

## ผลของ TGF- $\beta$ ต่อ Limbal Stem Cell Niche ในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ Limbal Stem Cell

### Effect of TGF- $\beta$ on Limbal Stem Cell Niche in Activation of Limbal Stem Cell Proliferation

สุภาพร ธรรมจันทิก (Supaporn Khranchantuk)\* ดร.นิพัชญ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา (Dr.Nipan Isarsena)\*\*

#### บทคัดย่อ

เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาที่อยู่บริเวณลิมบัส Limbal epithelial stem cells (LESCs) จำเป็นต่อการคงสภาพความใสของกระจกตาและการซ่อมแซมเมื่อเกิดการบาดเจ็บ LESCs ในภาวะปกติส่วนใหญ่จะอยู่ในสภาวะ quiescence แต่เมื่อกระจกตาได้รับบาดเจ็บ LESCs จะถูกกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว กลไกในการกระตุ้นให้เกิด LESC activation ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาผลของ TGF-  $\beta$  1 ซึ่งเป็น cytokine ที่เพิ่มขึ้นและมีความสำคัญในภาวะบาดเจ็บของกระจกตา ต่อ keratocytes ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในสภาพแวดล้อมจุลภาคของ LESCs และต่อ LESCs เอง การศึกษา secretome ของ limbal keratocytes หลังการกระตุ้นด้วย TGF-  $\beta$  1 พบว่ามีการหลั่ง VEGF, IL-6 และ gremlin ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-  $\beta$  1 สามารถสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของ LESCs ทำให้มี colony formation efficiency เพิ่มขึ้นเทียบกับ keratocytes ที่ไม่ถูกกระตุ้น อย่างไรก็ตามเมื่อทำการกระตุ้น LESCs ด้วย TGF-  $\beta$  1 โดยตรง เป็นเวลานานพบว่า TGF-  $\beta$  1 เหนี่ยวนำให้เกิด Epithelial to mesenchymal transition (EMT) ทำให้ LESCs สูญเสียคุณสมบัติความเป็น stem cells ไป แสดงให้เห็นว่าสมดุลของ TGF-  $\beta$  signaling มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการรักษาคุณสมบัติของ LESCs และความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยง LESCs ภายนอกร่างกายต่อไป

#### ABSTRACT

Epithelial stem cells, which localize at the limbus region of the cornea (limbal epithelial stem cells (LESCs)), are essential for the maintenance of corneal transparency resulting in clear vision. LESCs are normally in a quiescent state during physiologic state but they can be stimulated to proliferate in response to corneal injury. However, the mechanisms, which are responsible for LESCs activation, are not well understood. The aim of this study is to examine the effect of TGF-  $\beta$  1, which is a key cytokine during corneal wound healing, on the LESC niche (limbal stromal cells or keratocytes) and LESCs. This study investigated the secretome of limbal keratocytes after TGF-  $\beta$  1 stimulation and revealed that VEGF, IL-6 and gremlin were increasingly secreted compared to the control. Additionally, keratocytes, which were activated by TGF-  $\beta$  1, enhanced colony formation efficiency (CFE) of LESCs compared to unstimulated keratocytes. Therefore, these findings suggested that TGF-  $\beta$  1 has an important role in signals from niche cells of LESCs and LESCs activation. However, prolonged exposure of LESCs to TGF-  $\beta$  1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) changes and reduction in CFE. Thus, this study attempted to demonstrate that the appropriate balance of TGF-  $\beta$  signaling crucially had an influence on LESCs maintenance and activation. The results possibly have implications for further developing long-term ex-vivo culture of LESCs for clinical applications in the future.

**คำสำคัญ:** TGF-  $\beta$  1 สภาพแวดล้อมจุลภาค Keratocytes

**Keywords:** TGF- $\beta$ 1, Niche, Keratocytes

\* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*\* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทนำ

Limbal epithelial stem cells (LESCs) จัดเป็น tissue-specific stem cells ชนิดหนึ่ง อยู่ในบริเวณ palisades of Vogt ซึ่งเต็มไปด้วยเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวสูง และอยู่ในชั้น basal ของบริเวณ Limbus epithelial ซึ่งอยู่ระหว่างตาขาว (Conjunctiva) และ ผิวกระจกตา (Corneal) (Kinoshita et al., 2001) โดย LESCs จะทำหน้าที่ผลิตเซลล์ที่จะเจริญและพัฒนาไปเป็นเซลล์กระจกตา (Corneal epithelial) ในสภาวะปกติจะมีการแบ่งตัวน้อยมากเพื่อให้สามารถคงสภาพเดิมและรักษาระดับสมดุลของเซลล์ในระบบ แต่จะมีการแบ่งตัวมากขึ้นเมื่อมีการซ่อมแซมผิวกระจกตาที่สึกหรอหรือถูกทำลายไป โดยเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) หนึ่งเซลล์จะแบ่งตัวได้เซลล์ที่มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ดั้งเดิมทุกประการ (stem cells) หนึ่งเซลล์ และได้ Transient amplifying cells (TACs) อีกหนึ่งเซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาจำกัด และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนที่ไปสู่บริเวณกระจกตาเพื่อสร้างเป็นเซลล์ผิวกระจกตาใหม่ (Tseng et al., 2016)

