSCs เมื่อใส่ TGF- β 1 20 ng/ml มีผลต่อ Δ Np63 คือระดับการแสดงออกของยีนลดลงในทุก isoforms คือ Δ Np63 α , Δ Np63 β และ Δ Np63 γ ในขณะที่ *TAp63* isoforms ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใส่ TGF inhibitor ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบการแสดงออกของ *TAp63* α , *TAp63* β และ *TAp63* γ เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ control แต่พบว่ายังมีระดับการแสดงออกที่ต่ำมาก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TGF- β 1 กดการแสดงออกของ Δ Np63 isoform



ภาพที่ 23 แสดงผล RT-PCR ของ $\Delta Np63$ isoforms: $\Delta Np63\alpha$, $\Delta Np63\beta$ และ $\Delta Np63\gamma$

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$)



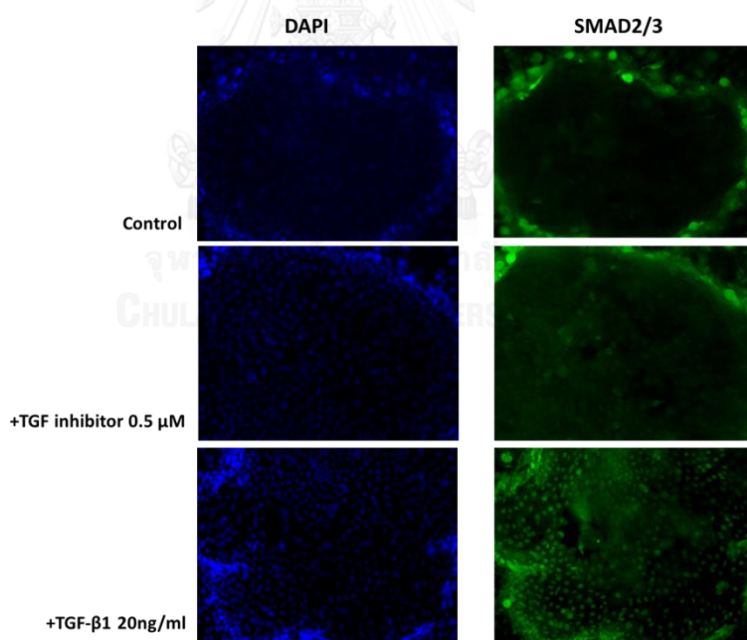
ภาพที่ 24 แสดงผล RT-PCR ของ TAp63 isoform: TAp63 α , TAp63 β และ TAp63 γ

3.2 ตรวจสอบโปรตีน Smad2/3 จับบริเวณ $\Delta Np63$ promoter

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านทาง Smad2/3 P63 ประกอบด้วย 2 promoter คือ TA promoter และ ΔN promoter นอกจากนี้ยังพบว่าแต่ละ promoter ยังเกิดการ splicing ได้อีกอย่างละ 3 isoforms คือ α , β และ γ รวมทั้งหมดจึงมี 6 isoforms แต่ละ isoform ของ P63 มีความจำเป็นต่อความสามารถในการเพิ่มจำนวน limbal stem cells และเกี่ยวข้องกับการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระจกตา

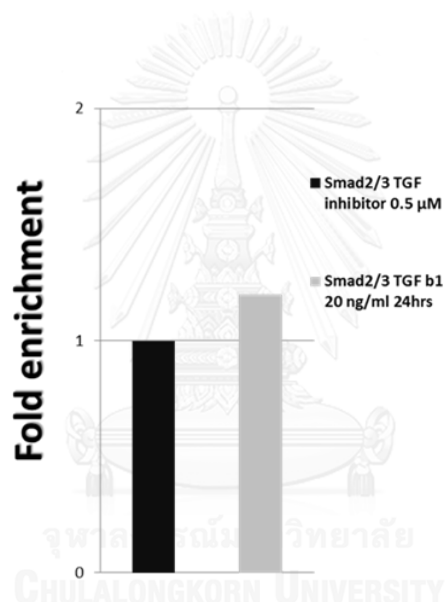
จากการศึกษาผลของ TGF- β 1 ที่มีต่อเซลล์ LESC โดยตรงพบว่าทำให้เซลล์ LESC เกิด EMT และทำให้จำนวนโคโลนีลดลง และยังพบว่าเมื่อยับยั้ง TGF สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ LESC ได้ถึง 14 passage แต่อย่างไรก็ดียังไม่ทราบว่า TGF- β 1 มีผลต่อจำนวนโคโลนีผ่านกลไกใด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า TGF- β 1 ควบคุมการแสดงออกของยีนผ่านทาง Smad2/3 และ ยีน P63 เป็นยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการคุณสมบัติเป็นเซลล์ต้นกำเนิดกระดูกตา แต่อย่างไรก็ดียังไม่มีการวิจัยใดแสดงให้เห็นว่า TGF- β 1 ควบคุมการแสดงออกของยีน P63 ผ่านทาง Smad2/3 ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาบทบาทของ TGF- β 1 ต่อการแสดงออกของยีน P63 ผ่านทาง Smad2/3 หรือไม่

