



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “บทบาทของ transcription factor Id1 ในระบบภูมิคุ้มกัน
ของผู้ป่วยโรคสะกัดเงิน”

โดย ดร.ชาลินี รอนไพริน และคณะ

กรกฎาคม พ.ศ. 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “บทบาทของ transcription factor Id1 ในระบบภูมิคุ้มกัน ของผู้ป่วยโรคสะกดเงิน”

คณะผู้วิจัย

- | | |
|--|-------------------|
| 1. ดร. ชาลินี รอนไพริน* | หัวหน้าโครงการ |
| 2. ผศ. ดร. เทวิน เทนคำเนาว์** | ผู้ร่วมวิจัย |
| 3. ผศ. พญ. ดร. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร *** | ผู้ร่วมวิจัย |
| 4. รศ. พญ. มะลิ อจริยะกุล**** | ผู้ร่วมวิจัย |
| 5. ศ.เกียรติคุณ ดร. วันเพ็ญ ชัยคำภา***** | นักวิจัยที่ปรึกษา |

สังกัด

*สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

****สาขาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*****ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

รหัสโครงการ : MRG4880147

ชื่อโครงการ : บทบาทของ transcription factor Id1 ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

ชื่อนักวิจัย : ชาลินี รอนไพริน และคณะ, สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา

สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Email Address: cronpirin@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี

แม้ว่าไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดของโรคสะเก็ดเงิน แต่เชื่อกันว่าเป็นโรคที่สารชีวโมเลกุลในระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะเอนไซม์ และสารเคมีต่างๆ ที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ผิวหนังทำงานบกพร่อง การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ผิดปกติทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ผิวหนังเร็วเกินไป และการอักเสบ เป็นที่ทราบว่า Id1 (Inhibitor of differentiation หรือ inhibitor of DNA binding) ซึ่งเป็น transcription factor มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งพัฒนาการของเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัย ได้วิเคราะห์ระดับ Id1 mRNA ใน lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเทียบกับใน lymphocytes ของคนปกติ ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อประเมินบทบาทกลไกระดับโมเลกุลของ Id1 ในโรคสะเก็ดเงิน พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยระดับของ normalized Id1 mRNA ใน lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินสูงกว่าในคนปกติประมาณ 2 เท่า เมื่อทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยชนิดอาศัยเซลล์แบบไม่จำเพาะโดยวิธี phytohemagglutinin (PHA) stimulation test ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่า stimulation indices (SI) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกับกลุ่มคนปกติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า SI และการกำเริบของโรค ซึ่งประเมินจากระดับความรุนแรงของโรค (Psoriasis Area and Severity Index, PASI) ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่เข้าร่วมโครงการมีระดับความรุนแรงน้อยถึงปานกลาง อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัย พบองค์ความรู้ใหม่ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Id1 และโรคสะเก็ดเงิน และควรมีการศึกษาเชิงลึกในระดับโมเลกุลต่อไป

คำหลัก : Id1, โรคสะเก็ดเงิน, การแสดงออกของยีน, ลิมโฟไซต์

Project Code : MRG4780018

Project Title : Role of transcription factor Id1 in the immune system of psoriatic patients

Investigators : Chalinee Ronpirin *et al.*, Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University

Email Address : cronpirin@yahoo.com

Project Period : 2 years

Although the precise causes of psoriasis are unclear, it is generally believed that psoriasis is a disorder in which factors in the immune system, enzymes, and other biochemical substances that regulate skin cell division become impaired. This abnormal immune response causes rapid proliferation of keratinocytes and inflammation. The helix-loop-helix transcription factor Id1 (inhibitor of differentiation/inhibitor of DNA binding) functions as an inhibitor of differentiation. In this study, the Id1 mRNA expression in human peripheral blood lymphocytes of psoriatic patients and healthy controls was determined using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique if Id1 might be involved in the molecular mechanisms leading to psoriasis. The normalized Id1 expressed transcripts in psoriatic patients were about 2-fold significantly higher ($P < 0.05$) than those in healthy controls. Stimulation indices (SI) based on PHA stimulation assay were not significantly different between patients and controls ($P > 0.05$). In patients, there was no correlation between SI and disease activity as reflected by the Psoriasis Area and Severity Index (PASI). This might be due to patients with mild to moderate psoriasis were principally included in our study. However, our finding suggested the association between Id1 and psoriasis, and further studies should be carried out to elucidate the molecular role of Id1 in psoriasis.

Keywords : Id1, psoriasis, gene expression, lymphocyte

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
สารบัญ	iii
รายการตารางประกอบ	iv
รายการภาพประกอบ	v
บทสรุปผู้บริหาร	vi
บทนำ	1
วิธีวิจัย	4
การวิเคราะห์ทางสถิติ	7
ผลการวิจัย	8
สรุปและอภิปรายผล	14
ข้อเสนอแนะ	16
เอกสารอ้างอิง	17
Output ที่ได้จากโครงการ	19

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลผู้ป่วย (patient characteristics) ค่า stimulation index (SI) ซึ่งวิเคราะห์จาก PHA stimulation test และค่า PASI score	12

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงระดับ mRNA ของ Id1 และ GAPDH ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก total RNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับคนปกติ	8
รูปที่ 2 Box plot แสดงระดับ mRNA ของ Id1 ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก total RNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเปรียบเทียบกับคนปกติ	9
รูปที่ 3 Box plot เพื่อแสดงอัตราการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของ lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเปรียบเทียบกับคนปกติ	10
รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า stimulation index (SI) กับค่า psoriasis area and severity index (PASI) ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน	13

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) บทบาทของ transcription factor Id1 ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน
(ภาษาอังกฤษ) Role of transcription factor Id1 in the immune system of psoriatic patients

คณะนักวิจัย

1. ดร. ชาลินี รอนไพริน (หัวหน้าโครงการ)
สาขาจุลชีววิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยา สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)
2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนา
โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัลเทคโนโลยี ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พญ. ดร. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร
หน่วยภูมิคุ้มกัน ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. รองศาสตราจารย์ พญ. มะลิ อัจริยะกุล
ภาควิชาอายุรศาสตร์ สถานวิทยาศาสตร์คลินิก
คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)
5. ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.วันเพ็ญ ชัยคำภา (นักวิจัยที่ปรึกษา)
ภาควิชาปรสิตวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย

วิทยาศาสตร์การแพทย์ เน้นอณูชีววิทยา

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังเรื้อรังที่เกิดจากเซลล์ผิวหนังแบ่งตัวเร็วกว่าปกติ ทำให้ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) หนาขึ้น เกิดเป็นลักษณะผื่นนูนแดงปกคลุมด้วยสะเก็ดสีเงิน นอกจากผื่นที่ผิวหนัง ศีรษะ เข่า ศอก หรือเป็นทั่วตัว ผู้ป่วยส่วนมากมีความผิดปกติของเล็บร่วมด้วย (Tham และคณะ, 1988) และประมาณร้อยละ 5-42 ของผู้ป่วยมีอาการข้ออักเสบ (arthritis) (Biondi และคณะ, 1989) ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีการรักษาโรคนี้ให้หายขาดได้ โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 0.5-4 ของประชากรทั่วโลก (Christopher, 2001) ในปัจจุบัน มีรายงานว่า ประมาณ 125 ล้านคนของประชากรโลกป่วยเป็นโรคสะเก็ดเงิน และนับว่าเป็นโรคผิวหนังที่ชาวโลกควรตระหนักถึงความสำคัญ เพื่อให้สังคมโลกมีความตื่นตัวต่อโรคนี้ จึงมีการกำหนดให้วันที่ 29 ตุลาคม ของทุกปี เป็นวันสะเก็ดเงินโลก (world psoriasis day) โดยปี 2547 เป็นปีแรกที่มีการจัดงานวันสะเก็ดเงินโลก สำหรับประเทศไทย โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังที่พบบ่อย โดยคาดว่าจะมีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินในประเทศไทย จำนวนไม่ต่ำกว่า 1 ล้านคน (<http://www.wrongdiagnosis.com/p/psoriasis/stats-country.htm>)

ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินส่วนมากมีอายุในช่วง 10-30 ปี จำนวนที่พบในชายและหญิงเป็นอัตราใกล้เคียงกัน (Brandrup และ Green, 1981; Barker, 1991) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคทางระบบภูมิคุ้มกันชนิด T-cell-mediated autoimmune disease (Uyemura และคณะ, 1993) มักจะมีการเกิดโรคสูงขึ้นเมื่อประวัติของบิดาหรือมารดาป่วยเป็นโรคนี้มาก่อน (Capon และคณะ, 2000) นอกจากนี้ มีการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทของหลายยีนบนโครโมโซมต่างๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้ เช่น human leukocyte antigen (HLA), immunoglobulin super family gene cluster, epidermal differentiation complex gene cluster และ IL-10 เป็นต้น (Wongpiyabovorn, 2004) ดังนั้น สาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพันธุกรรม และมีปัจจัยอื่นๆ จากสิ่งแวดล้อมเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค การดำเนินโรค และความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน อย่างไรก็ตาม กลไกหรือปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อโรคยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน และแม้โรคนี้จะไม่ทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิต แต่จะมีผลต่อสภาพทางจิตใจ สังคมและเศรษฐกิจของผู้ป่วยและผู้ใกล้ชิด

เนื่องจากโรคนี้ มีระดับความรุนแรงแตกต่างกัน การประเมินความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis Area and Severity Index; PASI score) (van de Kerkhof, 1992) มีประโยชน์มากในการเลือกวิธีการรักษา การประเมินความรุนแรงจะอาศัยปริมาณพื้นที่ที่เป็นโรค นอกจากปริมาณพื้นที่แล้วยังดูตำแหน่งที่เป็นด้วย ค่าที่ได้มีตั้งแต่ 0-72 และมาจากการคำนวณตามสมการดังนี้ คือ

$$\text{PASI score} = 0.1(R_h + T_h + S_h)A_h + 0.2(R_u + T_u + S_u)A_u + 0.3(R_l + T_l + S_l)A_l + 0.4(R_i + T_i + S_i)A_i$$

โดยที่ R_h, R_u, R_l, R_i	หมายถึง ความแดง (redness) ของผื่นผิวหนังโรคสะเก็ดเงิน ที่บริเวณศีรษะ (head) ขา (upper extremities) ลำตัว (trunk) และแขน (lower extremities) ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมีตั้งแต่ 0-4
T_h, T_u, T_l, T_i	หมายถึง ความหนา (thickness) ของผื่นผิวหนังโรคสะเก็ดเงิน ที่บริเวณศีรษะ ขา ลำตัว และแขน ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมี ตั้งแต่ 0-4
S_h, S_u, S_l, S_i	หมายถึง สะเก็ดเงิน (scaliness) ที่ปกคลุมบนผื่นผิวหนังโรคสะเก็ดเงิน ที่บริเวณศีรษะ ขา ลำตัว และแขน ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมี ตั้งแต่ 0-4
A_h, A_u, A_l, A_i	หมายถึง ปริมาณพื้นที่ (area) ที่เป็นโรค โดยจะดูที่บริเวณศีรษะ ขา ลำตัว และแขน ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมีตั้งแต่ 0-6

โดยทั่วไปจะแบ่งความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงินออกเป็น 3 ระดับ คือ

ชนิดเป็นน้อย (mild psoriasis) ค่า PASI score จะน้อยกว่า 2 โดยมากพบผื่นเป็นแห่งๆ ที่เข้า
ข้อศอก หลังศีรษะ การรักษาให้ความชุ่มชื้น ยาทา แชมพู

ชนิดเป็นปานกลาง (moderate psoriasis) ค่า PASI score อยู่ระหว่าง 2-10 ผื่นโดยมากจะ
อยู่ที่แขน ขา ลำตัว หลังศีรษะ การรักษาจะใช้ยาทา ให้ phototherapy และยารับประทาน

ชนิดเป็นรุนแรง (severe psoriasis) ค่า PASI score มากกว่า 10 ผื่นส่วนใหญ่จะแดง หรือเป็น
ตุ่มหนอง ทำให้มีการหลุดลอกของผิวหนัง ผู้ป่วยมักจะมีข้ออักเสบร่วมด้วย การรักษาจะให้
phototherapy และยารับประทาน

ถึงแม้มีความเชื่อในอดีตว่า โรคสะเก็ดเงินเกิดขึ้นจากความผิดปกติในการควบคุมการเพิ่ม
จำนวนของเซลล์ผิวหนัง (abnormal keratinocyte proliferation) แต่ปัจจุบัน มีข้อมูลสนับสนุน
และเป็นที่ยอมรับว่าความผิดปกติดังกล่าวไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค แต่เป็นผลมาจาก
การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันมากกว่า (Nickoloff, 1999) โดยพบว่ามีความไม่สมดุลของ
cytokines ที่สร้างมาจาก Th1 cells และ Th2 cells (Th1/Th2 imbalance) นั่นคือ มีการเพิ่ม
ปริมาณของ cytokines ที่สร้างมาจาก Th1 cells เช่น IFN- γ (Szabo และคณะ, 1998) TNF- α
(Ettehadi และคณะ, 1994; Bonifati และคณะ, 1994) IL-2 (Takematsu และคณะ, 1990) และ
cytokines ประเภทอื่นๆ (Wongpiyabovorn, 2004) สำหรับ cytokines ที่สร้างมาจาก Th2 cells
ลดลง ได้แก่ IL-4 (Zalewska และคณะ, 2004) เป็นต้น เนื่องจากลักษณะของโรคนี้พบว่าการ

เปลี่ยนแปลงของระดับ cytokines ไม่เพียงแต่มีผลกระทบต่อผิวหนังบริเวณรอยโรค (local) แต่ลักษณะที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั่วร่างกาย (systemic) (Bonifati และ Ameglio, 1999; Bos และ de Rie, 1999; Kemeny และคณะ, 1994) โดยเม็ดเลือดขาวชนิด T cells เคลื่อนที่เข้ามาในชั้นหนังแท้ (dermis) จนนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพที่ผิวหนัง