เซลล์กระจกตาเป็นเซลล์ที่สามารถสร้างเซลล์ใหม่เพื่อซ่อมแซมเซลล์ที่เสียหาย เมื่อกระจกตาได้รับบาดเจ็บโดยจะอาศัย Limbal epithelial stem cells (LESCs) เซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาทำหน้าที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ต้นกำเนิดและเปลี่ยนแปลงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตาให้เจริญเป็นกระจกตา ทั้งนี้ในสภาวะปกติ LESCs จะไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน แต่จะเพิ่มจำนวนเมื่อมีการกระตุ้นจากสัญญาณต่างๆทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยอาศัย microenvironment หรือ niche ในการส่งสัญญาณ โดยอาศัย cell-cell interaction ระหว่าง LESCs กับ stem cell niche เช่น ผ่านทาง reported คือ CXCR4/SDF-1, N-cadherin หรือการสัญญาณผ่านทาง paracrine factor ทั้งนี้เพื่อรักษาภาวะสมดุลในการเกิด self-renewal และ cell fate (Dziasko and Daniels., 2016) LESCs พบเรียงตัวในชั้น basal cells บริเวณ limbus ซึ่งเป็น limbal stem cell niche โดยมีเซลล์ที่เรียกว่า keratocytes ซึ่งเรียงตัวอยู่ในบริเวณดังกล่าว ทำหน้าที่ในการ support ให้กับ LESCs (Hashmani et al., 2013) จากการศึกษาค้นพบว่า keratocytes มีการแสดงออกของ growth factors หลายชนิดเช่นที่ช่วยในการรักษาภาวะสมดุลให้กับ LESCs เช่น EGF, FGF2, EPR, HGF, KGF, NGF, GDNF, BDNF, N-cadherin และ importin 13 (Li et al., 2014)

การที่ LESCs สามารถคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดได้ทั้งในสภาวะปกติและสภาวะบาดเจ็บได้นั้น จำเป็นต้องอาศัยบทบาท niche ของ LESCs เพื่อควบคุมความสมดุลให้กับ LESCs ซึ่งความสมดุลดังกล่าวมีความสำคัญเป็นอย่างมาก ในสภาวะที่ผิวกระจกตาได้รับบาดเจ็บหรือเกิดการเสียหาย จำเป็นต้องสร้างเซลล์ผิวกระจกตาใหม่เพื่อทดแทนเซลล์เก่าที่อาจตายจากสภาวะบาดเจ็บ โดย niche ถูกกระตุ้นทำให้สมดุลภายใน niche เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสัญญาณหรือกลไกในการรักษาสมดุลภายใน niche นั้นยังมีข้อมูลจำกัด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากระบวนการ wound healing ใน LESCs จะมีการหลั่งโปรตีนมากมาย ในการวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษา TGF- $\beta$ 1 ซึ่งมีงานวิจัยหลายงานแสดงให้เห็นว่า TGF- $\beta$ 1 มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับ stem cells ในภาวะ homeostasis (Kawakit et al., 2013) และยังมีข้อมูลว่า TGF- $\beta$ 1 มีความสำคัญต่อกระบวนการ wound healing ของกระจกตา แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่า TGF- $\beta$  ส่งผลอย่างไรหรือส่งสัญญาณผ่านกลไกใดในการคงคุณสมบัติเซลล์ต้นกำเนิดของ LESCs

## วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ TGF- $\beta$ 1 ที่มีต่อเซลล์ภายในสภาพแวดล้อมจุลภาค (niche) ของ Limbal epithelium stem cells

## วิธีการวิจัย

### 1. การเตรียมเซลล์ที่เลี้ยง (Feeder cells)

เลี้ยงเซลล์ 3t3 (mouse embryo fibroblast cell line) จนโตเต็มภาชนะ T75 หยุดการเจริญเติบโต โดยการใส่ mytomycin C ความเข้มข้น 10 µg/ml นำบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบเวลาทำการย่อยด้วยเอนไซม์ 0.25% Trypsin/EDTA เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM-High glucose, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ประมาณ 1 ml ทำการนับจำนวนเซลล์ให้ได้จำนวน  $1 \times 10^6$  cells ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm เขย่าให้เซลล์กระจายให้ทั่ว นำเซลล์ไปบ่มและเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 °C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะก่อนนำมาใช้เป็นเซลล์ที่เลี้ยง

### 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 หยุดปฏิกิริยาด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดกระจกตา (DMEM/F12 medium, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 2.5 µg/ml NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 µg/ml hydrocortizone, 5 mg/ml human insulin, 20 ng/ml EGF, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin) นำเซลล์ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่ 1200 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 1 ml นำเซลล์ทั้งหมดเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ที่เลี้ยงที่เตรียมไว้แล้ว นำไปเลี้ยงที่สภาวะอุณหภูมิ 37 °C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ทำการเพาะเลี้ยงต่อระยะเวลาประมาณ 10-14 วัน จะได้เซลล์ปฐมภูมิเพื่อใช้ในการในศึกษาต่อไป โดย limbal ring ที่นำมาใช้ในการศึกษาได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน IRB No.302/58

### 3. การแยก และเลี้ยง Keratocyte

นำ limbal ring มาตัดส่วนบริเวณส่วนเนื้อเยื่อตาขาวออก จะเหลือบริเวณที่เรียกว่า Limbus ซึ่งอยู่ระหว่างตาขาวและตาดำ นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ Dispase II ความเข้มข้น 1.2 U/ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาดังด้วย 1x PBS 2 รอบ จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาวางบนจานเพาะเลี้ยงที่เคลือบด้วย 10 µg/ml laminin ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM/F12 medium, 10% (v/v) Fetal bovine serum, 2.5 µg/ml NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 µg/ml hydrocortizone, 1% L-glutamine, 1% Penicillin-Streptomycin) พอท่วมชิ้นเนื้อ จากนั้นรอให้เซลล์ที่มีลักษณะ fibroblast เจริญออกจากชิ้นเนื้อ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 2 วัน จนเซลล์เจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงนำเซลล์ที่ได้ไปใช้ในการในศึกษาต่อไป