จากผลการทดลองย้อม Anti-Smad2/3 ในเซลล์ LESC พบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้อมติด Smad2/3 ภายในนิวเคลียสมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ LESC ที่ไม่ถูกกระตุ้น หรือเพาะเลี้ยงร่วมกับ TGF inhibitor (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 25 แสดงภาพผลการย้อม nuclear Smad2/3 โดยวิธี immunofluorescence ในเซลล์ LESC ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง 3t3, เซลล์ LESC ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง 3t3+TGF inhibitor 0.5 μ M, เซลล์ LESC ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์พี่เลี้ยง 3t3+TGF- β 1 20 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในการศึกษา Smad binding ใน $\Delta Np63$ promotor โดยเทคนิค chromatin immunoprecipitation และเทคนิค real time PCR ผล CHIP-RT PCR พบว่าในเซลล์ LESC ที่กระตุ้นด้วย TGF- β 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml พบการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นเพียง 1.2 เท่า เมื่อเทียบเซลล์ LESC ที่กระตุ้นด้วย TGF inhibitor 0.5 μ M ทำให้ยังไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่า TGF- β 1 ควบคุมการแสดงออกของ *P63* ผ่านทาง Smad signaling แต่อย่างไรก็ดีก็ยังจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อว่ามีตำแหน่งใดบ้าง (ทั้ง genome) นอกเหนือจากตำแหน่งดังกล่าวที่โปรตีน Smad2/3 สามารถจับได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค CHIP-seq ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย CHIP-seq ยังทำให้ทราบว่ายีน (target gene) ใดที่จำเป็นต้องอาศัย Smad2/3 กับ P63 transcription factor ในการ control ยีนในเซลล์ LESC



ภาพที่ 26 แสดงภาพผล fold enrichment ที่ได้จาก CHIP-RT PCR

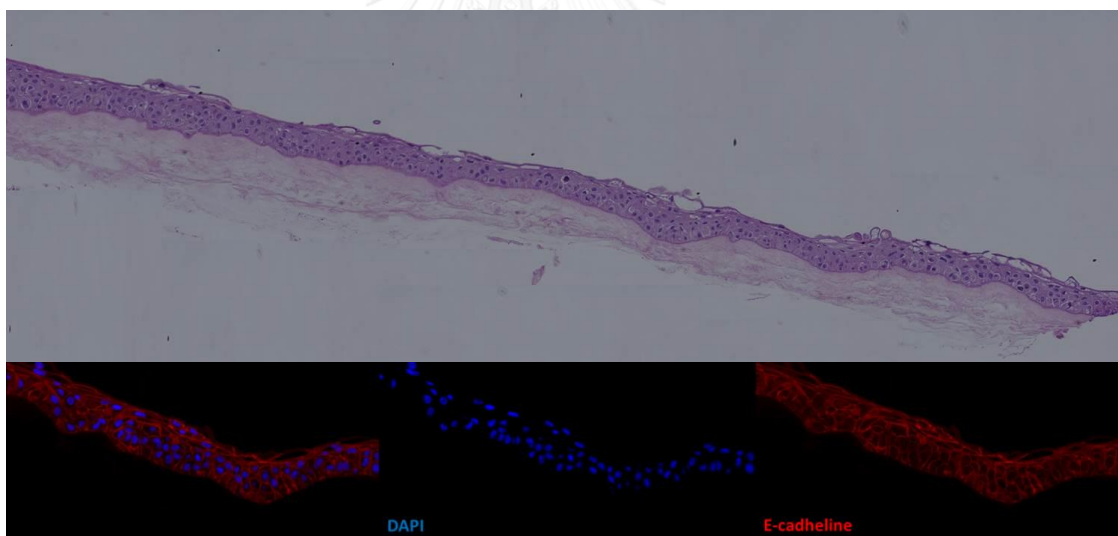
บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เซลล์กระจกตาเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเซลล์ใหม่เพื่อซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหายเมื่อกระจกตาได้รับบาดเจ็บ โดยอาศัย Limbal epithelial stem cells (LESCs) หรือเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตา ซึ่งทำหน้าที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดและเปลี่ยนแปลงไปเป็นกระจกตา ทั้งนี้ในสภาวะปกติ เซลล์ LESCs จะไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน แต่จะเพิ่มจำนวนเมื่อมีการกระตุ้นจากสัญญาณต่างๆ ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยอาศัย microenvironment หรือ niche ในการส่งสัญญาณ จากความรู้ต่างๆ ที่ได้จากการศึกษาเซลล์ LESCs ทำให้ในปี 1997 ประสบความสำเร็จในการปลูกถ่ายแผ่นกระจกตาในผู้ป่วย limbal stem cell deficiency รายแรก ปัจจุบันมีความก้าวหน้าในการสร้างแผ่นกระจกตาและการนำไปใช้ทางคลินิกเป็นมาตรฐานที่สหภาพยุโรปยอมรับ (G. Pellegrini et al., 2016) *P63* เป็น mark stem cell ของ epithelial (G. Pellegrini et al., 2001) และ corneal stem cell (De Rosa et al., 2009) ในการสร้างแผ่นกระจกจะมีเพื่อนำไปปลูกถ่ายโดยโอกาสประสบความสำเร็จขึ้นกับอัตราส่วนร้อยละของ *P63* ที่อยู่ในแผ่นกระจกตา (Rama et al., 2010)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ LESCs ภายนอกร่างกายวิธีเดิมมักประสบปัญหาการเกิด clonal evolution เลี้ยงได้ไม่เกิน 3 passage (Lopez-Paniagua et al., 2013) ในขณะที่ศึกษาผู้วิจัย พบว่าการยับยั้ง TGF- β 1 ทำให้สามารถเพาะเลี้ยง LESCs ได้ถึง 14 passage และสามารถรักษาความเป็นเซลล์ต้นกำเนิด โดยดูจากสร้าง holoclone ยังไม่มีคนรายงานมาก่อน ซึ่งมีประโยชน์ในการนำไปใช้สร้างแผ่นกระจกตาจำนวนมากโดยพบว่าเมื่อ seed เซลล์แล้วยังมีเซลล์ที่มี %*P63* ในแผ่นกระจกตาสูง มีความเป็นไปได้ที่จะให้ผลดีกว่าระยะยาวเมื่อปลูกถ่าย การที่สามารถ long-term expansion เซลล์ LESCs ได้นั้นทำให้สามารถทำ genome editing เช่นเดียวกับเซลล์ keratinocyte (Bauer et al., 2017) (ใน limbal ยังไม่มีใครทำสำเร็จ) จากการข้อมูลการปลูกถ่าย limbal explant ที่พบว่า HLA match ได้ผลดีกว่า ดังนั้นการใช้ genome editing ใน adult LESCs เพื่อสร้างแผ่นกระจกตาที่ไม่มี HLA class1 เป็นวิธีที่ประหยัดและมีประสิทธิภาพกว่าสร้างแผ่นกระจกตาที่ไม่มี HLA จาก iPSC (Hayashi et al., 2016)