เนื่องจากกลไกการเกิดหรือการดำเนินของโรคสะเก็ดเงิน ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คณะนักวิจัยหลายกลุ่มได้ความพยายามศึกษายีนและโมเลกุลต่างๆ ที่มีหลักฐานว่าสัมพันธ์กับโรคนี้ โปรตีนชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจมากในโรคนี้ คือ Id1 (Inhibitor of differentiation/inhibitor of DNA binding) ซึ่งเป็น transcription factor และเป็นที่ทราบว่ามี ความสำคัญในการยับยั้งพัฒนาการของเซลล์ (differentiation) แต่มีบทบาทในการเพิ่มจำนวน เซลล์ (proliferation) และการดำรงอยู่ของเซลล์ (survival) ในเซลล์หลายประเภท เช่น เซลล์มะเร็ง (Wong และคณะ, 2004) และเซลล์ไขข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Sakurai และคณะ, 2001) มีรายงานว่า Id1 มีการแสดงออกสูงมากทั้งระดับ mRNA และระดับโปรตีน ในผิวหนังของ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่ศึกษาทั้งหมด 9 ราย (n=9) (Bjorntorp และคณะ, 2003) นอกจากนี้ มีอีก การศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR ที่แสดงผลสนับสนุนการศึกษา ของ Bjorntorp และคณะ (Mark และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงการ แสดงออกของ Id1 ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคนี้ ดังนั้น การศึกษาการแสดงออกของ Id1 ใน lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษาวิจัย โดยคณะผู้วิจัย มุ่งจะศึกษา ถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Id1 ที่มีต่อการแบ่งเซลล์หรือการมีชีวิตอยู่ของ lymphocytes การศึกษานี้สามารถนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่เพื่อให้เข้าใจกลไกที่มีต่อระบบ ภูมิคุ้มกันของโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งความเข้าใจในกลไกการเกิดโรคที่แท้จริง จะนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของ mRNA และโปรตีน ของ Id1 ใน lymphocytes ของ ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการแสดงออกของ Id1ต่อการแบ่ง เซลล์ หรือการมีชีวิตอยู่ของ lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาวิจัยเรื่อง บทบาทของ transcription factor Id1 ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินนั้น สามารถแบ่งการวิจัยออกได้เป็น 5 ขั้นตอนหลัก

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่างเลือดและการเตรียมลิมโฟไซต์

ขั้นที่ 2 การตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของ Id1 ใน lymphocytes

ขั้นที่ 3 Lymphocyte proliferation assay

ขั้นที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีน ของ Id1 ใน lymphocytes

ขั้นที่ 5 วิเคราะห์ และสรุปผลการทดลอง

ประโยชน์ที่ได้รับ

ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยพบองค์ความรู้ใหม่ที่แสดงว่า ระดับการแสดงออกของ Id1 mRNA ใน lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินสูงกว่าในคนปกติประมาณ 2 เท่า โดยไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่า stimulation indices (SI) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกับกลุ่มคนปกติ นอกจากนี้ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า SI และการกำเริบของโรค ซึ่งประเมินจากระดับความรุนแรงของโรค (Psoriasis Area and Severity Index, PASI) อันนี้เพื่อให้เกิดความเข้าใจกลไกระดับโมเลกุลในระดับพันธุกรรม ที่เกี่ยวข้องกับบทบาทของ Id1 ในระบบภูมิคุ้มกัน จำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป

อย่างไรก็ตาม องค์ความรู้ใหม่ที่พบในการศึกษานี้ มีความน่าสนใจอย่างยิ่ง คณะผู้วิจัยกำลังอยู่ระหว่างการเตรียมนิพนธ์ต้นฉบับสำหรับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ นอกจากนี้ โครงการวิจัยดังกล่าวนี้ ได้ส่งเสริมความร่วมมือด้านวิชาการระหว่างสถาบันทั้งภายในและภายนอกประเทศมหาวิทยาลัย ให้เป็นที่ประจักษ์

บทนำ

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังเรื้อรังที่เกิดจากเซลล์ผิวหนังแบ่งตัวเร็วกว่าปกติ ทำให้ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) หนาขึ้น เกิดเป็นลักษณะผื่นนูนแดงปกคลุมด้วยสะเก็ดสีเงิน นอกจากผื่นที่ผิวหนัง ศีรษะ เข้า ศอก หรือเป็นทั่วตัว ผู้ป่วยส่วนมากมีความผิดปกติของเล็บร่วมด้วย (Tham และคณะ, 1988) และประมาณร้อยละ 5-42 ของผู้ป่วยมีอาการข้ออักเสบ (arthritis) (Biondi และคณะ, 1989) ในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีการรักษาโรคนี้ให้หายขาดได้ โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 0.5-4 ของประชากรทั่วโลก (Christopher, 2001) ในปัจจุบัน มีรายงานว่าประมาณ 125 ล้านคนของประชากรโลกป่วยเป็นโรคสะเก็ดเงิน และนับว่าเป็นโรคผิวหนังที่ชาวโลกควรตระหนักถึงความสำคัญ เพื่อให้สังคมโลกมีความตื่นตัวต่อโรคนี้ จึงมีการกำหนดให้วันที่ 29 ตุลาคม ของทุกปี เป็นวันสะเก็ดเงินโลก (world psoriasis day) โดยปี 2547 เป็นปีแรกที่มีการจัดงานวันสะเก็ดเงินโลก สำหรับประเทศไทย โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังที่พบบ่อย โดยคาดว่าจะมีผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินในประเทศไทยจำนวนไม่ต่ำกว่าหนึ่งล้านคน (<http://www.wrongdiagnosis.com/p/psoriasis/stats-country.htm>)

ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินส่วนมากมีอายุในช่วง 10-30 ปี จำนวนที่พบในชายและหญิงเป็นอัตราใกล้เคียงกัน (Brandrup และ Green, 1981; Barker, 1991) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคทางระบบภูมิคุ้มกันชนิด T-cell-mediated autoimmune disease (Uyemura และคณะ, 1993) มักจะมีการเกิดโรคสูงขึ้นเมื่อประวัติของบิดาหรือมารดาป่วยเป็นโรคนี้มาก่อน (Capon และคณะ, 2000) นอกจากนี้ มีการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทของหลายยีนบนโครโมโซมต่างๆ ที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคนี้ เช่น human leukocyte antigen (HLA), immunoglobulin super family gene cluster, epidermal differentiation complex gene cluster และ IL-10 เป็นต้น (Wongpiyabovorn, 2004) ดังนั้น สาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพันธุกรรม และมีปัจจัยอื่นๆ จากสิ่งแวดล้อมเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค การดำเนินโรค และความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน อย่างไรก็ตาม กลไกหรือปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อโรคยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน และแม้โรคนี้จะไม่ทำให้เกิดอันตรายถึงชีวิต แต่จะมีผลต่อสภาพทางจิตใจ สังคมและเศรษฐกิจของผู้ป่วยและผู้ใกล้ชิด

เนื่องจากโรคนี้ มีระดับความรุนแรงแตกต่างกัน การประเมินความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis Area and Severity Index; PASI score) (van de Kerkhof, 1992) มีประโยชน์มากในการเลือกวิธีการรักษา การประเมินความรุนแรงจะอาศัยปริมาณพื้นที่ที่เป็นโรค นอกจากปริมาณพื้นที่แล้วยังดูตำแหน่งที่เป็นด้วย ค่าที่ได้มีตั้งแต่ 0-72 และมาจากการคำนวณตามสมการดังนี้ คือ

$$\text{PASI score} = 0.1(R_h + T_h + S_h)A_h + 0.2(R_u + T_u + S_u)A_u + 0.3(R_l + T_l + S_l)A_l + 0.4(R_i + T_i + S_i)A_i$$