### 4. การสกัด RNA การสร้าง cDNA

สกัด RNA ของเซลล์ LESC's ที่เจริญอยู่ในภาชนะเพาะเลี้ยง 6 well plate โดยเริ่มจากการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งเดิม 1 ml Trizol ลงในแต่ละ well ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายใส่ tube ขนาด 1.5 ml เดิม 100 µl bromochloropropane (BCP) ผสมให้เข้ากันโดยการ invert tube จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ครบเวลาย่นำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 12000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเก็บส่วนใสด้านบนประมาณ 400 µl ใส่ RNase-free microcentrifuge tubes เดิม 500 µl isopropanol เก็บที่ -20 °C ซ้ำมคืนเพื่อตกตะกอน RNA จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 12000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเดิม 1 ml 75% ethanol นำไปปั่นที่ความเร็ว 7500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที (2 ครั้ง) ดูด 75% ethanol ที่ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที ละลายตะกอน RNA ด้วย 50 µl RNA storages จากนั้นนำ RNA ที่ได้มา

สร้างเป็น cDNA โดยเริ่มจากการคำนวณความเข้มข้น RNA ให้ได้ 1 µg จากนั้นเติม 1 µl oligo dT และเติม nuclease-free water ให้มีปริมาตรรวม 12 µl จากนั้นนำไปทำการ Heat ที่ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที ครบเวลานำมาเติม 4 µl Buffer RT, 2 µl dNTP 10 mM, 0.5 µl ribolock และ 0.5 µl dH<sub>2</sub>O ลงในแต่ละ tube นำ tube ไป Heat ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที ครบเวลาเติม 1 ul reverse transcriptase (RevertAid H Minus M-MuLV) นำ tube ใส่เครื่อง thermal cycle เพื่อสร้างสาย cDNA ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ 70 °C เป็นเวลา 10 นาที

#### 5. การทำ real time PCR

นำ 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 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	0:20 นาที	
72.0 °C	0:40 นาที	

ตารางที่ 1 แสดงโปรแกรมที่ใช้สำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีน

ยีน	ลำดับ sequences	ขนาด fragment (bp)
<i>GREMLIN</i>	F5'-ATC AAC CGC TTC TGT TAC GG-3'	197
	R5'-ATG CAA CGA CAC TGC TTC AC-3'	
<i>VEGF</i>	F5'-ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG-3'	444
	R5'-TCA CCG CCT CGG CTT GTC ACA-3'	
<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>GAPHD</i>	F5'- CTT GTT CCA GGC CTG ATG TT -3'	603
	R5'- ACG AGA CTC CTT CTC TGT GG -3'	

*VEGF*, vascular endothelial growth factor; *E-cad*, E-cadherin; *N-cad*, N-cadherin; *FN*, fibronectin; *Vim*, vimentin; *GAPHD*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

## 6. การวิเคราะห์ cytokine โดย Bio-Plex Assays

วิเคราะห์ cytokine ที่หลั่งจาก keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 50 ng/ml นานเป็นเวลา 3 วัน โดยใช้ Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 21-plex Assay (Bio-rad) โดยเริ่มจากการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์นำไปปั่นที่ 1000 × g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4° C จากนั้นเก็บส่วนใสสำหรับเป็น sample เตรียม สาร standard โดยการทำ serial dilution จากนั้นทำการ prewet filter plate ด้วย 100  $\mu$ l bio-plex assay buffer เติม 1x beads ปริมาตร 50  $\mu$ l โดยเป็น magnetic beads ลงในแต่ละ well จากนั้นล้างด้วย 100  $\mu$ l wash buffer จำนวน 2 ครั้ง เติม samples, standards, blank ปริมาตร 50  $\mu$ l ลงใน well ที่มี 1x beads ปิด plate ให้สนิทนำไปเขย่าที่ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ครบเวลานำมาล้างด้วย 100  $\mu$ l wash buffer จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติม 25  $\mu$ l antibody ลงในแต่ละ well นำไปเขย่าที่ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลานำมาล้างด้วย 100  $\mu$ l wash buffer จำนวน 3 ครั้ง เติม 50  $\mu$ l SA-PE ลงในแต่ละ well นำไปเขย่าที่ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วย 100  $\mu$ l wash buffer จำนวน 3 ครั้ง ทำการละลาย beads ด้วย 125  $\mu$ l assay buffer นำไปเขย่าที่ 850 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นจึงนำ plate ไปวิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Bio-Plex® MAGPIX™

## 7. การทำ colony-forming assay

### 7.1 colony-forming assay ของ LSCs ที่เจริญบนเซลล์ keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1

นับจำนวนเซลล์ keratocytes ให้ได้  $5 \times 10^6$  cells ทำการเพาะเลี้ยงใน T75 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาใส่ TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml, 50 ng/ml นานเป็นเวลา 3 วัน ครบเวลาเทอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ล้างด้วย 1x PBS เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้น treat ด้วย mytomyacin C ความเข้มข้น 10  $\mu$ g/ml นำบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเตรียมนำมาทำเป็น feeder cells โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ 0.25% Trypsin/EDTA เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ประมาณ 1 ml นับจำนวนประมาณ  $5 \times 10^5$  cells/well เลี้ยงใน 6 well plate จำนวนทั้งหมด 6 well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ จากนั้นจึงค่อยนำ LSCs จำนวน 500 cells ลงไปเลี้ยง เป็นเวลา 10-14 วัน เพื่อทำการนับจำนวนโคโลนี