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงใน niche ตามมาหลัง injury signal ทางผู้วิจัยพบ BMP antagonist คือ Gremlin ซึ่งปกติพบน้อยใน tissue ทั่วไป (Sneddon et al., 2006) ข้อมูลที่ผู้วิจัยได้จากการทดลองแสดงว่า Gremlin อาจเกี่ยวกับการกระตุ้น stem cell ออกจาก quiescence ซึ่งสนับสนุนงานวิจัยที่แสดงว่า BMP สำคัญต่อ quiescence ของเซลล์ LESC (S. Y. Chen et al., 2015; Y. T. Chen et al., 2013; Han, Chen, Zhu, & Tseng, 2014) ในการเปลี่ยนแปลงของระดับ BMP signaling ในช่วง injury คล้ายกับการ activation ของ hair follicle stem cell ในเวลาต่างๆ ที่สอดคล้องกับ BMP signaling (Genander et al., 2014) พบอีกว่า Gremlin ยังเพิ่ม *KRT1, KRT10* ของ skin อาจเป็นกลไกสำคัญในการเกิด squamous metaplasia นอกเหนือจาก cytokine ที่เคยมีรายงาน (S. Li, Gallup, Chen, & McNamara, 2010) และการยับยั้ง TGF อาจเป็นแนวทางการรักษาใหม่



ภาพที่ 27 แสดงลักษณะแผ่นกระจกตาที่มาจากชิ้นเนื้อขนาด 2x2 mm ทำการเพิ่มจำนวนและขึ้นแผ่นผิวกระจกตาบนรกโดยใช้ TGF inhibitor

รายการอ้างอิง

- Barnard, Z., Apel, A. J., & Harkin, D. G. (2001). Phenotypic analyses of limbal epithelial cell cultures derived from donor corneoscleral rims. *Clin Exp Ophthalmol*, 29(3), 138-142.
- Barrandon, Y., & Green, H. (1987). Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(8), 2302-2306.
- Bauer, J. W., Koller, J., Murauer, E. M., De Rosa, L., Enzo, E., Carulli, S., De Luca, M. (2017). Closure of a Large Chronic Wound through Transplantation of Gene-Corrected Epidermal Stem Cells. *J Invest Dermatol*, 137(3), 778-781.
- Baum, J. L. (1970). Melanocyte and Langerhans cell population of the cornea and limbus in the albino animal. *Am J Ophthalmol*, 69(4), 669-676.
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337.
- Chen, S. Y., Han, B., Zhu, Y. T., Mahabole, M., Huang, J., Beebe, D. C., & Tseng, S. C. (2015). HC-HA/PTX3 Purified From Amniotic Membrane Promotes BMP Signaling in Limbal Niche Cells to Maintain Quiescence of Limbal Epithelial Progenitor/Stem Cells. *Stem Cells*, 33(11), 3341-3355.
- Chen, Y. T., Chen, F. Y., Vijmasi, T., Stephens, D. N., Gallup, M., & McNamara, N. A. (2013). Pax6 downregulation mediates abnormal lineage commitment of the ocular surface epithelium in aqueous-deficient dry eye disease. *PLoS One*, 8(10), e77286.
- Chen, Z., de Paiva, C. S., Luo, L., Kretzer, F. L., Pflugfelder, S. C., & Li, D. Q. (2004). Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells*, 22(3), 355-366.
- Davanger, M., & Evensen, A. (1971). Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*, 229(5286), 560-561.