โดยที่ R_h, R_u, R_l, R_i	หมายถึง ความแดง (redness) ของผื่นผิวหนังโรคสะเก็ดเงิน ที่บริเวณศีรษะ (head) ขา (upper extremities) ลำตัว (trunk) และแขน (lower extremities) ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมีตั้งแต่ 0-4
T_h, T_u, T_l, T_i	หมายถึง ความหนา (thickness) ของผื่นผิวหนังโรคสะเก็ดเงิน ที่บริเวณศีรษะ ขา ลำตัว และแขน ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมีตั้งแต่ 0-4
S_h, S_u, S_l, S_i	หมายถึง สะเก็ดเงิน (scaliness) ที่ปกคลุมบนผื่นผิวหนังโรคสะเก็ดเงิน ที่บริเวณศีรษะ ขา ลำตัว และแขน ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมีตั้งแต่ 0-4
A_h, A_u, A_l, A_i	หมายถึง ปริมาณพื้นที่ (area) ที่เป็นโรค โดยจะดูที่บริเวณศีรษะ ขา ลำตัว และแขน ตามลำดับ ระดับความรุนแรงจะมีตั้งแต่ 0-6

โดยทั่วไปจะแบ่งความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงินออกเป็น 3 ระดับ คือ

ชนิดเป็นน้อย (mild psoriasis) ค่า PASI score จะน้อยกว่า 2 โดยมากพบผื่นเป็นแห่งๆ ที่เข้า
ข้อศอก หนังศีรษะ การรักษาให้ความชุ่มชื้น ยาทา แคมพู

ชนิดเป็นปานกลาง (moderate psoriasis) ค่า PASI score อยู่ระหว่าง 2-10 ผื่นโดยมากจะอยู่ที่
แขน ขา ลำตัว หนังศีรษะ การรักษาจะใช้ยาทา ให้ phototherapy และยารับประทาน

ชนิดเป็นรุนแรง (severe psoriasis) ค่า PASI score มากกว่า 10 ผื่นส่วนใหญ่จะแดง หรือเป็นตุ่ม
หนอง ทำให้มีการหลุดลอกของผิวหนัง ผู้ป่วยมักจะมีข้ออักเสบร่วมด้วย การรักษาจะให้
phototherapy และยารับประทาน

ถึงแม้มีความเชื่อในอดีตว่า โรคสะเก็ดเงินเกิดขึ้นจากความผิดปกติในการควบคุมการเพิ่ม
จำนวนของเซลล์ผิวหนัง (abnormal keratinocyte proliferation) แต่ปัจจุบัน มีข้อมูลสนับสนุนและ
เป็นที่ยอมรับว่าความผิดปกติดังกล่าวไม่ได้เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรค แต่เป็นผลมาจากการ
ตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันมากกว่า (Nickoloff, 1999) โดยพบว่ามีความไม่สมดุลของ cytokines
ที่สร้างมาจาก Th1 cells และ Th2 cells (Th1/Th2 imbalance) นั่นคือ มีการเพิ่มปริมาณของ
cytokines ที่สร้างมาจาก Th1 cells เช่น IFN- γ (Szabo และคณะ, 1998) TNF- α (Ettehadhi และ
คณะ, 1994; Bonifati และคณะ, 1994) IL-2 (Takematsu และคณะ, 1990) และ cytokines ประเภท
อื่นๆ (Wongpiyabovorn, 2004) สำหรับ cytokines ที่สร้างมาจาก Th2 cells ลดลง ได้แก่ IL-4

(Zalewska และคณะ, 2004) เป็นต้น เนื่องจากลักษณะของโรคนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ cytokines ไม่เพียงแต่มีผลกระทบต่อผิวหนังบริเวณรอยโรค (local) แต่ลักษณะที่เกิดขึ้นเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั่วร่างกาย (systemic) (Bonifati และ Ameglio, 1999; Bos และ de Rie, 1999; Kemeny และคณะ, 1994) โดยเม็ดเลือดขาวชนิด T cells เคลื่อนที่เข้ามาในชั้นหนังแท้ (dermis) จนนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพที่ผิวหนัง

เนื่องจากกลไกการเกิดหรือการดำเนินของโรคสเกกิดเงิน ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คณะนักวิจัยหลายกลุ่มได้ความพยายามศึกษาและโมเลกุลต่างๆ ที่มีหลักฐานว่าสัมพันธ์กับโรคนี้ โปรตีนชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจมากในโรคนี้ คือ Id1 (Inhibitor of differentiation/inhibitor of DNA binding) ซึ่งเป็น transcription factor และเป็นที่ทราบว่ามีความสำคัญในการยับยั้งพัฒนาการของเซลล์ (differentiation) แต่มีบทบาทในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และการดำรงอยู่ของเซลล์ (survival) ในเซลล์หลายประเภท เช่น เซลล์มะเร็ง (Wong และคณะ, 2004) และเซลล์ไขข้อของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Sakurai และคณะ, 2001) มีรายงานว่า Id1 มีการแสดงออกสูงมากทั้งระดับ mRNA และระดับโปรตีน ในผิวหนังของผู้ป่วยโรคสเกกิดเงินที่ศึกษาทั้งหมด 9 ราย (n=9) (Bjorntorp และคณะ, 2003) นอกจากนี้ มีอีกการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ โดยใช้เทคนิค quantitative real-time PCR ที่แสดงผลสนับสนุนการศึกษาของ Bjorntorp และคณะ (Mark และคณะ, 2006) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงการแสดงออกของ Id1 ในระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยโรคนี้ ดังนั้น การศึกษาการแสดงออกของ Id1 ใน lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสเกกิดเงินจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษาวิจัย โดยคณะผู้วิจัย มุ่งจะศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของ Id1 ที่มีต่อการแบ่งเซลล์หรือการมีชีวิตอยู่ของ lymphocytes การศึกษานี้สามารถนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่เพื่อให้เข้าใจกลไกที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันของโรคสเกกิดเงิน ซึ่งความเข้าใจในกลไกการเกิดโรคที่แท้จริง จะนำไปสู่การพัฒนาแนวทางการดูแลรักษาผู้ป่วยอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นต่อไป

วิธีวิจัย

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

คณะผู้วิจัยได้สกัด lymphocytes จากตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษาได้รับการยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากอาสาสมัครที่ร่วมโครงการวิจัย โดยได้มาจาก 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

เลือดของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่เข้าไปรับการตรวจและรักษาที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยมีระดับความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงินน้อย และปานกลาง (จำนวน 15 ราย)

2. กลุ่มควบคุม

เลือดของผู้บริจาคโลหิต ซึ่งเป็นตัวแทนของผู้ที่มีสุขภาพดี ไม่ป่วยเป็นโรคสะเก็ดเงิน หรือโรคผิวหนังอื่นๆ (จำนวน 9 ราย)

โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยาสำหรับ 4 ขั้นตอนหลัก ดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 การเก็บตัวอย่างเลือด และการเตรียม lymphocytes

วัตถุประสงค์

เพื่อแยก lymphocytes โดยเตรียมไว้สำหรับการทดลองในขั้นตอนต่างๆ ต่อไป โดย lymphocytes ได้ถูกนำไปสกัด total RNA และโปรตีน เพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA และโปรตีนของ Id1 จาก lymphocytes อีกส่วนหนึ่งจะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์ หรือการมีชีวิตอยู่ของ lymphocytes เหล่านั้น