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

### 7.2 colony-forming assay ของ LSCs เมื่อสัมผัสกับ TGF- $\beta$ 1 โดยตรง

เตรียมเซลล์ 3T3 สำหรับเป็นเซลล์ที่เลี้ยงตั้งแสดงในข้อ 1 นับจำนวนเซลล์ให้ได้  $6 \times 10^5$  cells/well เลี้ยงใน 6 well plate จำนวนทั้งหมด 6 well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกาะ จากนั้นจึงค่อยนำ LSCs จำนวน 3000 cells ลงไปเลี้ยง ทำการใส่ TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลองคือ 1. control ไม่ใส่ TGF- $\beta$ 1 2. TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นล้างด้วย 1x PBS เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 3. TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นล้างด้วย 1x PBS เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ โดยทั้ง 3 ชุดการทดลองทำเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนี

## 8. การย้อม immunofluorescence

ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง จากนั้นล้างเซลล์ด้วย 1x PBS (3รอบ) เมื่อล้างเซลล์เสร็จแล้วจึงทำการ fixed เซลล์ด้วย 300  $\mu$ l 4% formaldehyde ลงใน well และบ่ม 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วย 1x PBS 3 ครั้ง จากนั้นเป็นขั้นตอน permeabilization ด้วย 300  $\mu$ l 0.3% triton X-100 ใน 1x PBS ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 45 นาที



จากนั้นเติม 300  $\mu$ l blocking buffer (1x PBS+5% normal goat serum +0.3% triton x-100) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที ครบเวลาเติม primary antibody Vimentin (1:100) (Cell Signaling Technology) นำไปบ่มที่ 4 °C ซ้ำมคืน นำ secondary antibody rabbit IgG (1:500) ละลายใน antibody dilution buffer ประมาณ 250-300  $\mu$ l และเติมลงใน well บ่มอุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ DAPI (1:1000) ปริมาณ 500  $\mu$ l เติมลงในwell และบ่มเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย 1x PBS 2 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้อง Fluorescence microscope

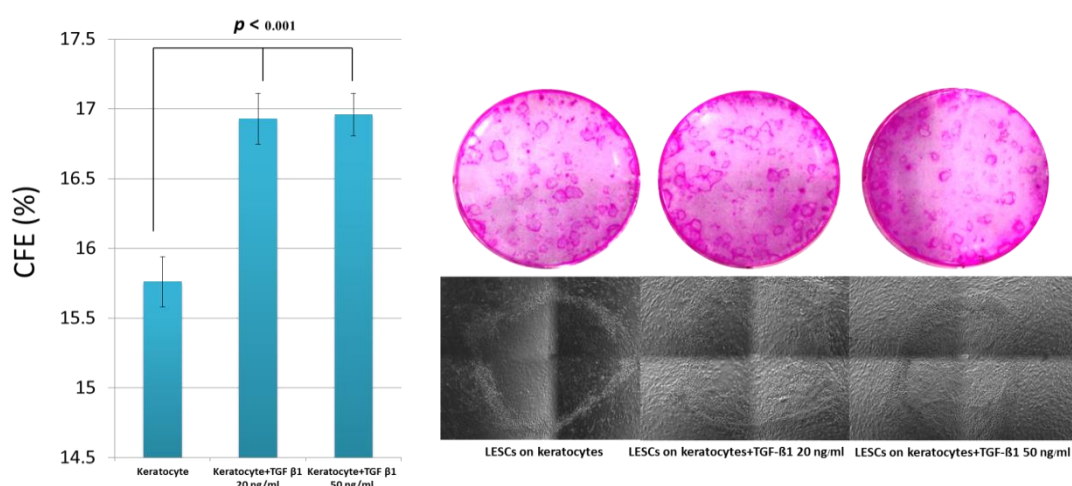
### 9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์การแจกแจงแบบ Student's t โดยโปรแกรม SPSS โดยค่า  $p$  value <0.001

### ผลการวิจัย

#### 1. การเพิ่มขึ้นของ Clonogenic potential ใน Limbal epithelium stem cells เมื่อเพาะเลี้ยงบน keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1

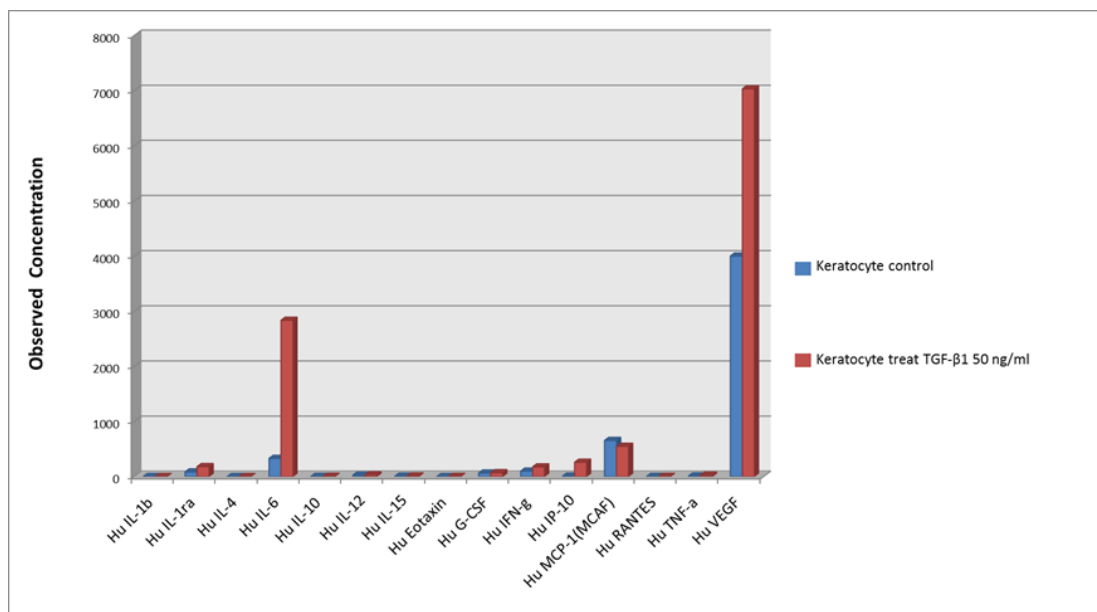
เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการ activated keratocytes ต่อ limbal epithelial stem cells ในสภาวะที่มีการบาดเจ็บ ทางผู้วิจัยได้ทำการกระตุ้น keratocytes ด้วย TGF- $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml และ 50 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน และนำ keratocytes ที่ผ่านการกระตุ้น ไปใช้ในการเพาะเลี้ยง LESC's เปรียบเทียบกับ keratocytes ที่ไม่ผ่านการกระตุ้น พบว่า LESC's ที่ทำการเพาะเลี้ยงบน keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-  $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml และ 50 ng/ml จะมี % colony forming efficiency เท่ากับ 16.93% และ 16.97% ตามลำดับ ซึ่งจะมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยง LESC's บน keratocytes ที่ไม่ผ่านการกระตุ้น (% colony forming efficiency เท่ากับ 15.67% อย่างมีนัยสำคัญ ( $p$  value < 0.001) ) โดยจะเห็นว่ากรณีที่ keratocytes ถูกกระตุ้นด้วย TGF-  $\beta$ 1 ที่ความเข้มข้นที่ต่างกันนั้นไม่ส่งผลต่อ % colony forming efficiency ของ LESC's จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-  $\beta$ 1 สามารถสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของ LESC's ทำให้มี colony formation efficiency เพิ่มขึ้นได้ แสดงดังภาพที่ 1