- de Paiva, C. S., Chen, Z., Corrales, R. M., Pflugfelder, S. C., & Li, D. Q. (2005). ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells*, 23(1), 63-73.
- De Rosa, L., Antonini, D., Ferone, G., Russo, M. T., Yu, P. B., Han, R., & Missero, C. (2009). p63 Suppresses non-epidermal lineage markers in a bone morphogenetic protein-dependent manner via repression of Smad7. *J Biol Chem*, 284(44), 30574-30582.
- Di Iorio, E., Barbaro, V., Ruzza, A., Ponzin, D., Pellegrini, G., & De Luca, M. (2005). Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27), 9523-9528.
- Fuchs, E., Tumber, T., & Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116(6), 769-778.
- Genander, M., Cook, P. J., Ramskold, D., Keyes, B. E., Mertz, A. F., Sandberg, R., & Fuchs, E. (2014). BMP signaling and its pSMAD1/5 target genes differentially regulate hair follicle stem cell lineages. *Cell Stem Cell*, 15(5), 619-633.
- Grueterich, M., Espana, E. M., & Tseng, S. C. (2003). Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol*, 48(6), 631-646.
- Han, B., Chen, S. Y., Zhu, Y. T., & Tseng, S. C. (2014). Integration of BMP/Wnt signaling to control clonal growth of limbal epithelial progenitor cells by niche cells. *Stem Cell Res*, 12(2), 562-573.
- Hayashi, R., Ishikawa, Y., Sasamoto, Y., Katori, R., Nomura, N., Ichikawa, T., Nishida, K. (2016). Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature*, 531(7594), 376-380.
- Ichikawa, T., Suenaga, Y., Koda, T., Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2008). DeltaNp63/BMP-7-dependent expression of matrilin-2 is involved in keratinocyte migration in response to wounding. *Biochem Biophys Res Commun*, 369(4), 994-1000.
- Jones, P. H., Simons, B. D., & Watt, F. M. (2007). Sic Transit Gloria: Farewell to the Epidermal Transit Amplifying Cell? *Cell Stem Cell*, 1(4), 371-381.
- Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*, 25(1), 76-84.

- Kinoshita, S., Adachi, W., Sotozono, C., Nishida, K., Yokoi, N., Quantock, A. J., & Okubo, K. (2001). Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 20(5), 639-673.
- Klenkler, B., & Sheardown, H. (2004). Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res*, 79(5), 677-688.
- Kouwenhoven, E. N., van Bokhoven, H., & Zhou, H. (2015). Gene regulatory mechanisms orchestrated by p63 in epithelial development and related disorders. *Biochim Biophys Acta*, 1849(6), 590-600.
- Ksander, B. R., Kolovou, P. E., Wilson, B. J., Saab, K. R., Guo, Q., Ma, J., Frank, N. Y. (2014). ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*, 511(7509), 353-357.
- Lapraz, F., Rottinger, E., Duboc, V., Range, R., Duloquin, L., Walton, K., Lepage, T. (2006). RTK and TGF-beta signaling pathways genes in the sea urchin genome. *Dev Biol*, 300(1), 132-152.
- Lauweryns, B., van den Oord, J. J., & Missotten, L. (1993). The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34(6), 1991-1999.
- Lawrenson, J. G., & Ruskell, G. L. (1991). The structure of corpuscular nerve endings in the limbal conjunctiva of the human eye. *J Anat*, 177, 75-84.
- Li, L., & Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 605-631. Li, S., Gallup, M., Chen, Y. T., & McNamara, N. A. (2010). Molecular mechanism of proinflammatory cytokine-mediated squamous metaplasia in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(5), 2466-2475.
- Li, W., Hayashida, Y., Chen, Y.-T., & Tseng, S. C. G. (2007). Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Research*, 17(1), 26-36.
- Ljubimov, A. V., Burgeson, R. E., Butkowski, R. J., Michael, A. F., Sun, T. T., & Kenney, M. C. (1995). Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest*, 72(4), 461-473.