วิธีการวิจัย

คณะผู้วิจัย ได้เตรียม lymphocytes จากตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยวิธี double density Ficoll separation ตัวอย่างเลือดที่ใช้ในการศึกษานั้น มาจากทั้งสองกลุ่มภายหลังจากการแยก lymphocytes จากตัวอย่างเลือดแล้ว ได้นำ lymphocytes ไปดำเนินการดังต่อไปนี้

1. สกัด total RNA และโปรตีน จาก lymphocytes ทันทีก่อนแยกได้จากเลือด โดยใช้รีเอเจนต์ TRIZOL (Invitrogen) ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต
2. ทำการศึกษาประสิทธิภาพการแบ่งเซลล์ของ lymphocytes โดยวิธี lymphocyte proliferation assay

ขั้นที่ 2 การตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของ Id1 ใน lymphocytes โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

วัตถุประสงค์

เพื่อหาระดับ Id1 mRNA ใน lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะกดจิตเทียบกับใน lymphocytes ของคนปกติ

วิธีการวิจัย

การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ Id1 ของผู้ป่วยโรคสะกดจิตกับคนปกติโดยใช้ปริมาณการแสดงออกของยีน GAPDH จากตัวอย่างเดียวกันเป็นมาตรฐานที่ใช้ในการแสดงปริมาณของ total RNA ในแต่ละตัวอย่าง ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยวิเคราะห์การแสดงออกของยีนทั้งสองด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการใช้ชุดรีเอเจนต์สำเร็จรูป ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) และ MasterTaq (Eppendorf) สำหรับ RT และ PCR ตามลำดับ พร้อมใช้ amplification primers จำเพาะ ดังนี้

- Id1 (Ishiguro และคณะ, 1996)

Sense primer

5'- TTC AGC CAG TCG CCA AGA ATC-3'

Anti-sense primer

5'- GCG CTG ATC TCG CCG TTG AG-3'

โดย PCR product ที่ได้มีขนาด 434 คู่เบส

- GAPDH (Hu และคณะ, 2004)

Sense primer

5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'

Anti-sense primer

5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'

โดย PCR product ที่ได้มีขนาด 226 คู่เบส

ภายหลังจากปฏิกิริยา RT-PCR แล้ว นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis แล้วบันทึกขนาด และความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพเจล สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

ขั้นที่ 3 Lymphocyte proliferation assay

วัตถุประสงค์

เพื่อวัดอัตราการแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนของ lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และเปรียบเทียบกับคนปกติ ซึ่งทำได้โดยการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ชนิดอาศัย เซลล์แบบไม่จำเพาะ (non-specific cell-mediated immune response) หากมี CMI defect เช่น T cell immuno-deficiency, autoimmune disease, malignancy และ AIDS เป็นต้น จะให้ผลการตอบสนอง lymphocytes proliferation ลดลง การทดสอบนี้จึงมักใช้ประโยชน์ในการตรวจผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง

วิธีการวิจัย

นำ lymphocytes ที่เตรียมได้จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และคนปกติมาทดสอบโดยวิธี phytohemagglutinin (PHA) stimulation test ซึ่งเป็นการกระตุ้น lymphocytes ให้แบ่งตัว โดย PHA และทำการวัดอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้โดย ^3H -thymidine ซึ่งเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจะต้องใช้ในการสร้างดีเอ็นเอ และวัดปริมาณของ ^3H -thymidine ที่ incorporate เข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์โดยการวัดปริมาณรังสีเบต้าที่เพิ่มขึ้น

ขั้นที่ 4 การตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Id1 ใน lymphocytes

วัตถุประสงค์

เพื่อหาระดับโปรตีนของ Id1 ใน lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเทียบกับจาก lymphocytes ของคนปกติ

วิธีการวิจัย

สกัดโปรตีนจาก lymphocytes ของทั้งสองกลุ่ม ภายหลังจากการวัดโปรตีนรวมด้วยเทคนิค BCA แล้ว วัดปริมาณโปรตีนของ Id1 ใน lymphocytes ด้วยเทคนิค ELISA โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก BioCheck, Inc. สำหรับการทดลองใช้ (evaluation kit)

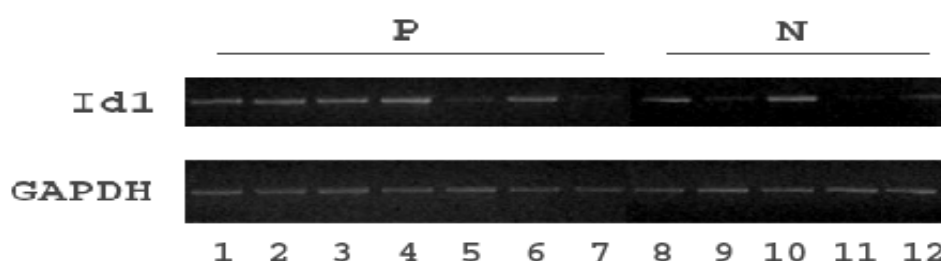
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ความเข้มของแถบดีเอ็นเอถูกวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Alphamager 2000 (Alpha Innotech Corp.) โดย normalize ความเข้มของแถบ Id1 ด้วยความเข้มของแถบ GAPDH ได้ทำแต่ละการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง มีการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ Student's *t*-test โดยการใช้โปรแกรม SigmaPlot หากค่า $P < 0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัย

การตรวจสอบการแสดงออกในระดับ mRNA ของ Id1 ใน lymphocytes โดยวิธี RT-PCR

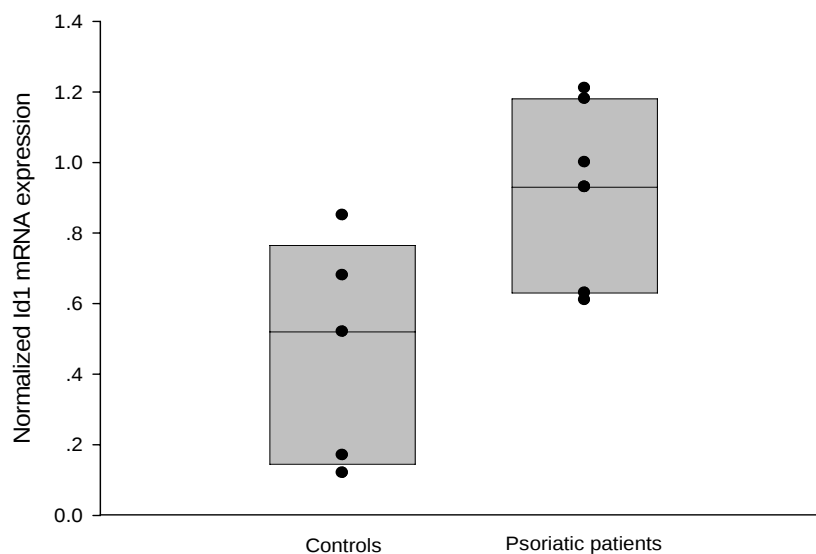
การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของ Id1 ของผู้ป่วยโรคสะกดเงินกับคนปกติ โดยใช้ปริมาณการแสดงออกของยีน GAPDH จากตัวอย่างเดียวกันเป็นมาตรฐานที่ใช้ในการแสดงปริมาณของ total RNA ในแต่ละตัวอย่าง และแสดงผลดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 1.5% Agarose gel electrophoresis แสดงระดับ mRNA ของ Id1 และ GAPDH ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก total RNA ของผู้ป่วยโรคสะกดเงิน (P) (lanes 1-7) เปรียบเทียบกับคนปกติ (N) (lanes 8-12)