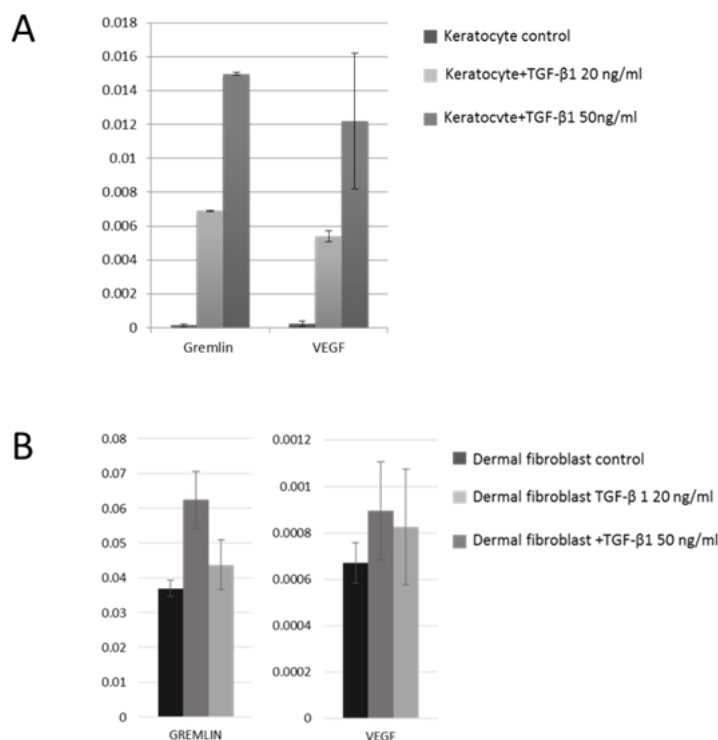
ภาพที่ 1 แสดงผล %CFE ของ LESC's ที่เลี้ยงบน keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF- $\beta$ 1 ความเข้มข้น 20 ng/ml และ 50 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน

## 2. Inflammatory cytokine หลังมากขึ้นหลังจากที่ keratocytes ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1

เพื่อทำการศึกษาดังกล่าวที่เกี่ยวข้องของ keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ในการสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของ LSCs ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาก่อน cytokine จำนวน 15 ชนิด โดยเลือกจาก keratocytes ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ความเข้มข้น 50 ng/ml สืบเนื่องจากผลการทดลอง Clonogenic potential ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่ต่างกันนั้นไม่ส่งผลต่อ % colony forming efficiency ของ LSCs และข้อจำกัดของเทคโนโลยีที่ใช้ในการตรวจสอบ โดยใช้ Bio-Plex Assays พบว่า keratocytes ในสภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 จะมีการหลั่ง IL-6 และ VEGF ในระดับที่สูงกว่า keratocytes ปกติคือ 8.59 เท่า และ 1.758 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า VEGF มีบทบาทที่สำคัญในการเป็น pro-angiogenic factor (Mukwaya et al., 2016) ที่มีการหลั่งออกมาในสภาวะที่กระจกตาได้รับบาดเจ็บ ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาถึงผลของ TGF-β1 ต่อการแสดงออกของยีนที่มีการเกี่ยวข้องกับการเกิด angiogenesis คือ VEGF และ GREMLIN ใน keratocytes ด้วยเทคนิค real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) จากการศึกษาพบว่าเมื่อทำการกระตุ้น keratocytes ด้วย TGF-β1 ที่ความเข้มข้น 20 ng/ml จะกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีน VEGF และ GREMLIN มากขึ้น 22 เท่า และ 45.9 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ keratocytes ที่ไม่ถูกกระตุ้น และจะมีการแสดงออกมากขึ้นเป็น 50 เท่า และ 99 เท่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น TGF-β1 เป็น 50 ng/ml ดังแสดงในภาพที่ 3 ซึ่งการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน VEGF และ GREMLIN โดย TGF-β1 จะมีความจำเพาะใน keratocytes เท่านั้นเนื่องจากไม่พบการแสดงออกที่มากขึ้นของยีนทั้ง 2 ชนิดใน dermal fibroblast ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TGF-β1 สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกที่มากขึ้นของยีน VEGF และ GREMLIN ได้อย่างจำเพาะใน keratocytes ซึ่งอาจจะมีความเกี่ยวข้องในการสนับสนุนการเพิ่มจำนวนของ LSCs