- Lopez-Paniagua, M., Nieto-Miguel, T., de la Mata, A., Galindo, S., Herreras, J. M., Corrales, R. M., & Calonge, M. (2013). Consecutive expansion of limbal epithelial stem cells from a single limbal biopsy. *Curr Eye Res*, *38*(5), 537-549.
- Luo, T., Cui, S., Bian, C., & Yu, X. (2014). Crosstalk between TGF-beta/Smad3 and BMP/BMP2 signaling pathways via miR-17-92 cluster in carotid artery restenosis. *Mol Cell Biochem*, *389*(1-2), 169-176.
- Memmi, E. M., Sanarico, A. G., Giacobbe, A., Peschiaroli, A., Frezza, V., Cicalese, A., Bernassola, F. (2015). p63 Sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(11), 3499-3504.
- Michel, M., Torok, N., Godbout, M. J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A., & Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci*, *109* (Pt 5), 1017-1028.
- Miyazono, K., Maeda, S., & Imamura, T. (2005). BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*, *16*(3), 251-263.
- Moore, K. A., & Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science*, *311*(5769), 1880-1885.
- Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Tano, Y. (2004). Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, *351*(12), 1187-1196.
- Ordonez, P., & Di Girolamo, N. (2012). Limbal Epithelial Stem Cells: Role of the Niche Microenvironment. *Stem Cells*, *30*(2), 100-107.
- Oshimori, N., & Fuchs, E. (2012). The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. *Cell Stem Cell*, *11*(6), 751-764.
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., De Luca, M. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(6), 3156-3161.

- Pellegrini, G., Golisano, O., Paterna, P., Lambiase, A., Bonini, S., Rama, P., & De Luca, M. (1999). Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol*, *145*(4), 769-782.
- Pellegrini, G., Lambiase, A., Macaluso, C., Pocobelli, A., Deng, S., Cavallini, G. M., Rama, P. (2016). From discovery to approval of an advanced therapy medicinal product-containing stem cells, in the EU. *Regen Med*, *11*(4), 407-420.
- Pellegrini, G., Traverso, C. E., Franzi, A. T., Zingirian, M., Cancedda, R., & De Luca, M. (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *The Lancet*, *349*(9057), 990-993.
- Rama, P., Matuska, S., Paganoni, G., Spinelli, A., De Luca, M., & Pellegrini, G. (2010). Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*, *363*(2), 147-155.
- Schlotzer-Schrehardt, U., & Kruse, F. E. (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*, *81*(3), 247-264. doi:10.1016/j.exer.2005.02.016
- Schmierer, B., & Hill, C. S. (2007). TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *8*(12), 970-982.
- Secker, G. A., & Daniels, J. T. (2008). Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation. *Stem Cell Rev*, *4*(3), 159-168.
- Sneddon, J. B., Zhen, H. H., Montgomery, K., van de Rijn, M., Tward, A. D., West, R., Brown, P. O. (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(40), 14842-14847.
- Solomon, A., Ellies, P., Anderson, D. F., Touhami, A., Grueterich, M., Espana, E. M., Tseng, S. C. (2002). Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*, *109*(6), 1159-1166.
- Tseng, S. C. (1989). Concept and application of limbal stem cells. *Eye (Lond)*, *3* (Pt 2), 141-157.
- Tuori, A., Uusitalo, H., Burgeson, R. E., Terttunen, J., & Virtanen, I. (1996). The immunohistochemical composition of the human corneal basement membrane. *Cornea*, *15*(3), 286-294.

- Vantrappen, L., Geboes, K., Missotten, L., Maudgal, P. C., & Desmet, V. (1985). Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 26(2), 220-225.
- Wang, D. Y., Cheng, C. C., Kao, M. H., Hsueh, Y. J., Ma, D. H., & Chen, J. K. (2005). Regulation of limbal keratinocyte proliferation and differentiation by TAp63 and DeltaNp63 transcription factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(9), 3102-3108.
- Wang, D. Y., Hsueh, Y. J., Yang, V. C., & Chen, J. K. (2003). Propagation and phenotypic preservation of rabbit limbal epithelial cells on amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(11), 4698-4704.
- Warner, S. M., Hackett, T. L., Shaheen, F., Hallstrand, T. S., Kicic, A., Stick, S. M., & Knight, D. A. (2013). Transcription factor p63 regulates key genes and wound repair in human airway epithelial basal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(6), 978-988.
- Wilson, S. E., Mohan, R. R., Mohan, R. R., Ambrosio, R., Jr., Hong, J., & Lee, J. (2001). The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res*, 20(5), 625-637.
- Wolosin, J. M., Xiong, X., Schutte, M., Stegman, Z., & Tieng, A. (2000). Stem cells and differentiation stages in the limbo-corneal epithelium. *Prog Retin Eye Res*, 19(2), 223-255.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., McKeon, F. (1999). p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398(6729), 714-718.
- Zhang, J., He, X. C., Tong, W. G., Johnson, T., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., Li, L. (2006). Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion. *Stem Cells*, 24(12), 2826-2839.