ปริมาณ GAPDH ของ total RNA จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคสะกดเงิน และในคนปกติมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 1) สะท้อนถึงความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์ เพราะปริมาณ total RNA ที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง

ระดับ Id1 mRNA ของ total RNA จากตัวอย่างผู้ป่วยโรคสะกดเงิน และคนปกติมีปริมาณที่แตกต่างกันแสดงในรูปที่ 2 ผู้ป่วยโรคสะกดเงินมีปริมาณ Id1 mRNA มีค่าระหว่าง 0.61-1.18 (Mean:0.93, Median:0.93, SD:0.24) และคนปกติมีค่าระหว่าง 0.12-0.85 (Mean:0.47, Median:0.52, SD:0.32)



รูปที่ 2 Box plot แสดงระดับ mRNA ของ Id1 ด้วยเทคนิค RT-PCR จาก total RNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriatic patients) เปรียบเทียบกับคนปกติ (controls) ค่า normalized Id1 mRNA expression ได้จากการนำค่าการแสดงออกของยีน Id1 mRNA ของแต่ละตัวอย่างหารด้วยค่าการแสดงออกของยีน GAPDH mRNA ของตัวอย่างนั้น ๆ

การเปรียบเทียบระหว่างระดับ Id1 mRNA จาก PBMC ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกับคนปกติ พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยระดับของ Id1 mRNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินสูงกว่าในคนปกติประมาณ 2 เท่า แสดงใน Box plot ดังรูปที่ 2

การวัดอัตราการแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนของ lymphocytes

การวัดอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน lymphocytes ที่เตรียมได้จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และคนปกติมาทดสอบโดยวิธี phytohemagglutinin (PHA) stimulation test ซึ่งเป็นการกระตุ้น lymphocytes ให้แบ่งตัวโดย PHA และทำการวัดอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้โดย ^3H -thymidine ซึ่งเซลล์ที่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนจะต้องใช้ในการสร้างดีเอ็นเอ และวัดปริมาณของ ^3H -thymidine ที่ incorporate เข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์โดยการวัดปริมาณรังสีเบต้าที่เพิ่มขึ้น

การอ่านผล

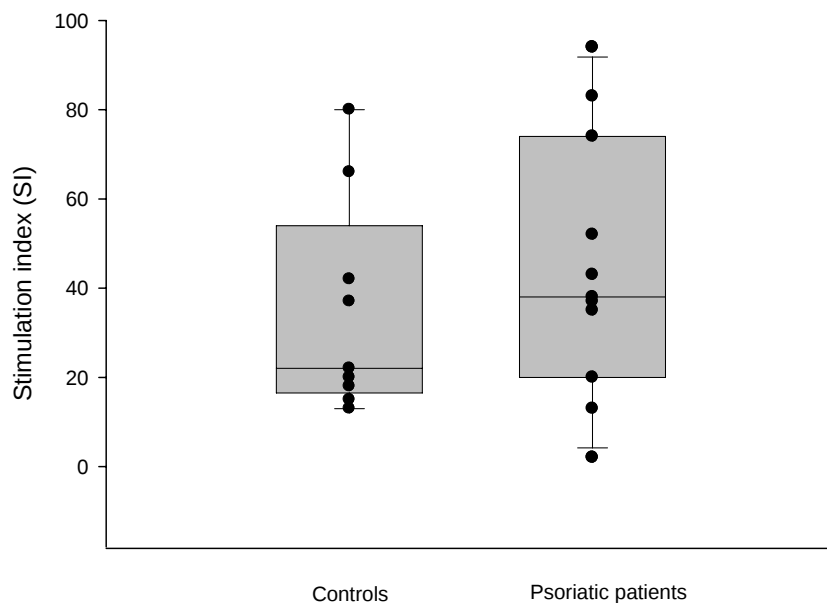
ค่า stimulation index (SI) แสดงถึงจำนวนเท่า (fold) ที่ เซลล์แบ่งตัวเมื่อถูกกระตุ้นด้วย PHA เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย PHA

$$SI = \frac{\text{cpm (PHA-stimulated cells)}}{\text{cpm (unstimulated cells)}}$$

cpm (unstimulated cells)

cpm = counts per minute

คนปกติจะพบว่า ผลต่างระหว่าง cpm (PHA-stimulated cells) กับ cpm (unstimulated cells) มีค่ามากกว่า 2,000 และค่า SI มากกว่า 5



รูปที่ 3 Box plot เพื่อแสดงอัตราการแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนของ lymphocytes ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriatic patients) เปรียบเทียบกับคนปกติ (controls)

การวัดอัตราการแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนของ lymphocytes โดยวิธี PHA stimulation test พบว่า ค่า SI ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจำนวน 15 คน อยู่ระหว่าง 2-94 (Mean:39, Median:37, SD:27) สำหรับค่า SI ของคนปกติจำนวน 9 คนมีค่าระหว่าง 13-80 (Mean:35, Median:22, SD:24) ดังแสดงในรูปที่ 3

ดังนั้น ผลการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยชนิดอาศัยเซลล์แบบไม่จำเพาะ โดยวิธี PHA stimulation test พบว่า ผู้ป่วยเกือบทั้งหมดไม่มีความผิดปกติของการตอบสนอง ยกเว้นเพียงรายเดียวที่มีค่าการตอบสนองต่ำกว่าช่วง (range) มาตรฐานของคนปกติ อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่า SI ของกลุ่มผู้ป่วยโรคสะกดจิตกับกลุ่มคนปกติ ($P > 0.05$)

การตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ Id1 ใน lymphocytes

โปรตีนที่สกัดได้จาก lymphocytes ของทั้งสองกลุ่ม มีปริมาณต่ำ จากการวัดด้วยเทคนิค BCA แล้ว คณะผู้วิจัยได้วัดปริมาณโปรตีนของ Id1 ใน lymphocytes ด้วยเทคนิค ELISA โดยชุดน้ำยาลำเร็จรูปของ BioCheck, Inc. อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่าให้ผลบวก ซึ่งน่าจะมาจากสาเหตุที่ชุดน้ำยาที่บริษัทกำลังพัฒนา และอนุเคราะห์ให้ทดลองใช้นี้ มีความไว (sensitivity) ต่ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางคลินิก

ข้อมูลผู้ป่วย (patient characteristics) ที่เข้าร่วมโครงการวิจัย พร้อมทั้งค่า PHA stimulation test ที่ได้จากการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ แสดงไว้ในตารางที่ 1