ภาพที่ 2 แสดงผลปริมาณ cytokine ที่หลั่งจาก keratocytes เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ความเข้มข้น 50 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน ตรวจสอบโดย Bio-Plex Assays



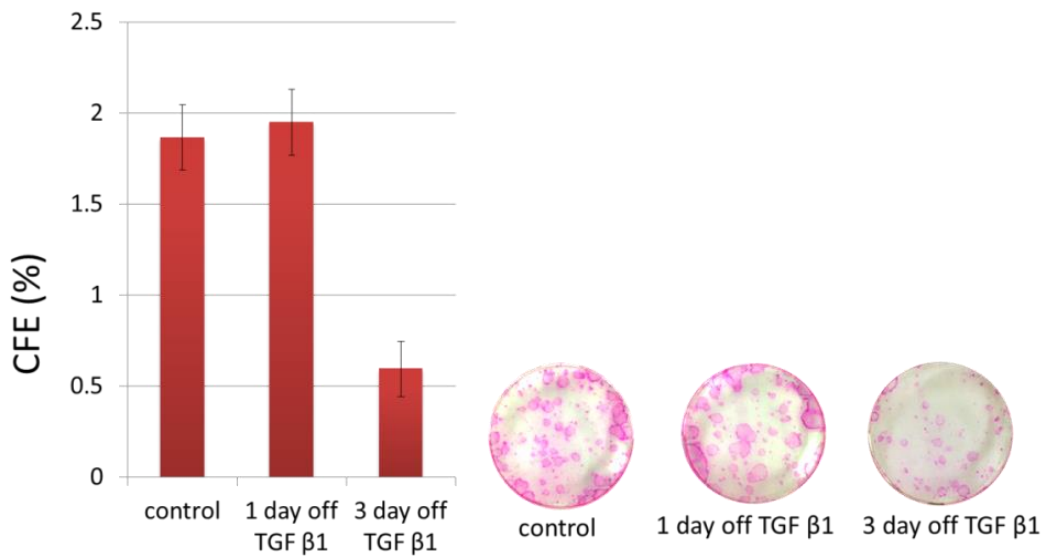
ภาพที่ 3 แสดงผล RT-PCR ในการแสดงออกของยีน *VEGF* และ *GREMLIN* ในเซลล์ keratocytes และ dermal fibroblast เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ความเข้มข้น 20 ng/ml และ 50 ng/ml เป็นเวลา 3 วัน

### 3. ผลกระทบของ TGF-β1 ที่มีต่อ Limbal epithelial stem cell (LESCs) โดยตรง

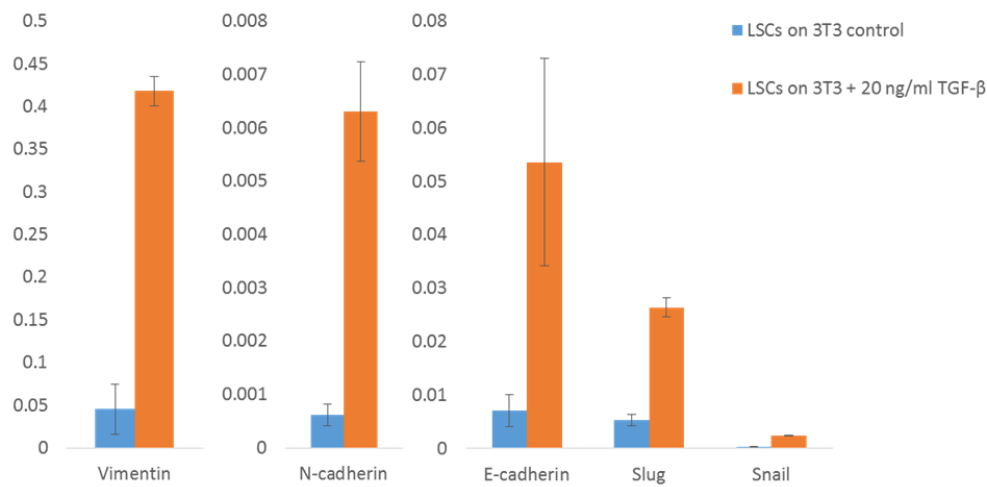
เพื่อทำการศึกษาผลของ TGF-β1 ต่อคุณสมบัติของ LESCs ทางผู้วิจัยเลือกความเข้มข้นของ TGF-β1 ที่ low dose เพื่อดูผลของ TGF-β1 ความเข้มข้น 20 ng/ml กระตุ้น LESCs ด้วยที่ในระยะเวลาที่ต่างกันคือ 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง จากนั้นนำ LESCs ที่ได้มาทดสอบความสามารถในการเกิด colony forming efficiency จากผลการทดลองพบว่า LESCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจะมีความสามารถในการเกิด colony forming ลดลง 3.1 เท่า เมื่อเทียบกับ LESCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 24 ชั่วโมง และ LESCs ปกติ แสดงภาพที่ 4