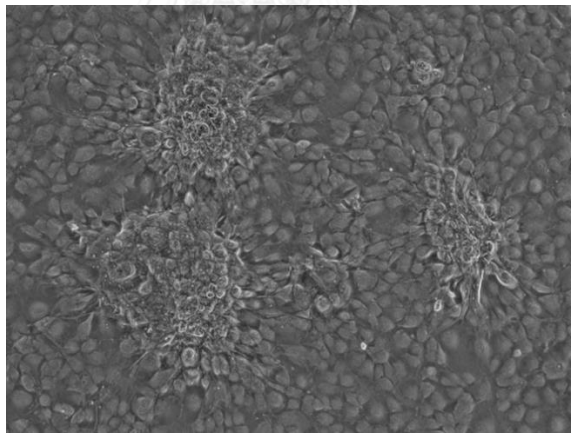


ภาคผนวก

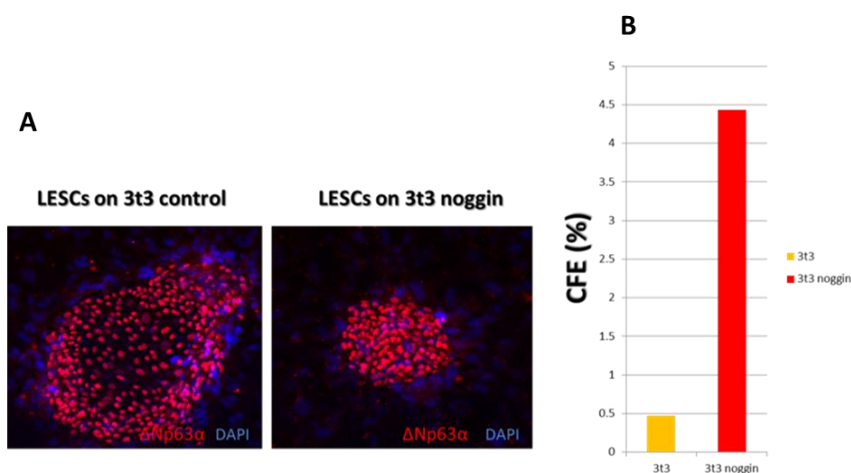
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3t3 overexpress NOG

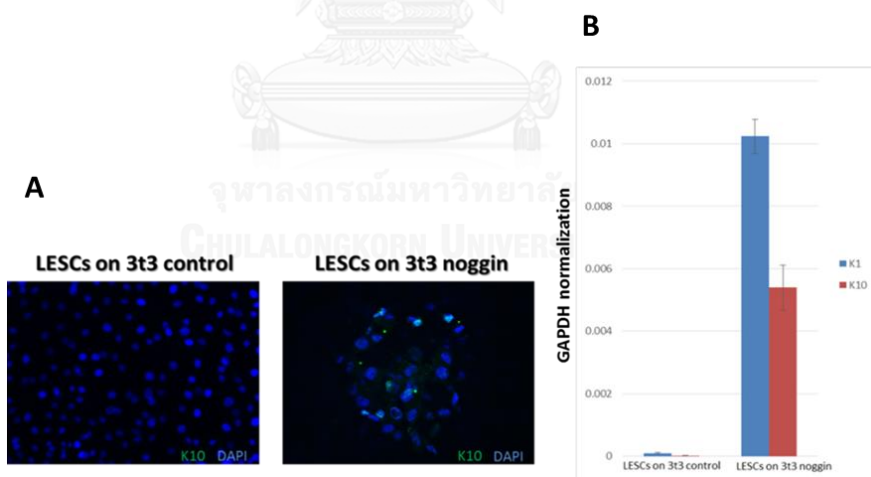
จากการคัดเลือก stable cell line พบว่ามีเซลล์ 3t3 noggin จำนวนหนึ่ง line มีลักษณะ biology ที่น่าสนใจคือพบว่า เมื่อนำมาเป็นเซลล์ที่เลี้ยงสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ LSCs พบว่าให้ลักษณะโคโลนีแตกต่างไปจากลักษณะโคโลนีของ epithelial คือไม่เป็น holoclone, meroclone และ paraclone แต่โคโลนีมีลักษณะเป็นกลุ่มหรือกระจุกของเซลล์เมื่อนำมาทำการศึกษา clonogenic potential พบว่าจำนวน %CFE มากกว่า 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ LSCs ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์ 3t3 และเมื่อนำมาทำการย้อมด้วยเทคนิค immunofluorescence ด้วยแอนติบอดี $\Delta Np63\alpha$ ซึ่งเป็น stem cell marker พบว่าโคโลนีของเซลล์ LSCs ที่เจริญอยู่บน 3t3 noggin พบว่าย้อมติด $\Delta Np63\alpha$ แต่อย่างไรก็ดีกลับพบว่าเซลล์ LSCs ที่เจริญบน 3t3 noggin มีการแสดงออกของ *KRT1* และ *KRT10* ซึ่งเป็น differentiation marker ของเซลล์ LSCs และเมื่อนำเซลล์ในโคโลนีดังกล่าวมาทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนบนเซลล์ที่เลี้ยง 3t3 พบว่าไม่สามารถเพิ่มจำนวนโคโลนีได้