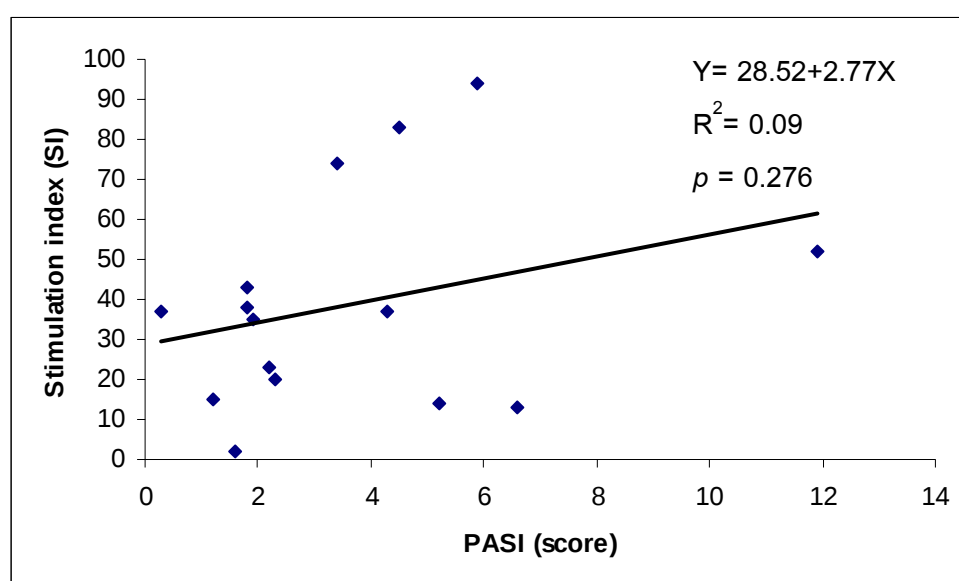
ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลผู้ป่วย (patient characteristics) ค่า stimulation index (SI) ซึ่งวิเคราะห์จาก PHA stimulation test และค่า PASI score

ลำดับ ที่	เพศ	อายุ	อายุที่เริ่มเป็นโรค	ระยะเวลาที่มีรอยโรค ครั้งสุดท้ายก่อนมาพบ แพทย์ (เดือน)	ค่า stimulation index (SI)	ค่า PASI score
1	หญิง	65	24	12	74	3.4
2	ชาย	25	14	1	35	1.9
3	ชาย	72	71	2	2	1.6
4	หญิง	53	48	3	43	1.8
5	หญิง	47	30	12	94	5.9
6	หญิง	53	34	24	83	4.5
7	หญิง	58	20	60	52	11.9
8	หญิง	63	58	24	38	1.8
9	ชาย	68	66	1	13	6.6
10	ชาย	75	70	6	20	2.3
11	หญิง	58	39	2	37	4.3
12	หญิง	37	31	12	37	0.3
13	ชาย	69	36	12	23	2.2
14	ชาย	41	25	12	14	5.2
15	ชาย	58	35	12	15	1.2

ดังแสดงในตารางที่ 1 ผู้ป่วย 15 ราย ชาย 7 ราย หญิง 8 ราย อายุระหว่าง 25-75 ปี อายุเฉลี่ย (mean $\pm$ SD) 58 ± 14 ปี อายุที่เริ่มเป็นโรคสะเก็ดเงิน 14-71 ปี อายุเฉลี่ยเมื่อเริ่มเป็นโรค (mean $\pm$ SD) 35 ± 18 ปี ระยะเวลาของการมีอาการของโรคครั้งสุดท้ายตั้งแต่เริ่มมีอาการจนถึงวันที่เจาะเลือดมาศึกษา อยู่ระหว่าง 1 เดือน - 5 ปี ผู้ป่วยที่มีสลายเกล็ดลำดับแรกเป็นโรคสะเก็ดเงินจำนวน 1 ราย

ผู้ป่วย 14 รายเป็นโรคสะเก็ดเงินชนิดคงที่ แบบ plaque type และมีผู้ป่วยเพียง 1 รายที่เป็นโรคสะเก็ดเงินชนิดผื่นเล็ก guttate type

ความรุนแรงของโรควัดโดย psoriasis area severity index (PASI) อยู่ระหว่าง 0.3-11.9 โดยมีค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean $\pm$ SD) 3.66 ± 2.93 ผู้ป่วย 3 รายไม่มีความผิดปกติของเล็บ 1 รายมีข้ออักเสบขณะเจาะเลือด 1 รายเคยมีประวัติข้ออักเสบแต่ไม่มีอาการขณะเจาะเลือด ผู้ป่วยที่เหลืออีก 13 รายไม่มีอาการทางข้อ ผู้ป่วยทุกรายได้รับการรักษาโดยยาทา corticosteroid และ/หรือ vitamin D₃/ coal tar ไม่มีผู้ป่วยรายใดได้รับยารับประทาน retinoid, methotrexate และ cyclosporine หรือได้รับการฉายแสง (phototherapy) ขณะเจาะเลือด



รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า stimulation index (SI) กับค่า psoriasis area and severity index (PASI) ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์แบบไม่จำเพาะ มีความสัมพันธ์กันหรือไม่ อย่างไร ในผู้ป่วยที่มีระดับความรุนแรงของโรคต่างๆ คณะผู้วิจัย ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของโรค (PASI) และค่าการตอบสนองต่อการกระตุ้นของภูมิคุ้มกัน (SI) ด้วยสถิติประเภท Pearson's correlation พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังกราฟในรูปที่ 4

สรุปและอภิปรายผล

คณะผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการคัดเลือก และดำเนินการให้ได้มาซึ่งอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการวิจัย ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และกลุ่มคนปกติที่มีสุขภาพดี รวมทั้งการเก็บตัวอย่างเลือด การแยก lymphocytes จากตัวอย่างเลือด การสกัด RNA การสกัดโปรตีน การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Id1 ทั้งระดับ mRNA และโปรตีน รวมทั้งการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยชนิดอาศัยเซลล์แบบไม่จำเพาะ

ประเด็นสำคัญที่พบในการดำเนินโครงการวิจัยนี้ คือ คณะผู้วิจัยได้พิสูจน์ว่ามีการแสดงออกของ Id1 mRNA ใน human lymphocytes ซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน นอกจากนี้ เมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ระดับการแสดงออกของ Id1 mRNA ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน มีค่าสูงกว่าในคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีความแตกต่างกันในระดับ Id1 mRNA จากทั้งสองกลุ่มประมาณ 2 เท่า ซึ่งน่าจะสะท้อนถึงบทบาทระดับโมเลกุลของ Id1 ในโรคสะเก็ดเงินในระบบภูมิคุ้มกัน ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ สอดคล้องกับการพบระดับการแสดงออกที่มากขึ้นของ Id1 ในรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (Bjornorp และคณะ, 2003; Mark และคณะ, 2006) ทั้งนี้ คณะผู้วิจัย ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน Id1 ใน lymphocytes ของทั้งสองกลุ่ม เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้มีปริมาณน้อย และชุดน้ำยาสำเร็จรูป ELISA ยังมีความไวต่ำ อย่างไรก็ตาม เป็นไปได้ยาก หากจะเพิ่มปริมาตรเลือดจากอาสาสมัคร สำหรับเตรียม lymphocytes

นอกจากนี้ ในการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยชนิดอาศัยเซลล์แบบไม่จำเพาะโดยวิธี PHA stimulation assay คณะผู้วิจัย พบว่าผู้ป่วยเกือบทั้งหมดไม่มีความผิดปกติของการตอบสนอง ยกเว้นเพียงรายเดียวจาก 15 ราย ที่มีค่าการตอบสนองต่ำกว่าช่วง (range) มาตรฐานของคนปกติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างค่า stimulation index (SI) ของกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกับกลุ่มคนปกติ ($P > 0.05$)