TGF-β1 เป็น inflammatory cytokine ที่สำคัญที่จะมีการหลั่งออกมาเมื่อเซลล์มีการบาดเจ็บเกิดขึ้น และยังมีบทบาทสำคัญในการเกิด EMT ของ epithelial cell อีกด้วย เพื่อทำการศึกษาว่าการลดลงของจำนวน colony forming efficiency ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเป็นผลจากการเกิด EMT หรือไม่ ทางผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของ EMT markers ที่สำคัญ 4 ชนิดคือยีน *N-cadherin*, *VIMENTIN*, *SLUG* และ *SNAIL* ใน LESCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 เทียบกับ LESCs ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยเทคนิค PCR พบว่าใน LESCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจะมีการแสดงออกของยีน *N-cadherin*, *VIMENTIN*, *SLUG* และ *SNAIL* มากขึ้น 10.3 เท่า, 9.28 เท่า, 4.95 เท่า และ 7.66 เท่า ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 5 และเมื่อทำการศึกษาลักษณะของ LESCs colony เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ด้วย Time lapse analysis พบว่า epithelial cells ใน LESCs colony จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย fibroblast และมีการแสดงออกของ vimentin จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้น LESCs ด้วย TGF-β1 ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมงจะลดความสามารถในการเกิด colony forming ของ LESCs โดยกระตุ้นให้เกิด EMT ทำให้ LESCs สูญเสียคุณสมบัติไป แสดงดังภาพที่ 6

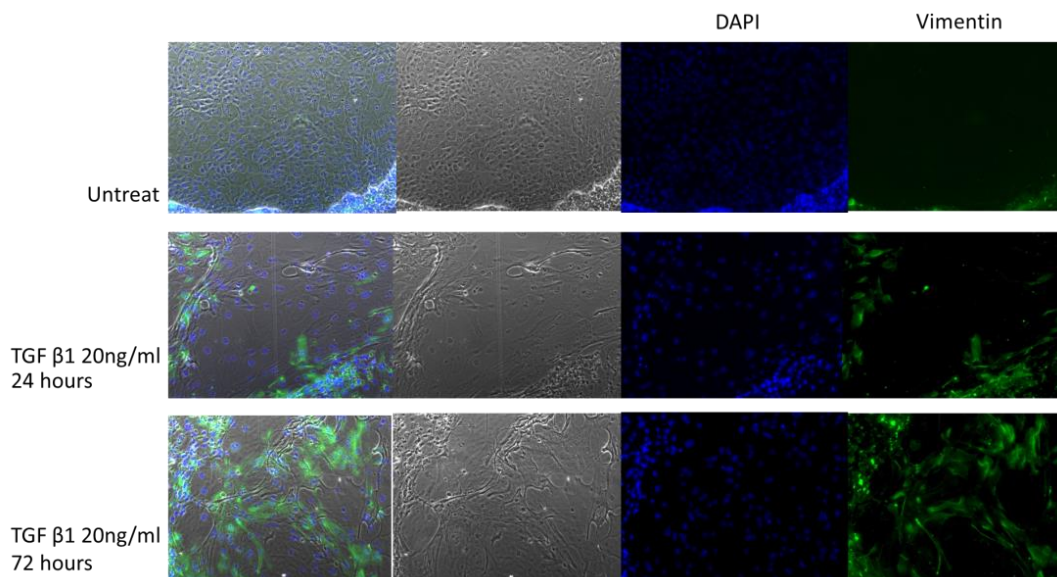




ภาพที่ 4 แสดง %CFE และ โคลินี่ที่เชื่อมด้วย Rhodamine ของ LSCs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 1 วัน และ 3 วัน



ภาพที่ 5 แสดงผล RT-PCR ของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด EMT เปรียบเทียบระหว่าง LSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ความเข้มข้น 20 ng/ml และ LSCs ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ LSCs เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 ความเข้มข้น 20 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง

#### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าเซลล์ที่อยู่ในชั้น stroma หรือ keratocytes เมื่อถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 (stroma activation) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ LSCs ส่งผลทำให้ LSCs บางส่วนซึ่งอยู่ในภาวะ quiescent state เข้าสู่ภาวะ active state แบ่งตัวเพิ่มจำนวน ซึ่งเห็นได้จากการเพิ่ม Colony forming efficiency ในขณะที่ขนาดเฉลี่ยของ colony ไม่เปลี่ยนแปลงชัดเจนแสดงว่าไม่ใช่เพียงการเพิ่ม cell proliferation rate สัญญาณจาก activated keratocytes ที่ทำให้ผลดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยในอดีตแสดงว่า activated keratocytes จากภาวะ inflammation หลั่งสารเช่น FGF HGF ซึ่งเพิ่ม cell proliferation แต่ cytokine ที่กล่าวมาไม่สามารถเพิ่ม CFE ได้ (Anna et al., 2013, Li et al., 2014; Etheredge et al., 2009; Imanishi et al., 2000; Gallego et al., 2016) จากการศึกษาคณะผู้วิจัยได้พบว่าเมื่อ keratocytes ถูกกระตุ้นด้วย TGF-β1 จะหลั่ง cytokine ที่สำคัญเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ ได้แก่ IL-6 และ VEGF แต่ในส่วนของการตรวจสอบการหลั่ง Gremlin นั้นจำเป็นต้องหาชุดตรวจสอบที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการหลั่ง แต่จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนพบว่ายีน *GREMLIN* และ *VEGF* และมีการแสดงออกอย่างจำเพาะแตกต่างจาก skin stromal cells องค์กรก็ตีจากการทดลองนี้ยังไม่เพียงพอที่จะสรุปว่า IL-6, VEGF และ Gremlin เป็นสาเหตุของการกระตุ้น LSCs กลับเข้า cell cycle จำเป็นต้องศึกษาผลเพิ่มเติมของผลของสารแต่ละตัวต่อ LSCs โดยตรงต่อไป ในทางตรงข้ามกับปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในทางคลินิกคือในภาวะที่มีการบาดเจ็บสูญเสีย LSCs เกิดภาวะที่หลอดเลือดถูกกลืนเข้าบริเวณกระจกตาทำให้ขุ่นและบอด และยังเป็นสาเหตุหนึ่งของ transplant rejection (Mukwaya et al., 2016) การค้นพบว่า TGF-β1 เพิ่มระดับ proangiogenic cytokine VEGF และ Gremlin (ซึ่งเพิ่งถูกค้นพบว่าสามารถทำหน้าที่เป็น ligand กระตุ้น VEGFR-2) (Mitola et al., 2016) อาจนำไปสู่เป้าหมายใหม่ของเราที่จะนำมาใช้ในภาวะดังกล่าว

ในขณะที่ TGF-  $\beta$ 1 กระตุ้น keratocytes ให้สนับสนุนการแบ่งตัวของ LESC's การศึกษาผลของ TGF- $\beta$ 1 ต่อ LESC's โดยตรงนั้นพบว่าเมื่อ LESC's สัมผัสกับ TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลานานพบว่าการเกิดโคโลนีลดลง ในขณะที่การ แสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ EMT marker เพิ่มขึ้นเช่นยีน *VIMENTIN*, *SLUG* และ *SNAIL* สอดคล้องกับรายงานของ Kawakita และคณะในปี 2013 ซึ่งทำการศึกษา corneal/limbal epithelial cells หนู แสดงว่าในภาวะที่ LESC's สัมผัสกับ TGF- $\beta$ 1 เป็นเวลานาน ทำให้เกิดการเสีย stemness เกิด senescence หรือเปลี่ยนเป็น mesenchymal cells แทนที่จะเป็น corneal epithelium ดังนั้นงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า TGF-  $\beta$  signaling มีผลสำคัญต่อการควบคุมความสมดุลระหว่าง epithelial repair และ stem cell maintenance การปรับ TGF-  $\beta$  signaling ให้เหมาะสมอาจนำไปสู่วิธีการรักษาโรคผิวหนังกระจกตาชนิดใหม่ที่ได้ผลเพิ่มขึ้นได้

### กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.พญ.วิลาวัลย์ พวงศรีเจริญ หัวหน้าภาควิชาจักษุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้อนุมัติให้ทำการเก็บส่วน corneal scleral rim (Limbal ring) ที่เหลือไม่ใช้แล้วของดวงตา ผู้บริจาคที่เสียชีวิตได้นำมาใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.นพ.นิพัทธ์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ขอขอบคุณ ดร.แพรวพรรณ อิงรุ่งเรืองเลิศ ผู้ดูแลและช่วยเหลือทุกอย่างตลอดเวลาที่ผ่านมา ขอขอบคุณ สมาชิกห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิดและเซลล์บำบัดทุกท่าน ตลอดจน ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด และเซลล์บำบัด คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### เอกสารอ้างอิง

- Anna M. R, Letteria De Grazia, Maria V, Maurizio M, Diana T, Mario V, Isabella V. Contact lens wearing and chronic cigarette smoking positively correlate with TGF-1 and VEGF tear levels and impaired cornea wound healing after photorefractive keratectomy. *Current Eye Research*. 2001; 38(3): 335–341.
- Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *NATURE*. 2004; 432: 332-336.
- Dziasko MA and Daniels JT. Anatomical features and cell-cell interactions in the human limbal epithelial stem cell niche. *Ocul Surf*. 2016; 14(3): 322-30.
- Etheredge, L., Kane, B.P., Hassell, J.R. The effect of growth factor signaling on keratocytes in vitro and its relationship to the phases of stromal wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* .2009; 50: 3128-3136.
- Gallego-Muñoz , Ibares-Frías L, Garrote JA, Valsero-Blanco MC, Cantalapiedra-Rodríguez R, Merayo-Llodos J, Martínez-García MC. Human corneal fibroblast migration and ECM synthesis during stromal repair: Role played by PDGF-BB, bFGF, and TGF $\beta$ 1. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016; 2360.
- Hashmani K, Branch MJ, Sidney LE, Dhillon PS, Verma M, McIntosh OD, Hopkinson A, Dua HS. Characterization of corneal stromal stem cells with the potential for epithelial transdifferentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2013; 4(3): 75.
- Imanishi, J., Kamiyama, K., Iguchi, I., Kita, M., Sotozono, C., Kinoshita, S., 2000. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res*. 2000; 19: 113-129.

- Jones PH, Simons BD, Watt FW. Sic transit gloria: farewell to the epidermal transit amplifying cell. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(4): 371-81.
- Kawakita T, Espana EM, Higa K, Kato N, Li W, Tseng SC. Activation of Smad-mediated TGF- $\beta$  signaling triggers epithelial-mesenchymal transitions in murine cloned corneal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2013; 228(1): 225-34.
- Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, Okubo K. Characteristics of the human ocular surface epithelium. *Prog Retin Eye Res*. 2001; 20(5): 639-73.
- Li Y, Inoue T, Takamatsu F, Kobayashi T, Shiraishi A, Maeda N, Ohashi Y, Nishida K. Differences between niche cells and limbal stromal cells in maintenance of corneal limbal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55(3): 1453-62.
- Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, Ballmer-Hofer K, Zammataro L, Presta M. Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood*. 2010; 116(18): 3677-80.
- Mukwaya A, Peebo B, Xeroudaki M, Ali Z, Lennikov A, Jensen L, Lagali N. Factors regulating capillary remodeling in a reversible model of inflammatory corneal angiogenesis. *Sci Rep*. 2016; 6: 32137.
- Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, De Luca M. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol*. 1999; 145(4): 769-82.
- Sneddon JB, Zhen HH, Montgomery K, van de Rijn M, Tward AD, West R, Gladstone H, Chang HY, Morganroth GS, Oro AE, Brown PO. 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*. 2006; 103(40): 14842-7.
- Tseng SC, He H, Zhang S, Chen SY. Niche Regulation of limbal epithelial stem cells: relationship between inflammation and regeneration. *Ocul Surf*. 2016; 14(2): 100-12.