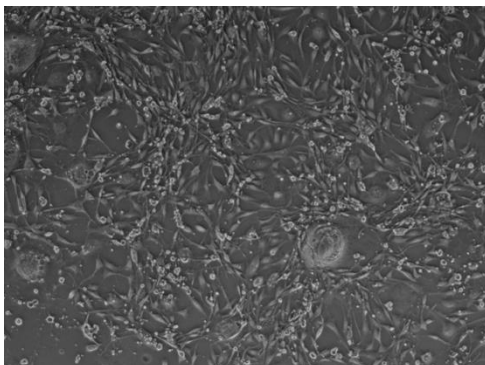
ภาพที่ 28 แสดงลักษณะโคโลนีของเซลล์ LSCs ที่เจริญบน 3t3 noggin ที่มีลักษณะเป็นกลุ่มหรือกระจุกเซลล์



ภาพที่ 29 A: แสดงการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค immunofluorescence ย้อมด้วยแอนติบอดี Δ Np63 α ในเซลล์ LESCs ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 และ 3t3 noggin
 B: แสดงการเปรียบเทียบจำนวน %CFE ของเซลล์ LESCs ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 noggin ที่มากกว่าถึง 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ LESCs ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์ 3t3



ภาพที่ 30 A: แสดงการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค immunofluorescence ย้อมด้วยแอนติบอดี K10 ในเซลล์ LESCs ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 และ 3t3 noggin
 B: แสดงผลการแสดงออกของยีน *KRT1* และ *KRT10* ด้วยเทคนิค RT-PCR เซลล์ LESCs ที่เจริญบนเซลล์ 3t3 noggin มีการแสดงออกในระดับสูงเมื่อเทียบกับเซลล์ LESCs ที่เพาะเลี้ยงบนเซลล์ 3t3

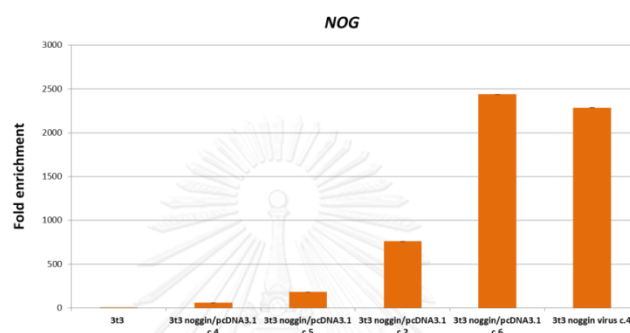


ภาพที่ 31 แสดงลักษณะเซลล์ LESC ที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปหลังจากผ่านการย่อยด้วย 0.25% Trypsin/EDTA จากโคโลนีที่เจริญบน 3t3 noggin และนำมาเพาะเลี้ยงต่อบน 3t3

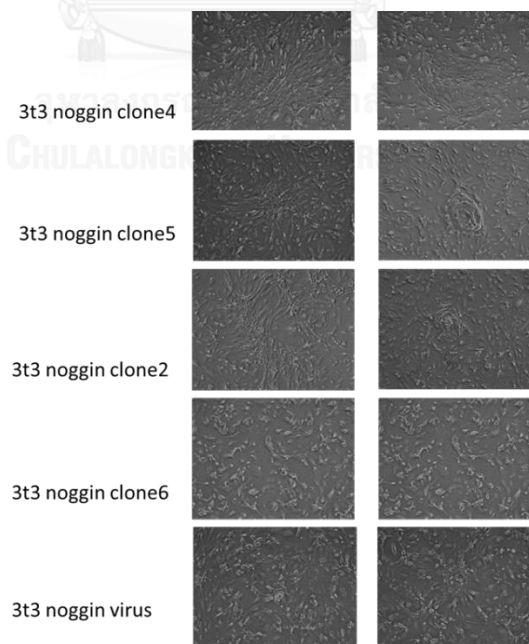
ผู้วิจัยจึงได้ทำการสร้าง stable cell line ขึ้นมาใหม่เพื่อเปรียบเทียบกับ stable cell line ดังกล่าว โดยได้ทำการคัดเลือกได้ทั้งหมด 5 clone ทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของ ยีน *NOG* โดยเทคนิค Real time PCR โดยแต่ละ clone มีการแสดงออกของยีน *NOG* ใน ปริมาณที่ต่างจากปริมาณน้อยถึงปริมาณมากที่สุดมากคือ 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone4, 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone5, 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone2, 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone6 และ 3t3 noggin virus clone4 ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าเซลล์ LESC ที่เจริญ บน 3t3 noggin ทุก clone ให้ผลคล้ายกันคือลักษณะโคโลนีเป็นเซลล์ fibroblast, aboard colony กล่าวได้ว่าเซลล์ LESC ไม่สามารถเจริญได้บนเซลล์ที่เลี้ยงดังกล่าว ซึ่งจะเห็นได้ว่าไม่พบ ลักษณะโคโลนีที่เป็นกลุ่มหรือกระจุกของเซลล์ เช่นเดียวกับ 3t3 noggin ที่ได้นำมาทำการศึกษาใน เบื้องต้น

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษา expression profile ของยีนใน clone ดังนี้คือ 3t3 noggin, 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone1 มีระดับการแสดงออกของยีน *NOG* ในระดับที่ต่ำมาก , 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone6 มีระดับการแสดงออกของยีน *NOG* ในระดับสูงที่สุด เปรียบเทียบกับเซลล์ 3t3 โดยเทคนิค microarray ผลการศึกษาพบว่า 3t3 noggin มีรูปแบบการ แสดงออกของยีนที่แตกต่างไปจาก 3t3 โดยสิ้นเชิง แต่ในเซลล์ 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone1 และ 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone6 ยังคงรูปแบบของยีนใกล้เคียงกับ 3t3 แสดงดังภาพที่ 14 ผลของ microarray แสดงให้เห็นว่า biology ต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ LESC ที่ทำการ

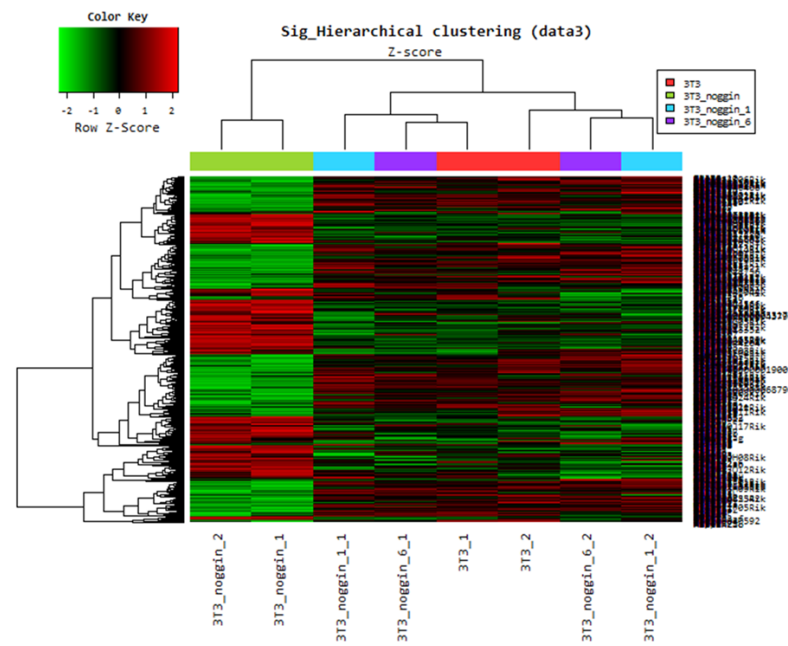
เพาะเลี้ยงบน 3t3 noggin นั้นอาจไม่ได้มาจากผลของ noggin โดยตรง อย่างไรก็ตามในเซลล์ line ดังกล่าวนี้น่าจำเป็นต้องทำการศึกษาในขั้นต่อไป แต่ผล microarray ของ 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone1 และ 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone6 แสดงให้เห็นว่ายังคงรูปแบบของยีนเหมือนกัน เซลล์ 3t3 ดังนั้นผลการศึกษาที่เกิดขึ้นกับเซลล์ LSCs น่าจะมาจากผลของการ overexpress *NOG* ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า Noggin มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดของ เซลล์ LSCs ในหลอดทดลอง



ภาพที่ 32 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน *NOG* ใน stable cell line ด้วยเทคนิค RT-PCR



ภาพที่ 33 แสดงลักษณะเซลล์ LSCs ที่เจริญบน 3t3 overexpress *NOG* ในแต่ละ clone



ภาพที่ 34 แสดงผล microarray ของเซลล์ 3t3, 3t3 noggin, 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone1 และ 3t3 noggin/pcDNA3.1 clone6; 3t3 noggin มีรูปแบบการแสดงออกยีนที่ต่างไปจากเซลล์ 3t3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ : นางสาวสุภาพร ครามจันทิก

ที่อยู่ : 104/54 หมู่5 หมู่บ้านทรัพย์เจริญ ต.ในคลองบางปลากด อ.พระสมุทรเจดีย์
จ.สมุทรปราการ 10290

เบอร์โทร : 094-323-5885

Emil : ying_buu24@hotmail.com

ข้อมูลส่วนตัว

วัน/เดือน/ปี เกิด : วันที่ 26 กรกฎาคม พ.ศ. 2528

สถานที่เกิด : จังหวัดนครราชสีมา

สถานะภาพ : โสด

การศึกษา

2556-ปัจจุบัน : ระดับการศึกษามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตรการแพทย์ แขนงวิชาเซลล์ต้นกำเนิดและเวชศาสตร์ฟื้นฟูสภาวะเสื่อม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2547-2550 : ระดับการศึกษามหาบัณฑิต หลักสูตรวิทยาศาสตร สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ผลงาน

นำเสนอผลงานรูปแบบโปสเตอร์

1.สุภาพร ครามจันทิก *, ดร.นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา** (วันที่ 10 มีนาคม 2560)
“ผลของ TGF- β ต่อ Limbal Stem Cell Niche ในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ Limbal Stem Cell” ในการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยบัณฑิตศึกษา ระดับชาติและนานาชาติ 2560 มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น