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มีอาการรุนแรงน้อยถึงปานกลาง คือ มีค่า PASI น้อยกว่า 10 มีเพียง 1 รายที่มีอาการรุนแรงมาก โดยมี PASI เท่ากับ 11.9 คณะผู้วิจัย ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอายุผู้ป่วย อายุที่เริ่มเป็นโรค และระยะเวลาที่มีรอยโรคครั้งสุดท้ายกับระดับความรุนแรงโรค

ผลการทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยชนิดอาศัยเซลล์แบบไม่จำเพาะโดยวิธี PHA stimulation test พบว่าผู้ป่วยเกือบทั้งหมดไม่มีความผิดปกติของการตอบสนอง ยกเว้นเพียงรายเดียวที่มีค่าการตอบสนองต่ำกว่าช่วงมาตรฐานของคนปกติ ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการที่ผู้ป่วยมีอายุมาก และมีโรคอื่นร่วมอีกหลายโรคหรือจากสาเหตุอื่น ๆ ซึ่งไม่ได้อยู่ในขอบเขตการศึกษาของงานวิจัยนี้ จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของโรค (PASI) และค่าการตอบสนองต่อการกระตุ้นของภูมิคุ้มกัน (SI) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้น จึงไม่สามารถใช้ค่า

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์แบบไม่จำเพาะโดยการกระตุ้นด้วย phytohemagglutinin (PHA non-specific cell-mediated immunity stimulation test) เป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับความรุนแรงของโรคสะเก็ดเงินได้

ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าคณะผู้วิจัย ได้พิสูจน์ว่าระดับการแสดงออกของ Id1 mRNA ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน มีค่าสูงกว่าในคนปกติประมาณ 2 เท่า จากการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR คณะผู้วิจัยเห็นว่า เพื่อให้ได้ผลน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น ควรวิเคราะห์ด้วยเทคนิค real-time quantitative RT-PCR สำหรับการวิเคราะห์ระดับโปรตีน Id1 ใน lymphocytes นั้น ควรใช้เทคนิค Western blot (Suh และคณะ, 2008) เพราะมีความไวสูงกว่าเทคนิค ELISA นอกจากนี้ ควรเพิ่มจำนวนกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งให้ครอบคลุมทุกระดับความรุนแรงของโรค

เอกสารอ้างอิง

- Barker JN. The pathophysiology of psoriasis. *Lancet* 1991; 338: 227- 30.
- Biondi Oriente C, Scanpa R, Pucino A, Oriente P. Psoriasis and psoriatic arthritis. Dermatological and Rheumatological Co-operative Clinical Report. *Acta Dermatol Venereol* 1989; 146: 69-71.
- Bjorntorp E, Parsa R, Thornemo M, Wennberg AM, Lindahl A. The helix-loop-helix transcription factor Id1 is highly expressed in psoriatic involved skin. *Acta Derm Venereol* 2003; 83(6): 403-9.
- Bonifati C, Carducci M, Cordiali Fei P, *et al.* Correlated increases of tumour necrosis factor alpha, interleukin-6 and granulocyte monocyte-colony stimulating factor levels in suction blister fluids and sera of psoriatic patients-relationships with disease severity. *Clin Exp Dermatol* 1994; 19(5):383-7.
- Bonifati C and Ameglio F. Cytokines in psoriasis. *Int J Dermatol* 1999; 38: 241–51.
- Bos JD and de Rie MA. The pathogenesis of psoriasis: immunological facts and speculations. *Immunol Today* 1999; 20: 40–6.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scandinavian J Clin Lab Invest* 1968; 97: 77-89.
- Brandup E and Green A. The prevalence of psoriasis in Denmark. *Acta Derm Venerol* (Stockh) 1981; 61: 344-6.
- Capon F, Dallapiccola B, Novelli G. Advances in the search for psoriasis susceptibility genes. *Molec Genet Meta* 2000; 71: 250-5.
- Christophers E. Psoriasis-epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26: 314-20.
- Ettehadi P, Greaves MW, Wallach D, *et al.* Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clin Exp Immunol* 1994; 96(1): 146-51.
- Hu LH, Chen FH, Li YR, *et al.* Real-time determination of human telomerase reverse transcriptase mRNA in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10(23): 3514-7.
- Ishiguro A, Spirin KS, Shiohara M, *et al.* Id2 expression increases with differentiation of human myeloid cells. *Blood* 1996; 87(12): 5225-31.

Kemeny L, Michel G, Dobozy A, Ruzicka T. Cytokine system as potential target for anti-psoriatic therapy. *Exp Dermatol* 1994; 3(1): 1–8.

Mark EB, Jonsson M, Asp J, *et al.* Expression of genes involved in the regulation of p16 in psoriatic involved skin. *Arch Dermatol Res* 2006; 297(10): 459-67.

Nickoloff BJ. Skin innate immune system in psoriasis: friend or foe? *J Clin Invest* 1999; 104 (9): 1161-4.

Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K. Expression of ID family genes in the synovia from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284(2): 436-42.

Suh HC, LEEANANSAKSIRI W, Ji M, *et al.* Id1 immortalizes hematopoietic progenitors in vitro and promotes a myeloproliferative disease in vivo. *Oncogene* 2008. [Epub ahead of print]

Szabo SK, Hammerberg C, Yoshida Y, *et al.* Identification and quantitation of interferon-gamma producing T cells in psoriatic lesions: localization to both CD4+ and CD8+ subsets. *J Invest Dermatol* 1998; 111(6): 1072-8.

Takematsu H and Tagami H. Interleukin-2 receptor, and interferon-gamma in the suction blister fluids from psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 1990; 282 (3): 149-52.

Tham SN, Lim JJ, Tay SH, *et al.* Clinical observations on nail changes in psoriasis. *Ann Acad Med Singapore* 1988; 17: 482-5

Uyemura K, Yamamura M, FIVENSON DF, *et al.* The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T helper type I cell-mediated response. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 701-5.

van de Kerkhof PC. On the limitations of the psoriasis area and severity index (PASI). *Br J Dermatol* 1992; 126(2): 205.

Wong YC, Wang X, Ling MT. Id-1 expression and cell survival. *Apoptosis* 2004; 9(3): 279-89.

Wongpiyabovorn J. Psoriasis. *Thai J Dermatol* 2004; 20(1): 10-25.

Zalewska A, Wyczolkowska J, DZIANKOWSKA-BARTKOWIAK B and Sysa-Jedrzejowska A. Interleukin-4 plasma levels in psoriasis vulgaris patients. *Med Sci Monit* 2004; 10(4): 156-62.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ เรื่อง “ Expression of Id1 mRNA in peripheral blood of psoriatic patients” งานประชุม “ นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.ครั้งที่ 6 ” วันที่ 12-14 ตุลาคม 2549 ณ โรงแรมรีเจนท์ ซะอ่า จังหวัดเพชรบุรี
2. นำเสนอผลงานแบบบรรยาย เรื่อง “ Upregulation of Id1 in peripheral blood of psoriatic patients” งานประชุม “ นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว.ครั้งที่ 7” วันที่ 11-13 ตุลาคม 2550 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน จังหวัดชลบุรี
3. กำลังอยู่ระหว่างการเตรียมนิพนธ์ต้นฉบับสำหรับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารระดับนานาชาติ