



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของดีเอ็นเอ methylation กับการเกิดโรคสะกดเงินและกลไกการควบคุมภาวะ
methylation ในโรคสะกดเงิน

โดย รศ.ดร.พญ. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร

พฤษภาคม 2553

สัญญาเลขที่ RMU 5080064

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ บทบาทของดีเอ็นเอ methylation กับการเกิดโรคสะกดเงินและกลไกการควบคุมภาวะ
methylation ในโรคสะกดเงิน

โดย รศ.ดร.พญ. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จได้โดยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ ศาสตราจารย์นายแพทย์
อภิวพันธ์ มุทิตรางกูร ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยเหลือ
แก้ไขปัญหาให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร.เกรียงศักดิ์ ฤชศาศวัต ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ แนะนำ รวมถึง
ช่วยแก้ไขงานและการใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการต่างๆ

ขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์ ชนพ โชติช่วง และ Professor Dr. Paul Scott
Thorner ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่ให้การสนับสนุนช่วยเหลือในการตรวจย้อมพิเศษชิ้นเนื้อ และให้คำปรึกษางานวิจัยที่เป็น
ประโยชน์ยิ่ง

ขอขอบคุณแพทย์ประจำบ้านและนิสิตปริญญาโท หน่วยผิวหนัง ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และเก็บ
ข้อมูลในการวิจัย ขอขอบคุณ พยาบาล เจ้าหน้าที่ รวมทั้งผู้ป่วยที่เข้าร่วมในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้
ที่แผนกผู้ป่วยนอก ผิวหนัง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

และงานวิจัยในครั้งนี้สามารถประสบความสำเร็จได้ด้วยดีโดย นายสุรศักดิ์ อยู่ยงสถิต
นิสิตปริญญาเอก นางสาวพรรณทิพา พรตเจริญ นิสิตปริญญาโท และนางสาวจีระภา คำเพ็ง
นิสิตปริญญาโท สหสาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่มีความตั้งใจทำงานวิจัยในครั้งนี้

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และสำนักงานคณะ
กรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RMU 5080064

ชื่อโครงการ : บทบาทของดีเอ็นเอ methylation กับการเกิดโรคสะเก็ดเงินและกลไกการควบคุมภาวะ methylation ในโรคสะเก็ดเงิน

ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.พญ. จงกลณี วงศ์ปิยะบวร

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: jongkonnee.w@chula.ac.th, jongkonneew@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (1 มิถุนายน 2550 - 31 พฤษภาคม 2553)

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อย อุบัติการณ์ของโรคสะเก็ดเงินประมาณร้อยละ 1-3 ของประชากรโลก สาเหตุของการเกิดโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด จากข้อมูลที่ผ่านมาพบว่า การเปลี่ยนแปลงแบบนอกเหนือยีน (epigenetics) มีความสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน คณะผู้วิจัยทำการศึกษาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนทั้งแบบครอบคลุมทั้งจีโนมและแบบจำเพาะแต่ละยีนกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเซลล์ผิวหนัง และเซลล์เม็ดเลือดขาวต่างๆเปรียบเทียบระหว่างคนปกติและผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินชนิดพลาคลกลุ่มละ 20 ราย โดยการศึกษาแบบครอบคลุมทั้งจีโนมทำโดยศึกษาระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของ long-interspersed nuclear element-1 (LINE-1) repetitive sequences ส่วนการศึกษายีนที่จำเพาะได้เลือกศึกษายีน ID4 และยีน BCAP31 จากผลการศึกษาโดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ (methylation microarray) และทำการศึกษาระดับดีเอ็นเอ เมทิลเลชันโดยวิธีเมทิลเลชัน สเปลิฟิก ฟลายเมอร์ (MSP) และ ไบเซล์ไฟล์โคลนนิ่งแอนชีควอนซิง (bisulfite cloning and sequencing) จากนั้นศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ID4 และ BCAP31 พร้อมทั้งดูความสัมพันธ์กับระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนดังกล่าวนอกจากนี้ยังศึกษาระดับ IL-22 ในซีรัมก่อนและหลังการรักษาด้วยยาเมโทเทรกเซต ซึ่งเป็นยาที่มีรายงานว่าเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

พบว่าเซลล์ผิวหนังกำพร้าและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจะมีการลดลงของระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน LINE-1 เมื่อเทียบกับคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.002$ และ $p=0.019$ ตามลำดับ) และพบการเกิดภาวะโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชันของยีน ID4 สัมพันธ์กับการลดลงการแสดงออกของยีนบริเวณที่เกิดพาราเคอราโตซิส (parakeratosis) เกิดภาวะโปรโมเตอร์ไฮเปอร์เมทิลเลชันของยีน BCAP31 สัมพันธ์กับการลดลงการแสดงออกของยีนในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (peripheral mononuclear cells) ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.0001$) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับซีรัม IL-22 ในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินสูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.001$) และยังสัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค ($r=0.63$, $p=0.004$) ระดับซีรัม IL-22 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการรักษาด้วยยาเมโทเทรกเซต ($p<0.001$)

จากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งที่เกิดขึ้นทั่วทั้งจีโนมและยีนที่จำเพาะมีความสำคัญต่อพยาธิกำเนิด และการดำเนินโรคสะเก็ดเงิน

คำหลัก : โรคสะเก็ดเงิน, ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน, LINE-1, ID4, BCAP31, IL-22

Abstract

Project Code: RMU 5080064

Project Title: Roles of DNA methylation in psoriasis and mechanisms which control methylation in psoriasis

Investigator: Assoc. Prof. Jongkonnee Wongpiyabovorn
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

E-mail Address: jongkonnee.w@chula.ac.th, jongkonneew@gmail.com

Project Period: 3 years (1 June 2007 – 31 May 2010)

Psoriasis is a common autoimmune skin disease, affecting approximately 1-3% of the population worldwide. Etiology of the disease is still unclear. Recently, epigenetic phenomena have also been implicated in the pathogenesis of psoriasis. We investigated genome-wide and gene-specific DNA methylation in 20 chronic plaque type psoriasis patients compared to 20 healthy controls. Long-interspersed nuclear element-1 (LINE-1) repetitive sequences were used for genome-wide methylation. The candidate genes, *ID4* and *BCAP31*, were selected from methylation microarray data and analyzed using methylation specific primer (MSP) and bisulfite cloning and sequencing. Moreover, serum IL-22 level was analyzed before and after treatment with methotrexate which is the methylation modifying drug.

The LINE-1 methylation level of keratinocytes and total leukocytes from psoriasis patients were significantly lower than from healthy subjects ($p < 0.002$ and $p=0.019$, respectively). For candidate gene, inverse correlation between *ID4* promoter hypermethylation and mRNA expression associated with parakeratosis was found in psoriasis. Additionally, inverse correlation between *BCAP31* promoter hypermethylation and mRNA expression was found in peripheral mononuclear cells from psoriasis patients. Moreover, serum IL-22 levels were significantly higher in psoriasis patients than in controls. There was a significant positive correlation between IL-22 levels and PASI ($r=0.63$, $p=0.004$). Methotrexate significantly reduced serum levels of IL-22 in psoriasis patients ($p<0.001$).

In conclusion, our study demonstrated genome-wide and gene-specific DNA methylation play important role in pathogenesis and course of psoriasis

Keywords: psoriasis, DNA methylation, LINE-1, *ID4*, *BCAP31*, IL-22

บทนำ

ความสำคัญของ psoriasis ในประเทศไทย

psoriasis หรือ โรคสะเก็ดเงินหรือโรคเรื้อนทอง เป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 1-3 ของประชากรโลก (1) ความชุกของการเกิดโรคแตกต่างกันไปตามภูมิประเทศ เชื้อชาติ และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น อัตราความชุกในประเทศ Samoa ต่ำสุดถึง 0% แต่ในประเทศ Arctic-Kasach'ye สูงถึง 11.8% (2) ทางด้านเอเชียซึ่งมีประชากรเชื้อชาติต่างๆ จำนวนมาก พบว่าความชุกของโรคสะเก็ดเงินใน India 0.5-1.5%, Malaysia 4-5.5%, Japan 1.18% และ Kuwait 3.1% เป็นต้น(3)

ลักษณะอาการทางคลินิกโดยทั่วไปคือคนไข้จะมีผื่นนูนหนาสีแดงมีขอบเขตชัดเจนและปกคลุมด้วยสะเก็ดสีเงิน ซึ่งรอยโรคส่วนใหญ่จะปรากฏบริเวณ ข้อศอก, เข่า, ศีรษะ, หรือบริเวณลำตัว (4) โดยโรคนี้สามารถพบได้ทุกช่วงอายุ อุบัติการณ์การเกิดโรคในเพศชายและหญิงไม่แตกต่างกัน

สำหรับประเทศไทย โรคสะเก็ดเงินจัดเป็นโรคผิวหนังชนิดที่ไม่ติดเชื้อที่พบได้บ่อยมาก โดยรายงานจากศูนย์ข้อมูลคอมพิวเตอร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบว่าผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมารับการรักษาที่แผนกผู้ป่วยนอกระหว่างปี 2550-2551 จำนวนทั้งสิ้น 2378 ราย เนื่องจากโรคสะเก็ดเงินเป็นโรคที่ยังไม่มีวิธีการรักษาให้หายขาดได้ อาการของโรคสามารถบรรเทาและ/หรือกำเริบได้ตลอดเวลา วิธีการรักษาในปัจจุบันให้ผลเพียงให้โรคสงบชั่วคราว (remission) รวมทั้งการรักษาใหม่ที่มีค่าใช้จ่ายสูงก็ไม่สามารถทำให้โรคหายขาดหรือมีระยะการสงบของโรคที่นานได้ และยังไม่สามารถพยากรณ์ผลการรักษาได้แน่นอน ผู้ป่วยแต่ละรายมีการตอบสนองต่อการรักษาที่แตกต่างกัน โรคสะเก็ดเงินจึงจัดเป็นโรคที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศไทยในปัจจุบัน

พยาธิกำเนิดของโรคสะเก็ดเงิน

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเองซึ่งเกี่ยวข้องกับ T-lymphocyte (T-lymphocyte mediated skin autoimmune disease)(5) โดยผู้ป่วยมีพันธุกรรมที่มีแนวโน้มในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเป็นแบบ Th1 และ Th17 immune effector functions เมื่อมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน T cell ที่ตอบสนองจะเป็น T helper1, T-cytotoxic1 และ T-helper17 หลั่ง cytokines ได้แก่ interferon gamma (IFN- γ), interleukin(IL)-12, IL-17, IL-22, IL-23 และ IL-2 เป็นต้น(6) (7) (4) นอกจากนี้ยังมีการหลั่ง proinflammatory cytokines และ chemokines ต่างๆ เช่น Tumor necrotic factor-alpha (TNF- α), IL-8 ทั้งหมดส่งผลให้มีการเจริญเติบโตและพัฒนาที่ผิดปกติของเซลล์ผิวหนัง มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์หลอดเลือด และเกิดการอักเสบขึ้น

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคและกลไกการเกิดโรคที่ชัดเจน แต่เชื่อว่าปัจจัยทางพันธุกรรมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้ผู้ป่วยแต่ละรายมีการแสดงออกของโรคและความรุนแรงของโรคที่ต่างกัน มีรายงานการวิจัยที่สนับสนุนว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรม มีส่วนสำคัญในการทำให้เกิดโรคคือการศึกษาคู่แฝดไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) ได้ค่า concordance rate ประมาณ 70% ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับแฝดไข่คนละใบ (dizygotic twins) มี

ค่า 20% และจากการศึกษาในครอบครัว (Family studies) มีอุบัติการณ์แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางด้านพันธุกรรมมีผลต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน การดำเนินของโรคจะสูงขึ้นมากถึงร้อยละ 50 หรือครึ่งหนึ่งของญาติพี่น้องสายเลือดเดียวกันเมื่อทั้งพ่อ และแม่เป็นโรคสะเก็ดเงิน แต่อัตราความชุกจะลดลงถึงร้อยละ 16 เมื่อพ่อหรือแม่คนใดคนหนึ่งเป็นโรค และลดลงถึงร้อยละ 8 เมื่อทั้งพ่อและแม่ไม่ได้เป็นโรค ซึ่งการศึกษาเหล่านี้สนับสนุนว่าพันธุกรรมมีบทบาทที่สำคัญต่อโรคสะเก็ดเงิน 71% ของผู้ป่วยในวัยเด็กที่เป็นโรคสะเก็ดเงินมักมีประวัติทางครอบครัวมาก่อน(4) มีการศึกษาหา Susceptibility regions บนตำแหน่งต่างๆ ของโครโมโซมที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงินในมนุษย์ พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และการดำเนินของโรคสะเก็ดเงินหลายตัวเช่น ยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1q21, 3q21, 4q, 7p, 8, 11, 16q, 17q, 20p และ 6p มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค และการดำเนินของโรค ปัจจุบันพบว่าการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในโรคสะเก็ดเงินมีมากกว่า 1300 ยีนใน 19 susceptible loci บน 15 โครโมโซม(5)

ความสำคัญของ DNA methylation กับโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

แนวทางการศึกษาในปัจจุบันนอกจากวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนแล้ว ยังมีการศึกษาผลของการควบคุมแบบนอกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานของยีนโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของสาย DNA โดยเฉพาะการเกิดภาวะ DNA methylation ภายในยีน ซึ่งเป็นกลไกควบคุมการแสดงออกของยีนในเซลล์จำเพาะต่างๆ ด้วย โดยการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งกับการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA demethylation/methylation ทั้งในส่วนยีนควบคุมการแสดงออกของมะเร็ง (oncogene) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene)(8, 9) (10)

การศึกษา DNA methylation กับโรค autoimmune ยังมีไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation กับโรคในกลุ่มภูมิคุ้มกันตนเองเช่น โรค SLE และโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

จากข้อมูลการศึกษาทางพันธุกรรมที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ พบว่า epigenetics มีความสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน โดยคณะผู้วิจัยได้รายงานการศึกษา epigenetics ที่สัมพันธ์กับโรคสะเก็ดเงินเป็นรายงานแรกของโลก โดยศึกษาภาวะ methylation ของยีน *SHP-1* ซึ่งทำหน้าที่เป็น negative regulatory signal gene ของ epithelial cells และจัดอยู่ในกลุ่มของ tumor suppressor gene ใน hematopoietic cells *SHP-1* มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการเจริญและเพิ่มจำนวนซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์นั้นๆ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า บริเวณ promoter ของยีนนี้เกิดกระบวนการ demethylation หรือ hypomethylation ในเซลล์ผิวหนังของคนไข้โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นอาสาสมัครปกติ ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ hypomethylation จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อพยาธิ

กำเนิดของโรคผิวหนัง (skin pathogenesis) โดยเฉพาะเกี่ยวข้องกับระดับการเพิ่ม *SHP-1* transcription ในผิวของโรคสะเก็ดเงิน (11)

จากการศึกษาในครั้งนี้รวมถึงรายงานการศึกษาที่ผ่านมานำไปสู่สมมุติฐานว่าน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation บริเวณ repetitive sequence และ promoter ของยีนต่างๆในยีนโนม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนต่างๆ โดยผลของการเปลี่ยนแปลงระดับ methylation ในยีนเหล่านี้อาจเป็นกลไกที่สำคัญในการเกิดโรคและการดำเนินของโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจะทำการศึกษาภาวะ genome-wide DNA methylation ในคนไข้โรคสะเก็ดเงินเปรียบเทียบกับคนปกติ เพื่อหาความสัมพันธ์ของกระบวนการ genome-wide DNA methylation กับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน นอกจากนี้ผู้วิจัยยังจะทำการคัดเลือกยีนจำเพาะ(candidate gene)ที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคและทำการศึกษาภาวะ DNA methylation ในยีนนั้น รวมถึงศึกษากลไกการเกิด methylation ของยีนนั้นในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน โดยทำการศึกษาในเซลล์ผิวหนังและเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆของผู้ป่วย เพื่อนำไปสู่การเข้าใจกลไกการเกิดและการดำเนินของโรคสะเก็ดเงินและอาจเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นดัชนีบ่งชี้โอกาสของการเกิดโรค และ ความรุนแรงของโรค องค์ความรู้ในครั้งนี้ยังอาจนำมาพัฒนาวิธีป้องกันและรักษาโรคแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาบทบาทของ DNA methylation กับพยาธิกำเนิดและการดำเนินโรคสะเก็ดเงิน โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อศึกษาภาวะ methylation ทั่วจีโนม (genome-wide DNA methylation) สัมพันธ์กับกระบวนการเกิดโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) โดยศึกษาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกับกลุ่มควบคุม
2. เพื่อศึกษาภาวะ methylation ใน candidate genes ที่คัดเลือกได้สัมพันธ์กับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินกับกลุ่มควบคุม
3. เพื่อศึกษากลไกที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ methylation ในยีนที่พบในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน
4. เพื่อศึกษาหาตัวชี้ (biomarker) อื่นๆ ที่สัมพันธ์กับความรุนแรงของโรค หรือช่วยพยากรณ์ผลการรักษาโรค

วิธีการทดลอง

กลุ่มประชากรที่นำมาศึกษา

กลุ่มศึกษา คือ ผู้ป่วยประชากรไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย จำนวน 20 คน

1. การคัดเลือกประชากรเพื่อนำมาศึกษา

เกณฑ์การเลือกผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

Inclusion criteria :

- ผู้หญิงหรือผู้ชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปีเชื้อชาติไทย หรือ ไทยจีน
- ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคสะเก็ดเงินชนิด chronic plaque type โดย แพทย์ผู้เชี่ยวชาญทาง Dermatology พร้อมทั้งได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย

Exclusion criteria : ผู้ป่วยที่ไม่สมัครใจยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

- ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่ได้รับยาทาเฉพาะที่ภายใน 2 สัปดาห์ หรือ ยารับประทานรักษาโรคสะเก็ดเงินภายใน 4 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
- ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่ม Corticosteroid รวมถึงยากดภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ขณะทำการศึกษา
- ผู้ป่วยที่มีภาวะ Autoimmune disease อื่นๆ
- ผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคมะเร็ง

เกณฑ์การเลือกกลุ่มควบคุม (control)

Inclusion criteria : -

- อาสาสมัครหญิงหรือชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปีเชื้อชาติไทย หรือไทยจีน
- อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี

Exclusion criteria : -

- มีประวัติครอบครัวเคยเป็นโรคสะเก็ดเงิน และอาสาสมัครมีประวัติเป็น autoimmune disease อื่นๆ

2. ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยลงนามในใบยินยอม

3. บันทึกข้อมูลที่สำคัญทางคลินิกของผู้ป่วย

- ข้อมูลพื้นฐานทั่วไป (demographic data)

- ประเมินความรุนแรงของโรค โดยอาศัยจากอาการ, ใช้ Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score ซึ่งเป็น clinical score มาตรฐานในการประเมินความรุนแรงของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

การเก็บตัวอย่างเลือดและการคัดแยกเซลล์

เก็บตัวอย่างเลือด 30 มล. ใน heparin tube นำมา

- ปั่นแยก peripheral blood mononuclear cell (PBMC) โดยใช้วิธี Ficoll-Hypaque density gradient และใช้ immunomagnetic bead ที่จำเพาะในการแยก CD4+ T cell, CD8+ T cell และ B cell
- ปั่นแยก neutrophil โดยใช้วิธี polymorph-prep density gradient

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ผู้ป่วยจะได้รับการตัดชิ้นเนื้อโดยวิธี punch biopsy ซึ่งผู้วิจัยจะนำส่งตรวจพยาธิสภาพตามปกติ โดยการย้อม H&E และทำการตัดชิ้นเนื้อจาก paraffin section และ แบ่งชิ้นเนื้อบางส่วนเก็บ ที่อุณหภูมิ -80 องศา เพื่อเตรียม frozen section จากนั้นนำมาแยกเซลล์ชั้นหนังกำพร้าออกมาศึกษาโดยทำการแยกเซลล์ด้วยวิธี Laser capture microdissection (LCM)

สำหรับชิ้นเนื้อของคนปกติ ผู้วิจัยจะขอจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดศัลยกรรมตกแต่ง โดยทำการเก็บชิ้นเนื้อภายหลังจากที่ผู้ป่วยเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมโครงการ และทำการเก็บชิ้นเนื้อและแยกเซลล์เช่นเดียวกับชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย

การศึกษา Genome-wide DNA methylation โดยใช้ repetitive sequences

ทำการสกัด DNA จากเซลล์ที่แยกได้โดยใช้วิธี phenol-chloroform extraction และนำมาศึกษา ลักษณะการเกิด methylation ในส่วน LINE-1 ซึ่งอยู่ในยีนโนม โดยใช้วิธี Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) หลักการคือ นำ DNA ที่สกัดได้มาเติมสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) แต่จะไม่เปลี่ยน methylcytosine (^mC) และนำไปเพิ่มจำนวนโดยใช้ primers ที่จำเพาะ ซึ่งจะทำให้ amplicons ที่ได้มี Thymidine (T) แทน cytosine (C) ทั้งหมดยกเว้น methylcytosine (^mC) ที่ไม่เปลี่ยน ดังนั้นจึงสามารถใช้ restriction enzyme ที่เหมาะสม เช่น Taq1 ตัด เพื่อแยกความแตกต่างได้ หลังจากนั้นจึงนำมาแยกสาย DNA โดยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) และย้อมด้วย SYBR® Green แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผล %Methylation ด้วยเครื่อง Phosphorimager

โดยการศึกษาภาวะการเกิด genome-wide methylation จะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ genome-wide DNA methylation กับ การเกิดโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

การศึกษานี้จะทำการศึกษาโดยใช้ DNA จากเซลล์หนังกำพร้า เซลล์เม็ดเลือดขาว T cell, B cell, non-T, non-B cell, และ neutrophil จากผู้ป่วยมาเปรียบเทียบกับคนปกติ กลุ่มละ 20 ราย

การศึกษา candidate genes

ทำการศึกษายีน 2 ยีนคือ ID4 และ BCAP31 ซึ่งคัดเลือกจากผล methylation microarray ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาไว้แล้ว

- การศึกษายีน ID4ทำการศึกษาดังนี้

- ศึกษาภาวะ DNA methylation ของยีน ID4 บริเวณ promoter

โดยวิธี methylation specific primer (MSP) โดยศึกษาใน human cell lines และ เซลล์หนังกำพร้าในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม เปรียบเทียบกับคนปกติและโรคอื่นๆได้แก่ โรค squamous cell carcinoma of skin และศึกษาใน human cell lines ต่างๆ โดยนำเซลล์หนังกำพร้าที่แยกโดยวิธี laser capture microdissection มาสกัด DNA การนำ DNA ที่สกัดได้มาเติมสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) แต่จะไม่เปลี่ยน methylcytosine (^mC) นำ bisulfite treated DNA มา amplify โดยใช้ primer 2 คู่ ที่จำเพาะกับ methylated และ non-methylated DNA และ คัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วย คนปกติ และ cell line อย่างละ 1 รายมาทำการ cloning and sequencing เพื่อประเมินผลการศึกษาโดยวิธี MSP

- ศึกษาการแสดงออกของยีน ID4 โดยวัดระดับ mRNA โดยวิธี real-time RT-PCR

โดยสกัด total RNA จาก human cell lines ชนิดต่างๆโดยใช้ silica-based column จากนั้นสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยขบวนการ reverse-transcription และวัดปริมาณ cDNA ของยีนที่สนใจโดยวิธี real-time reverse polymerase chain reaction โดยใช้ hybridization probe

- ศึกษาการแสดงออกของยีน ID4 ระดับโปรตีนโดยวิธี immunohistochemistry

โดยนำชิ้นเนื้อบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านม ผู้ป่วย squamous cell carcinoma of skin ผู้ป่วยเรื้อรังผิวหนังแพ้ชนิดเรื้อรัง ผิวน้ำของคอกปกติ และ human cell lines มาทำการย้อม immunohistochemistry โดยใช้ anti-ID4 antibody เพื่อดูการแสดงออกของ ID4 protein ที่ชั้นต่างๆของผิวหนังกำพร้า

- การศึกษายีน BCAP31

- ศึกษาภาวะ DNA methylation ของยีน BCAP31 บริเวณ promoter

โดยเริ่มศึกษาระดับ DNA methylation ของยีน BCAP31 บริเวณ promoter ใน human cell lines ทั้งหมด 11 cell lines และ PBMC จากผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมและคอกปกติ กลุ่มละ 10 ราย

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเติมสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) แต่จะไม่เปลี่ยน methylcytosine (^mC) นำ bisulfite treated DNA มาทำการ cloning and sequencing ตัวอย่างละ 10 โคลน และทำการวิเคราะห์ CpG บนโปรโมเตอร์ของยีน ที่ตำแหน่ง 36,167 ถึง 37,432 ของฐานข้อมูล U52111.3 ซึ่งมีทั้งสิ้น 48 ตำแหน่ง

- ศึกษาการแสดงออกของยีน BCAP31 โดยวัดระดับ mRNA โดยวิธี real-time RT-PCR

โดยสกัด total RNA โดยใช้ silica-based column จากนั้นสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยขบวนการ reverse-transcription และวัดปริมาณ cDNA ของยีนที่สนใจโดยวิธี real-time reverse polymerase chain reaction โดยใช้ hybridization probe ซึ่งทำการศึกษาใน human cell lines ชนิดต่างๆ และ PBMC จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ กลุ่มละ 10 ราย

การศึกษาระดับซีรัม IL-22 ก่อนและหลังการรักษาโดยยาเมโทรเทกเซต

โดยการเก็บ clot blood จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และคนปกติ จำนวน 5 cc นำมาปั่นแยกซีรัม เก็บไว้ที่ -20 องศา สำหรับผู้ป่วยภายหลังจากการรักษาโดยยาเมโทรเทกเซต สัปดาห์ละ 15 mg นาน 12 สัปดาห์ จะทำการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรัมอีกครั้ง จากนั้นนำซีรัมที่ได้มาวัดระดับ IL-22 โดยวิธี ELISA โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

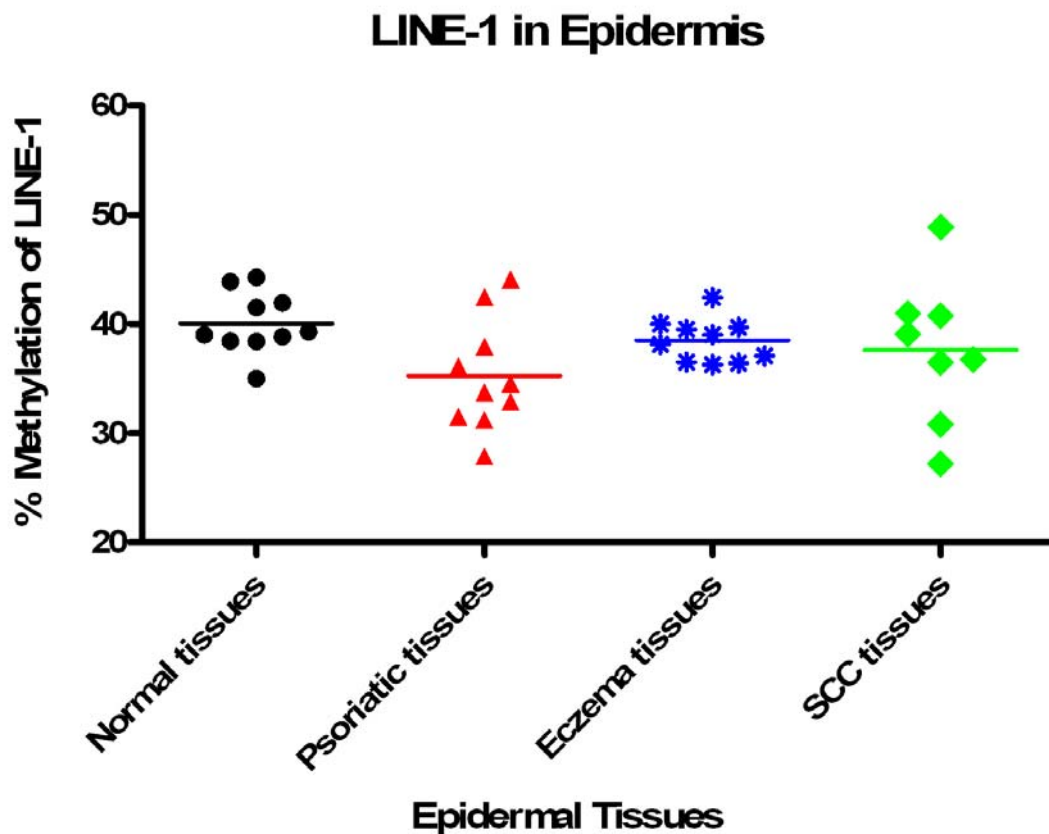
การสรุปข้อมูลใช้ mean±SD, median, interquartile range และ proportion การทดสอบสมมติฐานของการศึกษาใช้ Wilcoxon signed rank test การทดสอบความแตกต่าง [Test of difference] ใช้ Mann-Whitney test และ Kruskal-Wallis test ทดสอบ correlation ใช้ Spearman correlation วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16 และจะถือว่ามีความสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $\alpha=0.05$

ผลการทดลอง

1. การศึกษา Genome-wide DNA methylation โดยใช้ repetitive sequences

ผลการศึกษาวัดระดับ LINE-1 DNA methylation โดยวิธี COBRA ทำการศึกษาโดยแยกเซลล์หนังกำพร้าของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน 10 ราย โรคผื่นแพ้ชนิด chronic eczema 10 ราย โรคมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma of skin 8 ราย และผิวหนังคนปกติ 10 ราย พบว่าระดับ LINE-1 DNA methylation ของเซลล์หนังกำพร้าของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ต่ำกว่าเซลล์หนังกำพร้าของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.017$, % LINE-1 methylation psoriasis vs. normal skin = 35.24 ± 5.07 VS. 40.07 ± 2.84) (Figure 1)

Figure 1



เมื่อทำการศึกษา ระดับ LINE-1 DNA methylation โดยวิธี COBRA ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (total leukocyte) จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินจำนวน 40 ราย เทียบกับคนปกติ จำนวน 20 ราย พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีระดับ LINE-1 DNA methylation ต่ำกว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.002$, % LINE-1 methylation psoriasis vs. healthy subjects = 41.96 VS. 46.35) และเมื่อแยกผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินตามระดับความรุนแรงของโรค โดยอาศัย PASI score โดยกลุ่มที่มีความรุนแรงของโรคมักจะมี PASI score ≥ 15 ซึ่งมีจำนวน 20 ราย และกลุ่มที่มีความรุนแรงของโรคน้อยจะมี PASI score < 15 ซึ่งมีจำนวน 20 ราย พบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยของ LINE-1 DNA methylation ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยของระดับ LINE-1 DNA methylation ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมักมีแนวโน้มต่ำกว่าผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคน้อย ค่าเฉลี่ยของระดับ LINE-1 DNA methylation ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคมักเท่ากับ 41.14 ± 4.71 และค่าเฉลี่ยของ LINE-1 DNA methylation ในผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคน้อยเท่ากับ 42.78 ± 4.60 พบว่าผู้ป่วยทั้งสองกลุ่มที่มีความรุนแรงของโรคมักและน้อยมีระดับ LINE-1 DNA methylation ต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.036$ และ $p=0.003$ ตามลำดับ) (Figure 2)

Figure 2

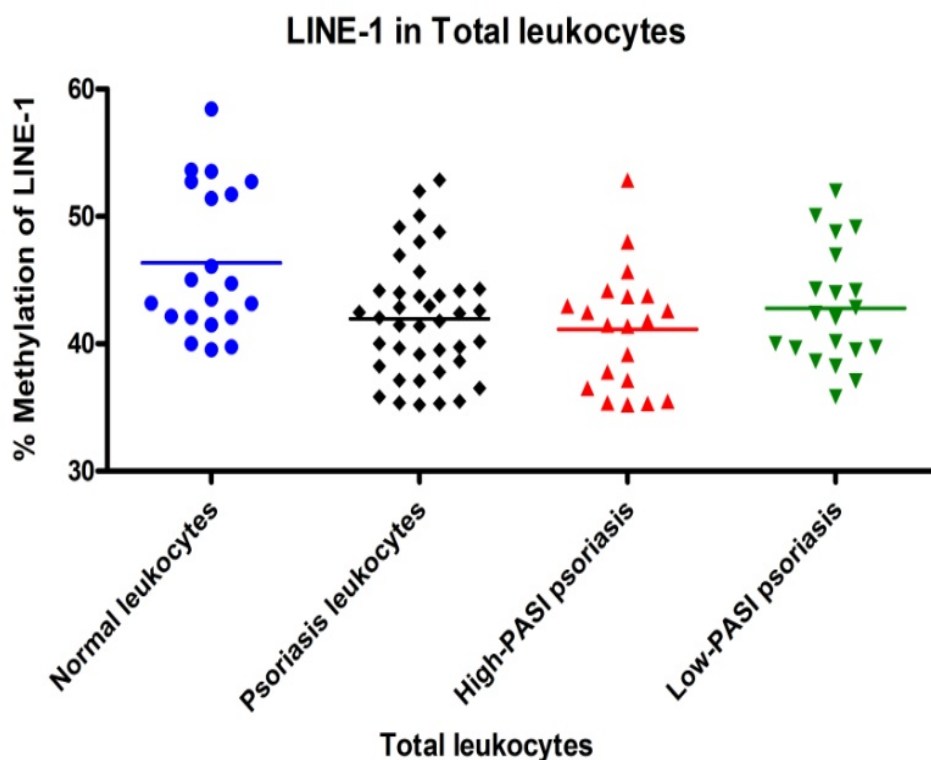


Figure 2

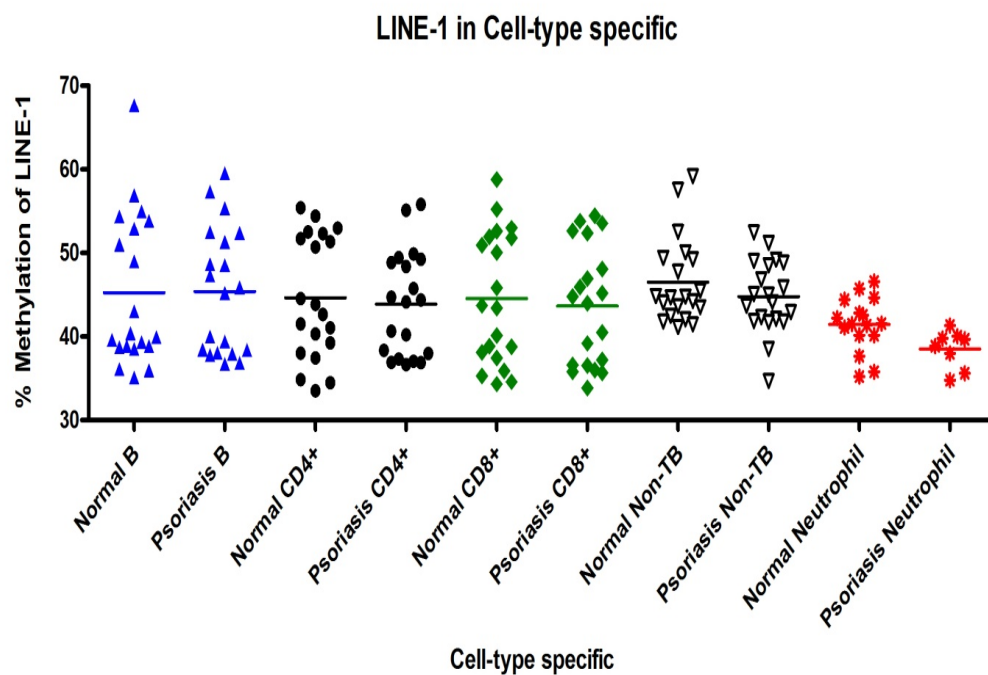
% Methylation of high PASI score (severe psoriasis) compared to normal total leukocytes: P-value = 0.003

% Methylation of high PASI score (severe psoriasis) compared to low PASI score (mild psoriasis) total leukocytes: P-value = 0.273

% Methylation of low PASI score (mild psoriasis) compared to normal total leukocytes: P-value = 0.036

เพื่อศึกษาชนิดของเซลล์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ LINE-1 methylation ผู้วิจัยจึงนำเซลล์เม็ดเลือดขาวจากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติกลุ่มละ 10 รายมาทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวออกเป็นชนิดต่างๆคือ T cell, Bcell, Non-T,Non-B cell และ neutrophil พบว่า neutrophil จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีระดับ LINE-1 methylation ต่ำกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.019$) ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ(Figure 3)

Figure 3



2. การศึกษายีน ID4

a. ศึกษาระดับ ID4 promoter methylation ใน cell lines, PBMC

เริ่มจากการศึกษา promoter ID4 methylation ใน cell lines ต่างๆพบว่าใน กลุ่ม Hematopoietic cell lines เช่น Jurket, Daudi, Molt4 มี ID4 promoter เป็น methylated DNA ขณะที่ HL-60 และ K562 เป็น mixed DNA PBMC เป็น unmethylated DNA แต่ในกลุ่ม Epithelial cell lines เช่น Hela, Hep2, HepG2, Caski, SiHA, HaCAT, RKO เป็น methylated DNA ส่วน SW480 เป็น Mixed DNA และ UACC903 เป็น unmethylated DNA (Figure 1)

b. ศึกษาการแสดงออกของ ID4 mRNA ใน human cell lines

โดยนำ human cell lines ต่างๆมาหาระดับ ID4 mRNA โดยวิธี real-time RT-PCR พบว่ามีเพียง HaCaT และ SW480 ที่มีการแสดงออกของ ID4 mRNA ซึ่งสัมพันธ์แบบผกผันกับการเกิด methylation ของ ID4 promoter (Table1)

Figure 1

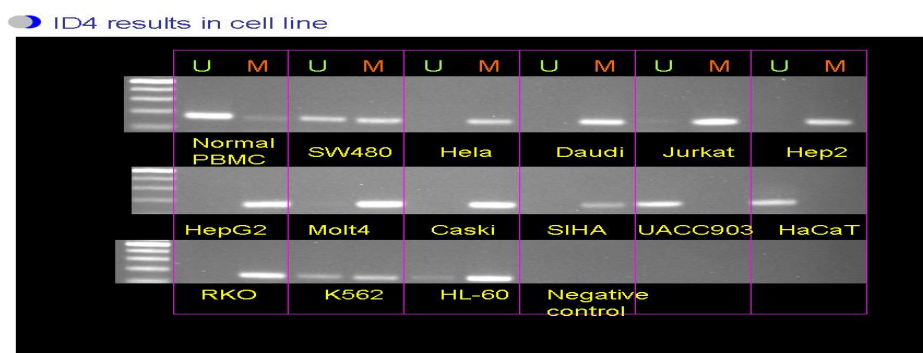


Table 1 Inverse correlation of ID4 promoter status and mRNA level of 11 Cell lines

Epithelial cell lines		
HEp2	Methylated promoter	0
Hela	Methylated promoter	0
RKO	Methylated promoter	0
HaCaT	Unmethylated promoter	19.4
SW480	Met/Unmet promoter	0.14
SiHA	Methylated promoter	0
Hematopoietic cell lines		
Daudi	Methylated promoter	0
Jurkat	Methylated promoter	0
Molt4	Methylated promoter	0
HL-60	Methylated promoter	0
K562	Met/Unmet promoter	0

Table 1. Levels of *ID4* mRNA expression in epithelial and hematopoietic cell lines analyzed by Real time RT-PCR. GAPDH was used as a control. The expression levels are presented as *ID4* copy number/*GAPDH* copy number. Names of all cell lines are listed for each row.

b. ศึกษา promoter ID4 methylation ใน PBMC และ ชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยโรคมะเร็ง

ศึกษาระดับ DNA methylation ของ ยีน ID4 ใน PBMC จากตัวอย่างกลุ่ม healthy จำนวน 7 ราย และผู้ป่วยโรคมะเร็ง จำนวน 20 ราย ผลที่ได้คือ พบการเกิด DNA methylation ในกลุ่ม healthy 5/7 ราย คิดเป็นร้อยละ 71.4 และ จากผู้ป่วย 14/20 ราย คิดเป็นร้อยละ 70.0 ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (Figure 2)

จากนั้นจึงทำการศึกษา promoter ID4 methylation ในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยโรคมะเร็ง เทียบกับ โรคมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma of skin และผิวหนังจากคนปกติ โดยเริ่มศึกษาในผิวหนังโรคมะเร็งก่อน พบว่ามี non-methylated bands เกิดขึ้นอย่างเดียวในผิวหนังจากคนปกติทั้งหมด จำนวน 6 ราย แต่ในผู้ป่วยโรคมะเร็งจะพบทั้ง non-methylated bands และ methylated bands 6 รายจาก 9 ราย มีระดับ ID4 promoter methylation = 34.81% เมื่อศึกษาใน squamous cell

carcinoma of skin จำนวน 7 รายพบว่า ผู้ป่วย squamous cell carcinoma of skin จะพบทั้ง non-methylated bands และ methylated bands 3 รายจาก 7 ราย มีระดับ ID4 promoter methylation = 21.84% (Figure 3A) เมื่อคำนวณทางสถิติพบว่าผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและ ผู้ป่วยโรค squamous cell carcinoma of skin มีการเพิ่มขึ้นของระดับ ID4 promoter DNA methylation อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (Figure 3B) จากนั้นได้นำ sample ที่มีเฉพาะ non-methylated bands และมีทั้ง non-methylated bands และ methylated bands มาทำ bisulfite cloning and sequencing เพื่อ validate ผลของ MSP พบว่า ผลของ bisulfite cloning and sequencing เป็นไปในทางเดียวกับ MSP (Figure 3C)

Figure 2

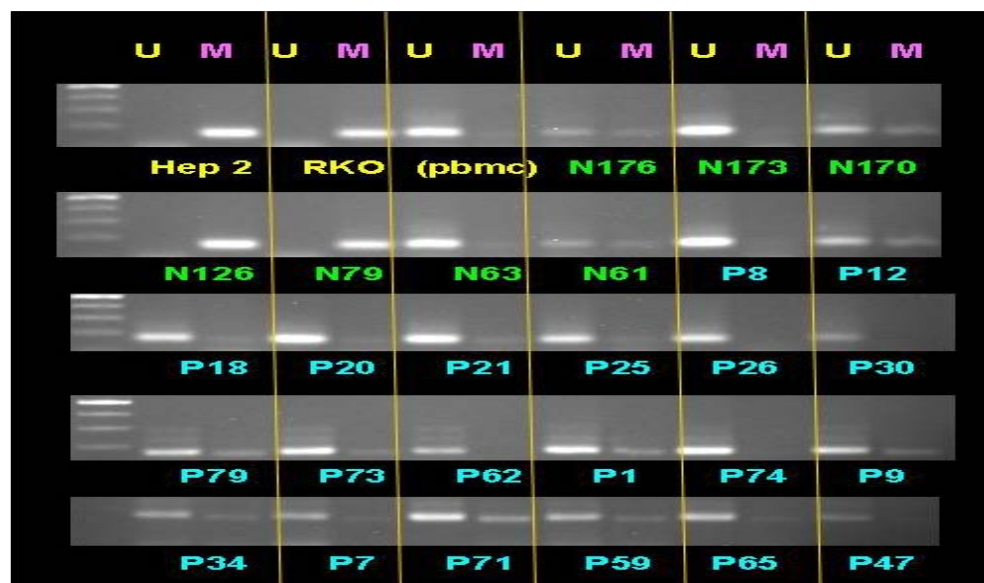
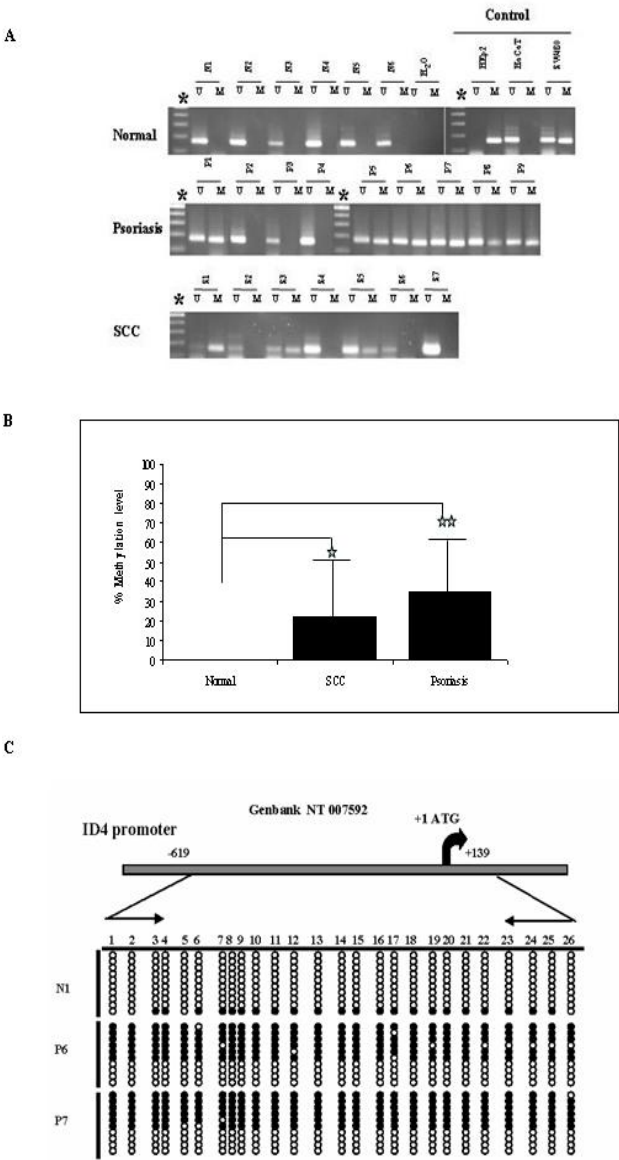


Figure 3



c. ศึกษา การแสดงออกของ ID4 protein ในชั้นเนื้อจากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

ศึกษาการแสดงออกของ ID4 protein โดยวิธี immunohistochemistry ในชั้นเนื้อจากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (n=9), เทียบกับโรคผิวหนังอื่น ได้แก่ โรคมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma of skin(n=7) , โรค chronic eczema (n=7) และผิวหนังจากคนปกติ (n=6) พบว่าเซลล์ผิวหนังกำพวดส่วนบนบริเวณที่เกิด parakeratosis ในโรคต่างๆ จะไม่มีการแสดงออกของ ID4 protein (Figure 4)

Figure 4

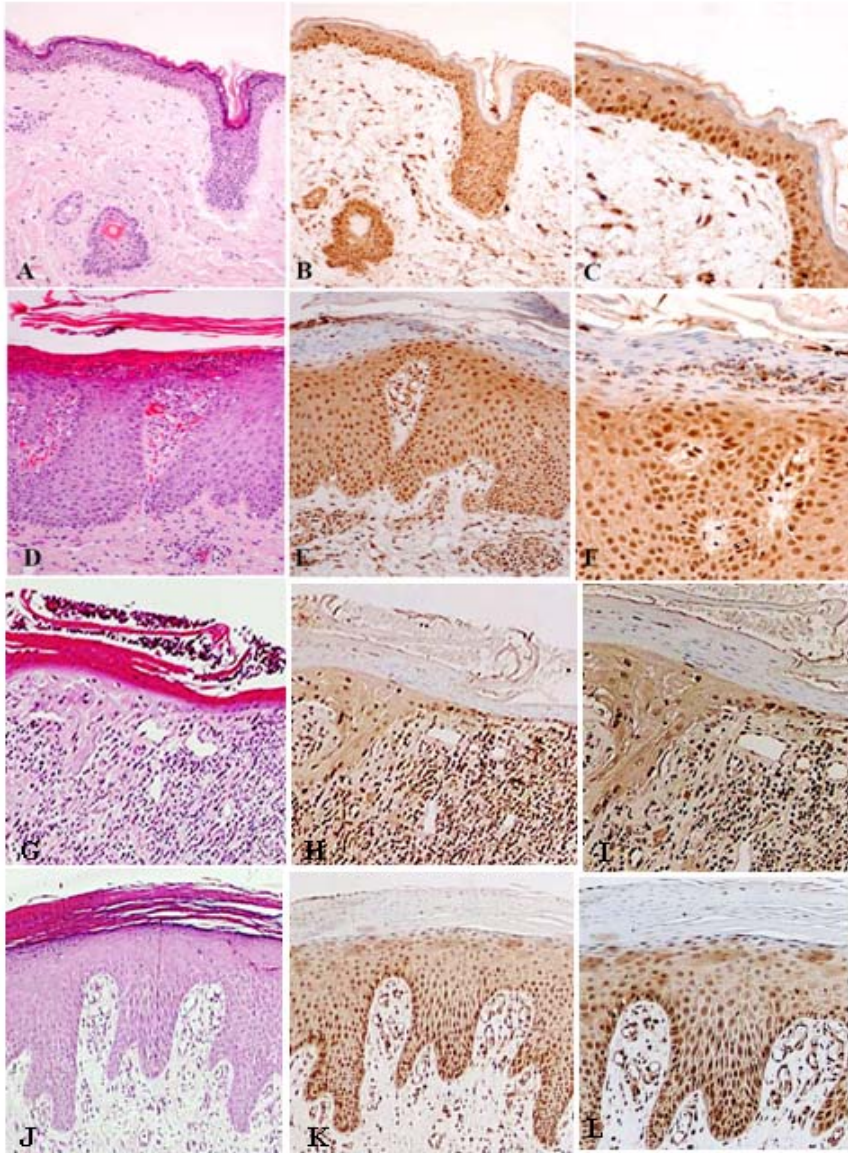


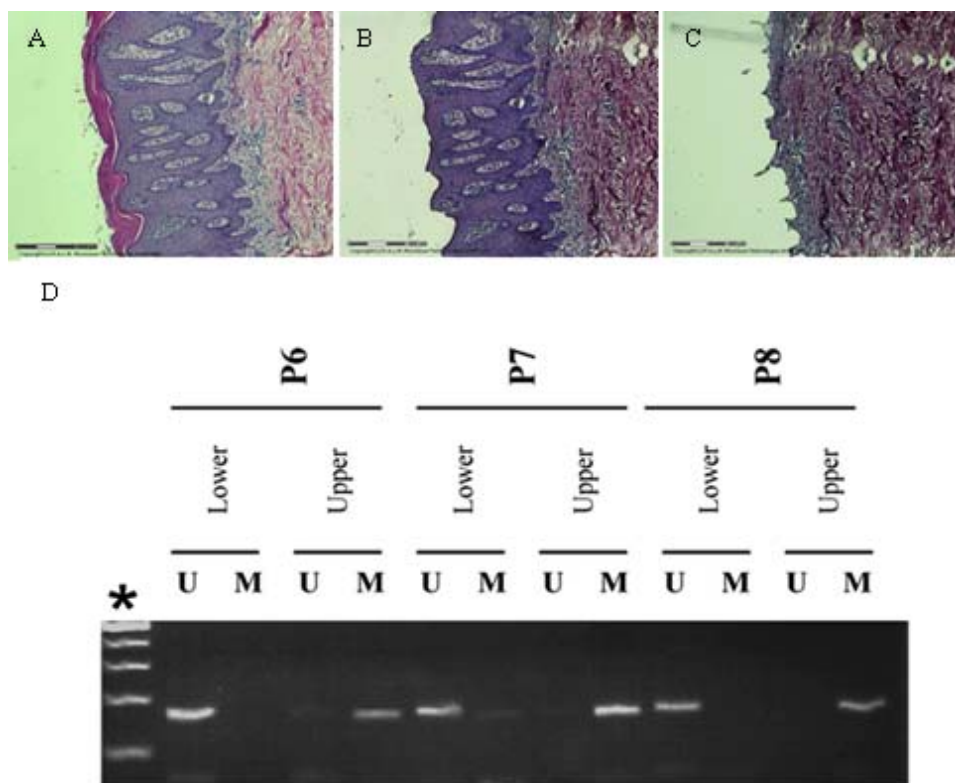
Figure 4 immunohistochemistry ของ ID4 (A-C) ผิวหนังคนปกติ (D-F) ผื่นโรคสะเก็ดเงิน (G-I) ผื่นโรคมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma of skin และ (J-L) ผื่นโรค chronic eczema

d. เปรียบเทียบระดับ ID4 promoter

methylationระหว่างเซลล์ผิวหนังชั้นล่างและชั้นบน

โดยแยกเซลล์ผิวหนังชั้นบนและชั้นล่างออกจากกันโดยวิธี laser capture microdissection แยกเอา neutrophil ที่แทรกในชั้นหนังกำพร้าส่วนบนออกเพื่อให้ได้เฉพาะ keratinocyte จากนั้นนำมาสกัด DNA ทำ bisulfite treatment และศึกษาระดับ ID4 promoter methylation โดยวิธี MSP technique ศึกษาในผู้ป่วย 3 รายพบว่า ตรวจพบเฉพาะ methylated band ใน keratinocyte จากผิวหนังกำพร้าชั้นบน (ระดับ DNA methylation =100%)(Figure 5)

Figure 5



e. ศึกษา การแสดงออกของ ID4 protein เปรียบเทียบ human cell line ที่เป็น non-methylated ID4 promoter และ human cell line ที่เป็น methylated ID4 promoter พบว่า human cell line ที่เป็น non-methylated ID4 promoter (HaCaT) จะมีการแสดงออกของ ID4 protein แตกต่างจาก human cell line ที่เป็น methylated ID4 promoter (HEp2) จะไม่มีการแสดงออกของ ID4 protein (Figure 6)

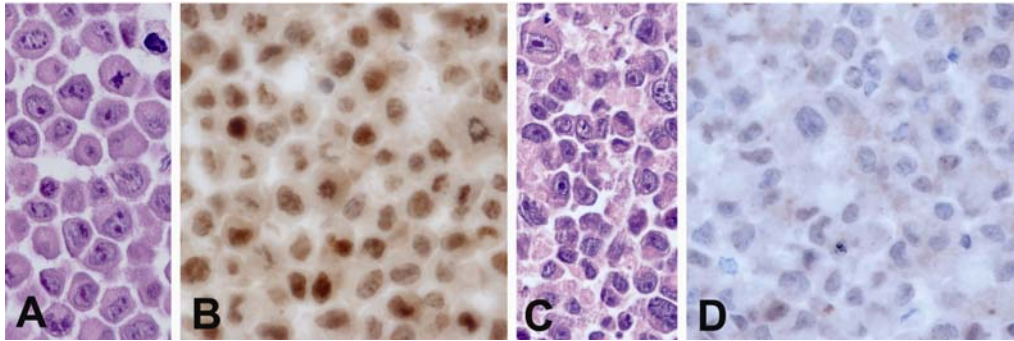


Figure 6

Immunohistochemical detection of ID4 in cell lines using a polyclonal antibody to ID4. (A-B) HaCaT cell line and (C-D) HEp2 cell line. A and C show the light microscopic appearance of the cell lines (hematoxylin and eosin, x600). HaCaT displays dense nuclear staining of ID4 (Bx600) whereas HEp2 lacks staining for ID4 (Dx600).

3. การศึกษายีน BCAP31

สำหรับ BCAP31 ได้ทำการศึกษาภาวะ DNA methylation โดยทำการศึกษาใน human cell lines ทั้งหมด 11 cell lines และทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมและคนปกติกลุ่มละ 10 ราย โดยศึกษาใน PBMC โดยวิธีการ bisulfite treatment, cloning and sequencing รายละเอียด 10 โคลน และทำการวิเคราะห์ CpG บนโปรโมเตอร์ของยีน ที่ตำแหน่ง 36,167 ถึง 37,432 ของฐานข้อมูล U52111.3 ซึ่งมีทั้งสิ้น 48 ตำแหน่ง Figure 1 แสดงผล bisulfite treatment, cloning and sequencing แต่ละราย วงกลมสีขาวแสดงถึงตำแหน่งที่เป็น Unmethylation วงกลมสีดำแสดงถึงตำแหน่งที่เป็น Methylation และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับ DNA methylation ของแต่ละตำแหน่ง ทั้งหมด 48 ตำแหน่ง ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมและคนปกติ พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมมีระดับ DNA methylation ของยีน BCAP31 สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (6.844 ± 0.4365 VS. 0.5563 ± 0.04395 $p < 0.0001$) (Figure 2)

Figure 1

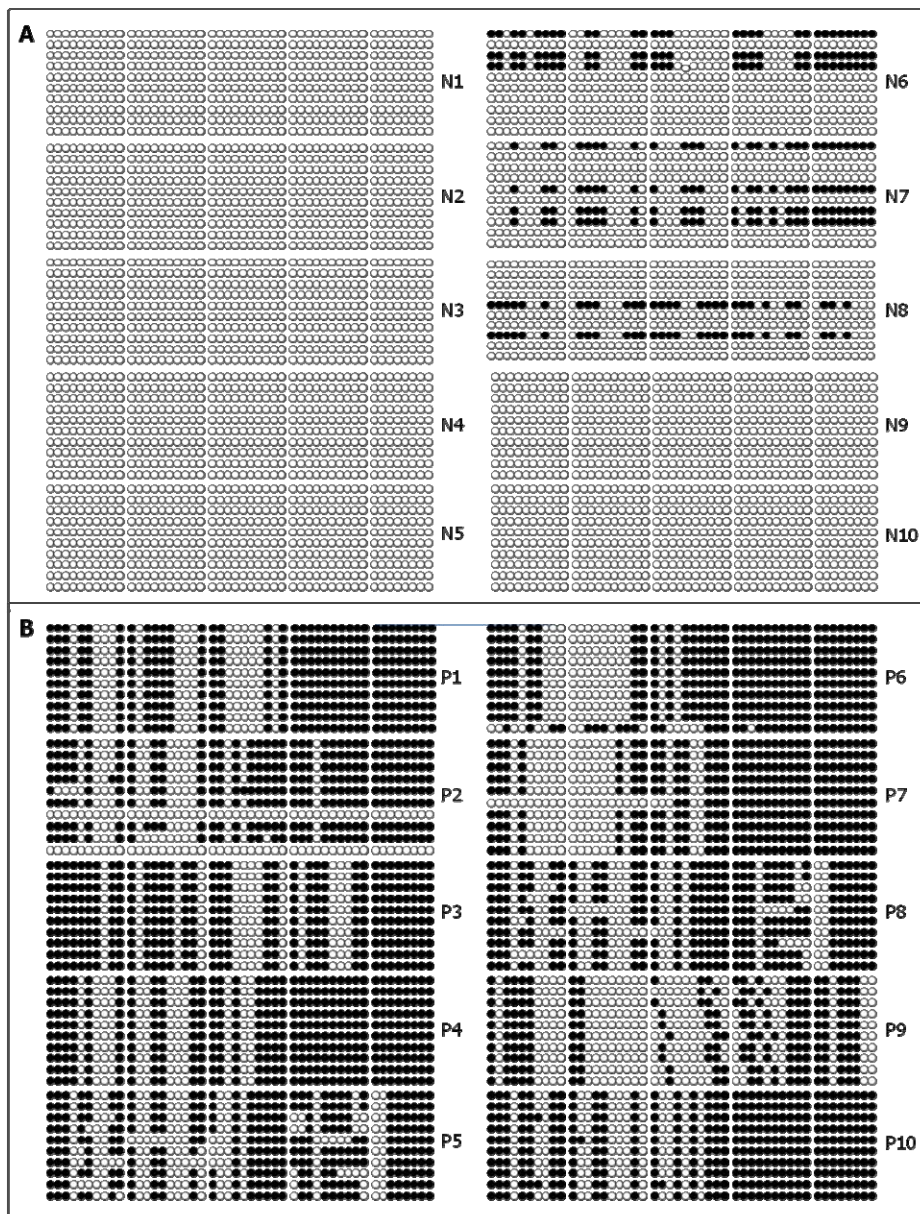
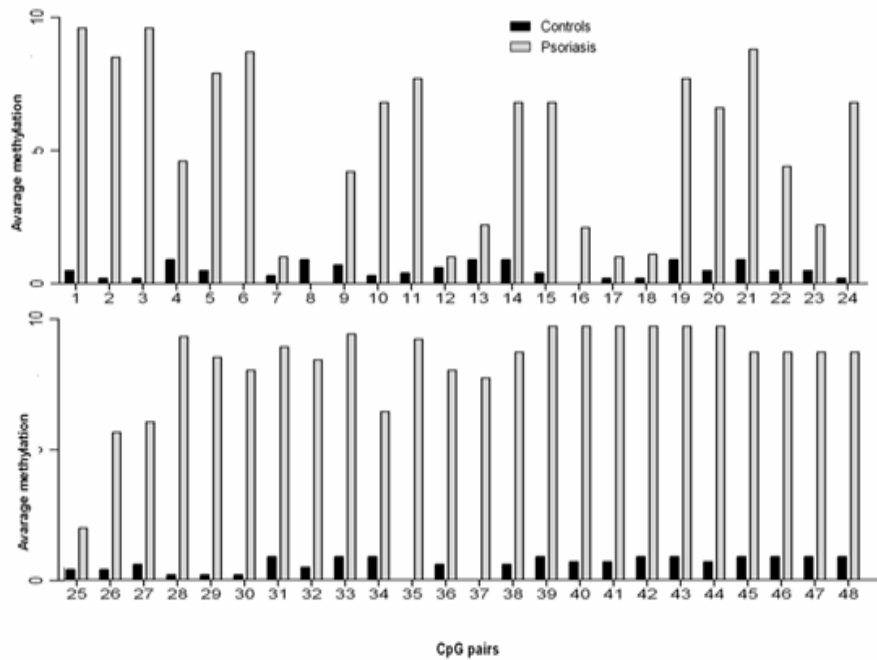


Figure 1 แสดงตัวอย่างผล bisulfite treatment, cloning and sequencing แต่ละราย Fig 1A แสดงผล methylation ของคนปกติ 10 ราย รายละ 10 โคลน Fig 1B แสดงผล methylation ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน 10 ราย รายละ 10 โคลน วงกลมสีขาวแสดงถึงตำแหน่งที่เป็น Unmethylation วงกลมสีดำแสดงถึงตำแหน่งที่เป็น Methylation

Figure 2

A



B

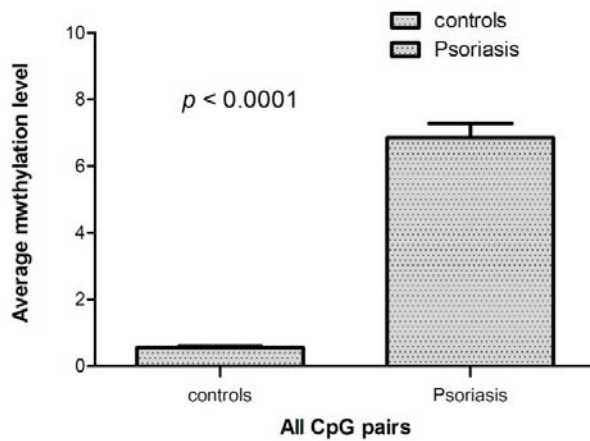


Figure 2 (A) แสดงค่าเฉลี่ยระดับ DNA methylation ของ CpG แต่ละตำแหน่งทั้งหมด 48 ตำแหน่ง เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ (B) แสดงค่าเฉลี่ยระดับ DNA methylation ของ CpG ทั้งหมด 48 ตำแหน่ง เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ พบว่าผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีระดับ DNA methylation ของยีน BCAP31 สูงกว่าคนปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับ mRNA ของยีน BCAP31 โดยวิธี real-time RT PCR และ normalized ด้วยยีน 18 S โดยศึกษาใน human cell lines ทั้งหมด 11 cell lines พบว่าเฉพาะ HaCaT cell line ที่มีการแสดงของ BCAP31 mRNA สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ human cell lines อื่น และระดับการแสดงออกของ BCAP31 mRNA มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับ DNA methylation (Figure 3)

Figure 3

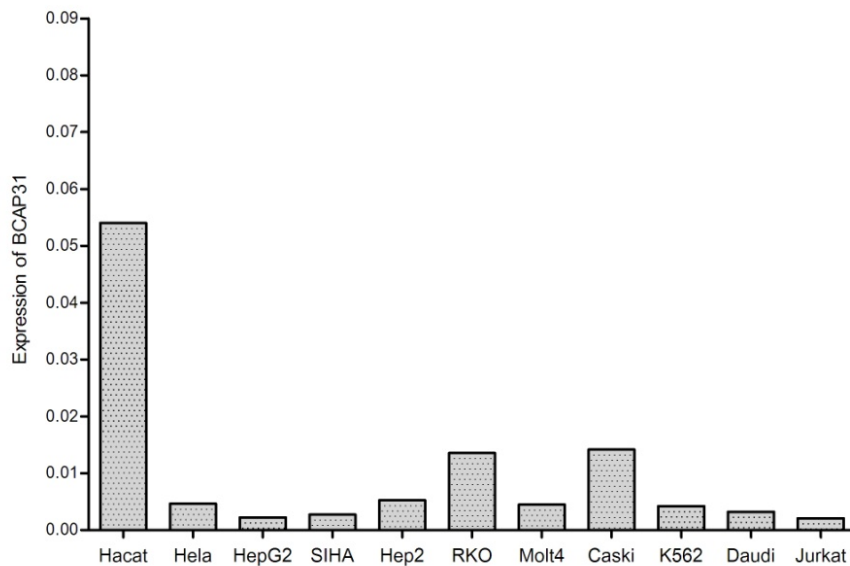
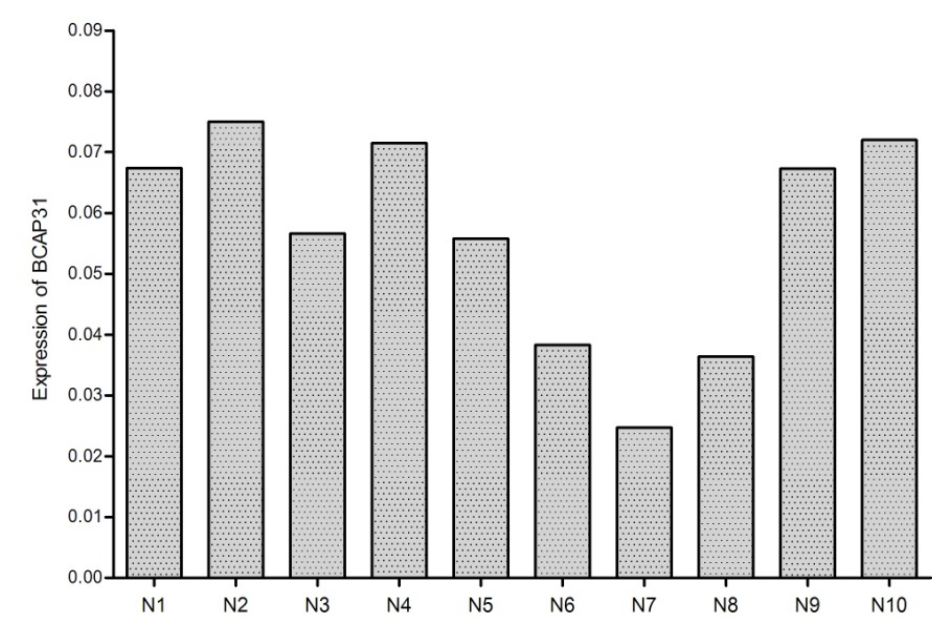


Figure 3 แสดงระดับ mRNA ของยีน BCAP31 โดยวิธี real-time RT PCR และ normalized ด้วยยีน 18 S ของ human cell lines ทั้งหมด 11 cell lines

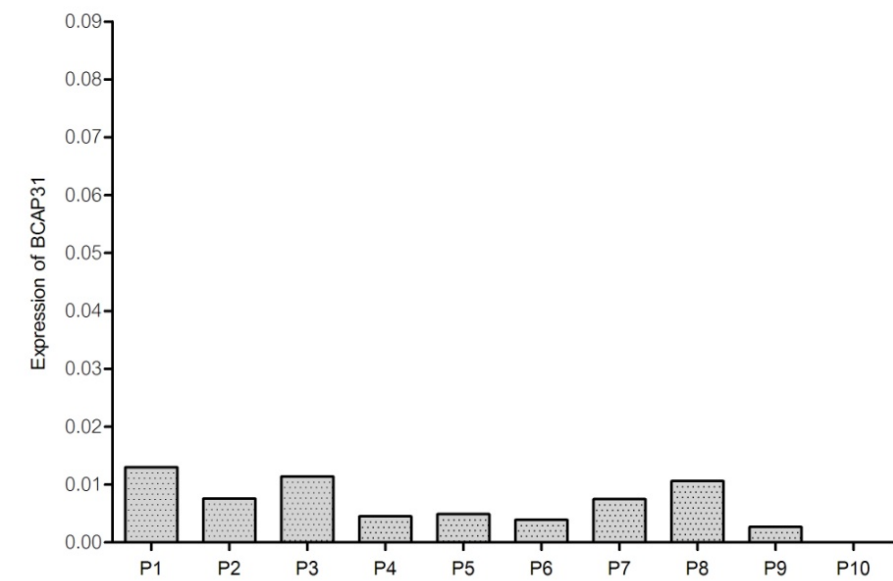
และเมื่อทำการศึกษาระดับ mRNA ของยีน BCAP31 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมและคนปกติซึ่งได้ทำการศึกษาระดับ DNA methylation แล้ว พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมมีระดับการแสดงออกของ BCAP31 mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ (0.0565 ± 0.00550 VS. 0.0661 ± 0.0013 $p < 0.0001$) (Figure 4)

Figure 4

A



B



C

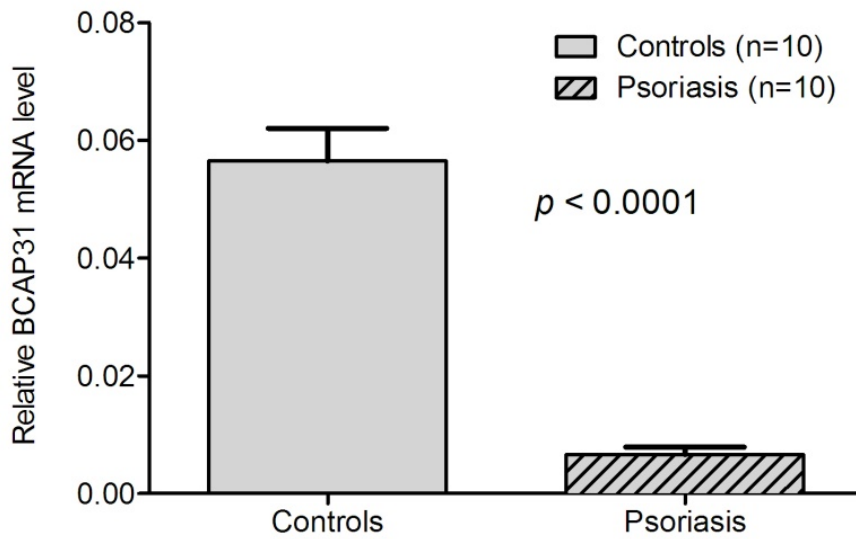


Figure 4 (A) แสดงระดับ BCAP31 mRNA ของคนปกติแต่ละราย (B) แสดงระดับ BCAP31 mRNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินแต่ละราย (C) แสดงค่าเฉลี่ย BCAP31 mRNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เทียบกับคนปกติ พบว่าผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีระดับการแสดงออกของ BCAP31 mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ

4. การศึกษาระดับซีรั่ม IL-22 ก่อนและหลังการรักษาโดยเมตโทรเทกเซต

a. Demographic data

การศึกษานี้ทำในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินทั้งสิ้น 19 คน เป็นชาย 14 คน หญิง 5 คน อายุเฉลี่ย 44.16 ± 9.7 ปี ระยะเวลาที่เป็นโรคสะเก็ดเงินประมาณ 6 ปี พบว่าระดับ PASI score ในเพศชาย มีแนวโน้มสูงกว่าเพศหญิงแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้ป่วยชายทั้งสิ้น 8 คน เคยได้รับการรักษาด้วย systemic treatment มาแล้วและส่วนใหญ่ได้รับยา Methotrexate ซึ่งผู้ป่วย 7 คนตอบสนองดีต่อยาดังกล่าว ผู้ป่วย 1 มีประวัติไม่ตอบสนองต่อยา Methotrexate แต่ตอบสนองดีต่อการรักษาด้วย PUVA และ Acitretin ผู้ป่วยหญิงทั้งหมดไม่ประวัติได้รับการรักษาด้วย systemic treatment มาก่อนการศึกษา ระดับ BMI ของผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ปกติโดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 23 ข้อมูลพื้นฐานทั้งหมดของผู้ป่วยปสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลพื้นฐานทั่วไปของผู้ป่วย (demographic data)

	Male (N=14)	Female (N=5)
Age (yr)	44.21±10.7	44±6
Disease duration (yr)	10±9	6±6
PASI baseline	22±11	14±3
BMI	23±4.3	23.09±3.1
Previous systemic treatment	8 (57.14%)	0

1. Serum levels of IL-22 were significantly reduced after treatment with MTX

สามารถตรวจพบซีรัม IL-22 พบได้ในกลุ่มตัวอย่าง 17 คน (89.47%) และกลุ่มควบคุม 13 คน (68.42%) ค่ากลาง [Median] ของระดับ IL-22 ของผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 30.1 และ 9.15 pg/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 2) โดยที่ระดับ IL-22 ก่อนการรักษาของกลุ่มผู้ป่วยมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (56.63 ± 60.73 pg/ml vs. 12.58 ± 12.59 pg/ml, $p < 0.001$) (Fig 1A). กลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะโรครุนแรง (ค่า PASI score >15) จะมีระดับซีรัม IL-22 สูงกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีภาวะโรคปานกลาง (ค่า PASI score =10-15) อย่างมีนัยสำคัญ (92.81 ± 64.47 pg/ml vs. 16.43 ± 12.88 pg/ml, $p = 0.001$) (Fig 1B). และระดับซีรัม IL-22 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการรักษาด้วยยา Methotrexate (5.98 ± 4.69 vs. 20.09 ± 10.58 , $p < 0.001$) (Fig 1A).

นอกจากนี้ยังได้ทำการวัดระดับซีรัม IL-17 ซีรัม IL-17 สามารถตรวจพบได้ในกลุ่มผู้ป่วย 2 คน (10.53%) จาก 19 คน แต่ตรวจไม่พบในกลุ่มควบคุม และระดับซีรัม IL-17 ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มผู้ป่วยและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.142$) หลังการรักษาไม่พบไซโตไคน์ดังกล่าวในซีรัมผู้ป่วย

ตารางที่ 2 แสดงระดับชี้รั้ม IL-22 และ PASI score ก่อนและหลังการรักษา

	Mean	Md	IQ	p-value
PASI-score				
Before	20.09	15.4	12.5-28.4	
After	5.98	5	2.1-11.1	<0.001*
IL-22				
Before	56.63	30.1	11.39-113.92	
After	9.33	2.41	0-21.12	<0.001*
IL-22 control	12.58	9.15	0-25.42	

p-value เทียบระหว่างก่อนและหลังการรักษา

Figure1

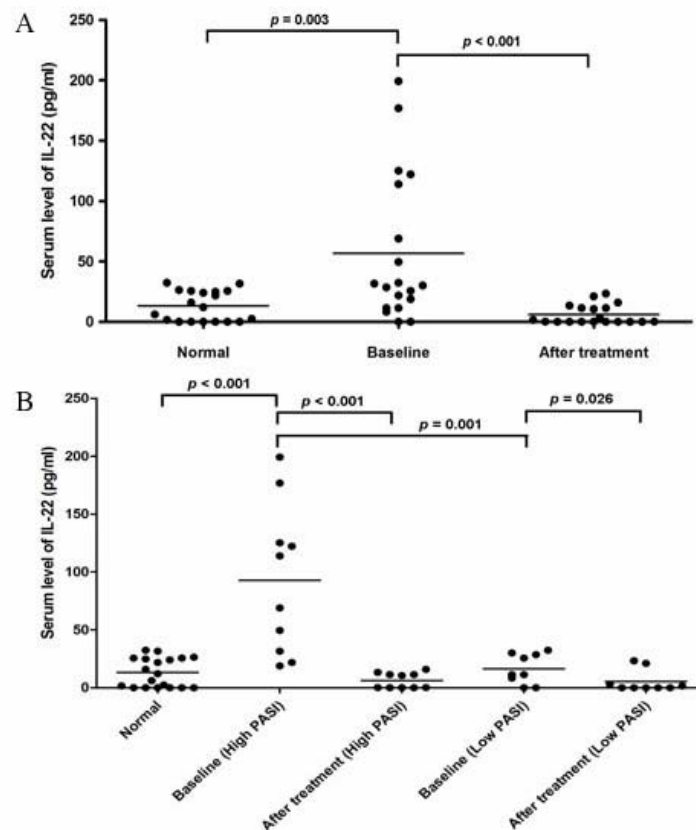


Figure 1 IL-22 serum level in healthy controls and in psoriasis patients at baseline and after treatment. Each dot represents the IL-22 serum level of a sample. Horizontal bars represent the mean. (A) Comparison between controls and psoriasis patients, at baseline and after treatment. (B) Comparison between psoriasis patients divided into high and low PASI groups, at baseline and after treatment.

2. Correlation between IL-22 serum level and PASI score

ค่า PASI score และระดับซีรัม IL-22 ก่อนและหลังการรักษาแสดงไว้ในตารางที่ 3 พบว่าระดับซีรัม IL-22 ก่อนการรักษามีความสัมพันธ์กับ PASI score ระดับปานกลาง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [$r=0.63$, $p=0.004$, $R\text{-square}=0.21$] (Fig 2A). และเมื่อแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่มตามระดับซีรัม IL-22 ก่อนการรักษาคือเป็น กลุ่มที่มีระดับซีรัม IL-22 สูง ($IL\text{-}22 > 50 \text{ pg/ml}$) ($n=6$) และกลุ่มที่มีระดับซีรัม IL-22 ต่ำ ($IL\text{-}22 \leq 50 \text{ pg/ml}$) ($n=13$) พบว่ากลุ่มที่มีระดับซีรัม IL-22

สูงจะมีค่าเฉลี่ยของ PASI score ที่ลดลงหลังการรักษามากกว่า กลุ่มที่มีระดับซีรัม IL-22 ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (22.92 ± 10.67 vs. 10.05 ± 5.83 , $Z=2.68$, $p=0.007$) (Fig 2B).

Figure 2

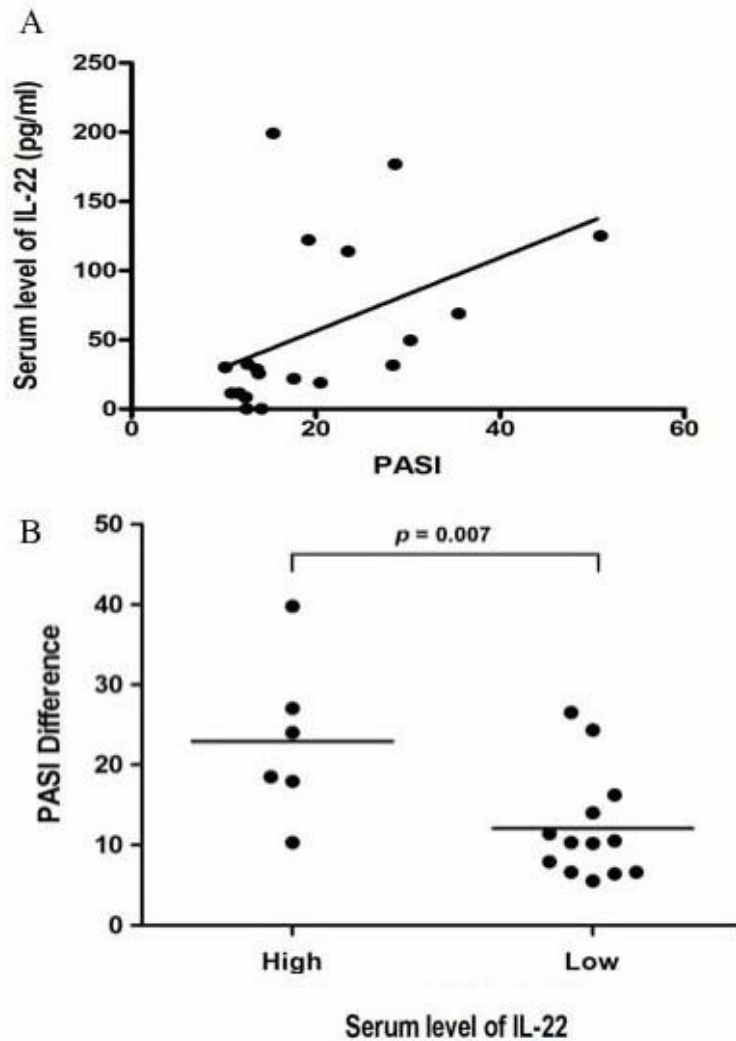


Figure 2 IL-22 serum level and PASI score in psoriasis patients. (A) Correlation between IL-22 serum level and PASI score at baseline ($r=0.63$, $p=0.004$). Each dot represents the IL-22 serum level and PASI score of each patient at baseline. (B) The clinical response to MTX was significant different between the group with high and low IL-22 serum level ($Z=2.68$, $p=0.007$). Each dot represents PASI difference between baseline and after treatment of each patient. Horizontal bars represent the mean of PASI difference. 'High' indicates the high serum level group (IL-22 > 50 pg/ml) ($n=6$) and 'Low' indicates the low serum level group (IL-22 $\leq$ 50 pg/ml) ($n=13$).

บทวิจารณ์

การศึกษา Genome-wide DNA methylation โดยใช้ repetitive sequences

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิด Genome-wide DNA hypomethylation บริเวณ repetitive sequences เป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญในการเกิดโรคมะเร็งชนิดต่างๆ (12) ระยะหลังเริ่มมีรายงานว่า ภาวะ Genome-wide DNA hypomethylation เป็นกลไกที่สำคัญในการเกิดโรคลกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเอง เช่น SLE, inflammatory arthritis (13) (14)(15) (16) การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาแรกที่พบว่ามีการเกิด Genome-wide DNA hypomethylation บริเวณ LINE-1 ซึ่งเป็น repetitive sequences ของเซลล์หนังกำพร้าและเม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินซึ่งเป็นโรคภูมิคุ้มกันต้านทานเนื้อเยื่อตนเอง อย่างไรก็ตามมีรายงานก่อนหน้านี้โดย Zhang P รายงานว่าพบ Genome-wide DNA hypermethylation ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMC ในโรคสะเก็ดเงิน และเซลล์ผิวหนังของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (17) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่า ผลที่แตกต่างอาจเนื่องมาจากการศึกษาระดับ Genome-wide DNA methylation ต่างกัน การศึกษาของ Zhang P ใช้ methylamp Global DNA methylation quantification kit สำหรับการวัดระดับ Genome-wide DNA methylation ของเซลล์เม็ดเลือดขาว และใช้วิธี immunohistochemistry with anti-5 methylcytosine antibody สำหรับเซลล์ผิวหนัง ในขณะที่การศึกษาในครั้งนี้วัดระดับ Genome-wide DNA methylation โดยศึกษาการเกิด methylation บริเวณ repetitive sequences คือ LINE-1 ซึ่งเป็นวิธีที่มีรายงานการศึกษาแล้วหลายรายงานในโรคมะเร็งหลายชนิดและพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับพยากรณ์การเกิดของโรคมะเร็งหลายชนิด

อย่างไรก็ตามยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบถึงกลไกการเกิด LINE-1 methylation รวมถึงผลของยีนที่มี LINE-1 แทรกหรือควบคุมอยู่เพื่อศึกษาผลของการเกิด LINE-1 methylation ในโรคสะเก็ดเงินต่อไป การศึกษาในครั้งนี้จึงนับว่ามีความสำคัญในการบ่งชี้ความรู้ใหม่ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และอาจนำไปสู่ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดของ โรคเพิ่มขึ้น และอาจพัฒนาไปสู่การรักษาแบบใหม่ๆต่อไป

การศึกษายีน ID4

parakeratosis เป็นภาวะที่มีการเหลืออยู่ของนิวเคลียสของเซลล์หนังกำพร้าชั้นบน (stratum corneum) ซึ่งก่อให้เกิดสะเก็ดที่ผื่นเมื่อมองด้วยตาเปล่า การเกิด parakeratosis เป็นขบวนการสำคัญในการเกิดโรคทางผิวหนังหลายโรคโดยเฉพาะโรคสะเก็ดเงิน จากการศึกษานี้พบว่า การเกิด parakeratosis เกี่ยวข้องกับการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน ID4 (identification of differentiation4) ใน parakeratotic nucleus เนื่องจากยีน ID4เป็นยีนที่มีรายงานว่ามีความสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์และการพัฒนาเซลล์ (proliferation and differentiation) หลายชนิด (18) (19) และยังสำคัญกับการเกิดโรคหลายโรคโดยเฉพาะโรคมะเร็งต่างๆ (20, 21) การลดลงของการแสดงออกของยีน ID4 จึงน่าจะมีความสำคัญต่อการเติบโตที่ผิดปกติ ของเซลล์หนังกำพร้า และก่อให้เกิด parakeratosis ขึ้นซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการเกิดโรคผิวหนังหลายโรค

การศึกษาในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่ากลไกในการควบคุมการแสดงออกของ ID4 ที่สำคัญคือ DNA methylation คือพบ hypermethylation ของ ID4 promoter สัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของ ID4 mRNA ของ human cell lines ต่างๆ และสัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของโปรตีน ID4 บริเวณที่เกิด parakeratosis

โปรตีน IDs ประกอบด้วยสมาชิกต่างๆคือ ID1, ID2, ID3 และ ID4 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า การทำงานของ ID4 มักจะทำงานตรงข้ามกับ สมาชิกของ IDs (ID1, ID2 และ ID3) เช่น กรณี ID1 มักจะพบมากใน colorectal carcinoma (22) และ gastric cancer (23) แต่ จะพบว่า ID4 ลดลง สำหรับโรคมะเร็งชนิดนั้น มีรายงานถึงการเพิ่มของ ID1 ใน (24) และไม่มีรายงานถึง ID4 มาก่อน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของ ID4 ในโรคมะเร็งชนิดซึ่งสอดคล้องรายงานการศึกษาที่ผ่านมาว่า มีการเพิ่มของ ID1 ในโรคมะเร็งชนิด สำหรับขบวนการทำให้เกิด ID4 promoter methylation ที่สัมพันธ์กับ โรคมะเร็งชนิด

สำหรับกลไกที่ทำให้เกิด ID4 promoter methylation ที่สัมพันธ์กับ โรคมะเร็งชนิด ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่มีรายงานการศึกษาในโรคอื่นอาทิเช่น

การกระตุ้นของ Cdc42 สามารถทำให้เกิดการ เพิ่มของ DNMTs และสามารถ ทำให้เกิด ID4 promoter methylation ใน colorectal carcinoma ได้ (25) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Cdc42ยังสามารถ กระตุ้น Mixed Lineage Kinases3 (MLK3) (26) และ p21 –activated kinase (PAK) (27) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับ การเพิ่มของ phosphorylated p38 โดยที่ phosphorylated p38 มีความสำคัญอย่างมากในโรคมะเร็งชนิด (28)

การศึกษาครั้งนี้ เราพบหลักฐานของการเกิด ID4 promoter methylation ที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด Parakeratosis ซึ่งเป็นขบวนการสำคัญอย่างหนึ่งของโรคผิวหนังโดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคมะเร็งชนิด ผลจากการศึกษาในทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของการเกิดโรค และอาจนำไปสู่การพัฒนาการรักษาโรคโดยวิธีใหม่ๆต่อไป

การศึกษายีน B-cell receptor associated protein 31 (BCAP31)

สำหรับ B-cell receptor associated protein 31 (BCAP31) เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม Xq28 (29) ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติเป็นทรานสเมมเบรนโปรตีน (trans-membrane protein) บนผิวเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) ทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตีนจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมไปยังกอลจิบอดี (golgi body) (30) (31) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดอะพอพโทซิส(apoptosis) โดยผ่านทาง procaspase 8, BCL-2 และ CED4 ซึ่งพบได้ในเซลล์เม็ดเลือดขาว ทั้งชนิด B Lymphocyte และ T Lymphocyte (32) และเซลล์เยื่อบุผนังของโรคซิสติกไฟโบรซิส แต่สำหรับในโรคมะเร็งชนิดนั้นยังไม่พบว่ามีรายงานที่

เกี่ยวข้องกับยีนนี้มาก่อน อย่างไรก็ตาม BCAP31 อาจมีความเกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงินคือ ในโรคสะเก็ดเงินก็พบว่ามีผลผิดปกติของการเกิดกระบวนการอะพอพโทซิสในเซลล์ผิวหนัง และเซลล์ เม็ดเลือดขาวซึ่งอาจเกิดจากการขาดโปรตีน BCAP31 เนื่องจากผลการศึกษาในครั้งนี้ของผู้วิจัยพบว่า

ในคนไข้โรคสะเก็ดเงินมีการลดลงของการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน BCAP31 ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ลดลงที่บริเวณโปรโมเตอร์ของยีน การลดลงของการแสดงออกในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน BCAP31 จึงอาจเป็นสาเหตุให้เพิ่มความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดอะพอพโทซิสของเซลล์เม็ดเลือดขาวในโรคสะเก็ดเงิน ได้

ผลการศึกษาในครั้งนี้เน้นเป็นการค้นพบองค์ความรู้ใหม่ซึ่งยังไม่เคยมีผู้ใดเคยศึกษาในโรคสะเก็ดเงินมาก่อน และอาจนำมาอธิบายพยาธิสภาพของการเกิดโรคได้ แต่อย่างไรก็ตาม บทบาทและหน้าที่ของยีน BCAP31 โรคนี้ ยังไม่ทราบแน่ชัด และการเหนี่ยวนำให้เกิด Hypomethylation บนโปรโมเตอร์ของยีน BCAP31 ในโรคสะเก็ดเงินยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดเช่นกัน ยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาระดับซีรั่ม IL-22 ก่อนและหลังการรักษาโดยเมทโทรเทกเซต

Methotrexate นับเป็นยาตัวแรกในการเลือกใช้เพื่อรักษาโรคสะเก็ดเงินที่มีความรุนแรงระดับปานกลางขึ้นไป นอกจากกลไกที่ใช้ในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์แล้ว ยาดังกล่าวยังมีรายงานว่าสามารถเปลี่ยนแปลงระดับ DNA methylation และยับยั้ง cell adhesion molecules ซึ่งมีส่วนสำคัญในการชักนำให้เซลล์อักเสบต่าง ๆ เข้ามายังบริเวณรอยโรค (33) (34) รวมทั้งยังสามารถยับยั้งการกระตุ้น T cells บริเวณรอยโรคได้ (35) การศึกษานี้ได้รายงานการลดการสร้างของ Th22 cytokines ได้แก่ IL-22 ซึ่งน่าจะเป็นกลไกที่สำคัญอันหนึ่งของยา Methotrexate ในการรักษาโรคสะเก็ดเงิน นอกจาก Th22 cell ซึ่งเป็นตัวหลักในการสร้าง IL-22 แล้ว IL-22 ยังสามารถสร้างได้จาก Th1 cells, $\gamma\delta$ T cells, CD8+ T cells และ monocytes ได้อีกด้วย (36) จึงมีความเป็นไปได้ว่ายา Methotrexate อาจมีผลต่อ immune cells ต่างๆ ที่สร้าง IL-22 ด้วยเช่นกัน

ผลการศึกษาในครั้งนี้ยังพบอีกว่าระดับซีรั่ม IL-22 มีความสัมพันธ์กับ PASI score อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม IL-22 ไม่ใช่เป็นเพียงปัจจัยเดียวที่มีผลต่อความรุนแรงของโรค เนื่องจากองค์ประกอบและพยาธิกำเนิดของโรคสะเก็ดเงิน มีความซับซ้อน จึงน่าจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่ควรศึกษาเพิ่มเติม การศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า หากผู้ป่วยมีระดับซีรั่ม IL-22 ในปริมาณที่สูงมักจะมีการตอบสนองที่ดีต่อการรักษาด้วยยา มากกว่าผู้ป่วยที่มีระดับซีรั่ม IL-22 ในระดับต่ำ จึงมีความเป็นไปได้ว่าจะสามารถนำเอาระดับซีรั่ม IL-22 มาใช้เป็น biomarkers ในการทำนายผลของการรักษา

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ M.Caproni และคณะ (37) ซึ่งศึกษาผลของยา Etanercept และ Acitretin ต่อระดับซีรัม IL-17 และ IL-22 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มผู้ป่วยที่มี baseline IL-22 ไม่ต่างกัน Methotrexate สามารถลดระดับซีรัม IL-22 ได้มากกว่า Etanercept ได้อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ Acitretin ไม่มีผลต่อไซโตไคน์ ดังกล่าว ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่า Methotrexate สามารถออกฤทธิ์ได้อย่างกว้างขวางทั้งต่อ immune cells และ keratinocytes ในขณะที่ Etanercept ซึ่งเป็น TNF- α blocker จะมีฤทธิ์ที่จำเพาะเจาะจงมากกว่า Etanercept นอกจากจะลด TNF- α ซึ่งเป็น proinflammatory cytokines ที่สำคัญในโรคสะเก็ดเงินแล้ว ปัจจุบันพบว่ายาดังกล่าวมีผลต่อ T cells และ dendritic cells แต่ไม่มีผลต่อ keratinocytes (38) ในขณะที่ Acitretin มีผลต่อ keratinocytes เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีผลต่อ immune cells การใช้ยา Acitretin ในการรักษาโรคสะเก็ดเงินอย่างมีประสิทธิภาพมักจะต้องใช้ควบคู่กับการรักษาโดยวิธี อื่นด้วย เช่น Methotrexate หรือ NB-UVB ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ายาที่มีประสิทธิภาพที่ดีในการรักษาโรคสะเก็ดเงินควรจะออกฤทธิ์ต่อทั้ง immune cells และ keratinocytes เนื่องจาก keratinocytes นั้นเป็นแหล่งที่สร้าง proinflammatory cytokines, chemokines, adhesion molecules และ growth factors ที่สำคัญ

ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบระดับซีรัม IL-17 ในผู้ป่วยเพียง 2 คน ผู้ป่วยทั้ง 2 คนเป็นผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคค่อนข้างมาก (PASI>30) และตรวจไม่พบในกลุ่มควบคุม แตกต่างจากการศึกษาของ M.Caproni และคณะ (37) ซึ่งตรวจพบระดับซีรัม IL-17 ถึง 52.86 ± 27.63 pg/ml ในขณะที่ PASI score นั้นไม่แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ IL-17 การไม่สามารถตรวจพบไซโตไคน์ดังกล่าวในซีรัมอาจเป็นไปได้ว่า ผู้ป่วยในการศึกษานี้มีปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างจากกลุ่มที่ M.Caproni และคณะ นอกจากนี้ IL-17 สร้างจาก Th17 cells โดยพบ Th17 cells ดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นในรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (39) เนื่องจากการค้นพบ T cells ดังกล่าวเกิดขึ้นเพียงระยะเวลาไม่นาน การศึกษาเพื่อจำแนกลักษณะกลุ่มย่อยของ Th17 cells ดังกล่าวยังมีไม่มาก แต่เชื่อว่า CD4+IL17+ T cells นั้นมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน (40) และพบว่า Th17 cells สามารถสร้างได้โดยการกระตุ้นจาก dendritic cells บริเวณรอยโรค โดยไม่ได้มาจากในเลือด เพียงอย่างเดียว และพบว่า dendritic cells ที่ lesions สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของ naïve T cells ไปเป็น Th17 cells ได้มากกว่า dendritic cells ในเลือด (41) ซึ่งอาจจะเป็นอีกหนึ่งเหตุผลที่เราไม่สามารถตรวจพบระดับซีรัม IL-17 ในเลือดได้ เนื่องจากส่วนใหญ่จะถูกสร้างออกมาแล้วอยู่เฉพาะบริเวณรอยโรค

1. Nickoloff, B. J., and F. O. Nestle. 2004. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 113:1664.
2. Christophers, E. 2001. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 26:314.
3. Raychaudhuri, S. P., and E. M. Farber. 2001. The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15:16.
4. Schon, M. P., and W. H. Boehncke. 2005. Psoriasis. *N Engl J Med* 352:1899.
5. Bowcock, A. M., and J. G. Krueger. 2005. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 5:699.
6. Nickoloff, B. J. 1999. The immunologic and genetic basis of psoriasis. *Arch Dermatol* 135:1104.
7. Nickoloff, B. J., J. Z. Qin, and F. O. Nestle. 2007. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* 33:45.
8. Egger, G., G. Liang, A. Aparicio, and P. A. Jones. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429:457.
9. Robertson, K. D. 2005. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6:597.
10. Rodenhiser, D., and M. Mann. 2006. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *Cmaj* 174:341.
11. Ruchusatsawat, K., J. Wongpiyabovorn, S. Shuangshoti, N. Hirankarn, and A. Mutirangura. 2006. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med* 84:175.
12. Cadieux, B., T. T. Ching, S. R. VandenBerg, and J. F. Costello. 2006. Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res* 66:8469.
13. Luo, Y., Y. Li, Y. Su, H. Yin, N. Hu, S. Wang, and Q. Lu. 2008. Abnormal DNA methylation in T cells from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 159:827.
14. Richardson, B. 2003. DNA methylation and autoimmune disease. *Clin Immunol* 109:72.
15. Strietholt, S., B. Maurer, M. A. Peters, T. Pap, and S. Gay. 2008. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:219.
16. Wen, Z. K., W. Xu, L. Xu, Q. H. Cao, Y. Wang, Y. W. Chu, and S. D. Xiong. 2007. DNA hypomethylation is crucial for apoptotic DNA to induce systemic lupus erythematosus-like autoimmune disease in SLE-non-susceptible mice. *Rheumatology (Oxford)* 46:1796.
17. Zhang, P., Y. Su, H. Chen, M. Zhao, and Q. Lu. Abnormal DNA methylation in skin lesions and PBMCs of patients with psoriasis vulgaris. *J Dermatol Sci* 60:40.
18. Desprez, P. Y., T. Sumida, and J. P. Coppe. 2003. Helix-loop-helix proteins in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8:225.
19. Kondo, T., and M. Raff. 2000. The Id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* 19:1998.

20. Chan, A. S., W. Y. Tsui, X. Chen, K. M. Chu, T. L. Chan, A. S. Chan, R. Li, S. So, S. T. Yuen, and S. Y. Leung. 2003. Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* 22:6946.
21. Umetani, N., T. Mori, K. Koyanagi, M. Shinozaki, J. Kim, A. E. Giuliano, and D. S. Hoon. 2005. Aberrant hypermethylation of ID4 gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene* 24:4721.
22. Wilson, J. W., R. W. Deed, T. Inoue, M. Balzi, A. Becciolini, P. Faraoni, C. S. Potten, and J. D. Norton. 2001. Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res* 61:8803.
23. Jang, T. J., K. H. Jung, and E. A. Choi. 2006. Id-1 gene downregulation by sulindac sulfide and its upregulation during tumor development in gastric cancer. *Int J Cancer* 118:1356.
24. Bjorntorp, E., R. Parsa, M. Thornemo, A. M. Wennberg, and A. Lindahl. 2003. The helix-loop-helix transcription factor Id1 is highly expressed in psoriatic involved skin. *Acta Derm Venereol* 83:403.
25. Gomez Del Pulgar, T., F. Valdes-Mora, E. Bandres, R. Perez-Palacios, C. Espina, P. Cejas, M. A. Garcia-Cabezas, M. Nistal, E. Casado, M. Gonzalez-Baron, J. Garcia-Foncillas, and J. C. Lacal. 2008. Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism. *Int J Oncol* 33:185.
26. Du, Y., B. C. Bock, K. A. Schachter, M. Chao, and K. A. Gallo. 2005. Cdc42 induces activation loop phosphorylation and membrane targeting of mixed lineage kinase 3. *J Biol Chem* 280:42984.
27. Wery-Zennaro, S., J. L. Zugaza, M. Letourneur, J. Bertoglio, and J. Pierre. 2000. IL-4 regulation of IL-6 production involves Rac/Cdc42- and p38 MAPK-dependent pathways in keratinocytes. *Oncogene* 19:1596.
28. Johansen, C., K. Kragballe, M. Westergaard, J. Henningsen, K. Kristiansen, and L. Iversen. 2005. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br J Dermatol* 152:37.
29. Mosser, J., C. O. Sarde, S. Vicaire, J. R. Yates, and J. L. Mandel. 1994. A new human gene (DXS1357E) with ubiquitous expression, located in Xq28 adjacent to the adrenoleukodystrophy gene. *Genomics* 22:469.
30. Nguyen, M., D. G. Breckenridge, A. Ducret, and G. C. Shore. 2000. Caspase-resistant BAP31 inhibits fas-mediated apoptotic membrane fragmentation and release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 20:6731.
31. Wang, B., M. Nguyen, D. G. Breckenridge, M. Stojanovic, P. A. Clemons, S. Kuppig, and G. C. Shore. 2003. Uncleaved BAP31 in association with A4 protein at the endoplasmic reticulum is an inhibitor of Fas-initiated release of cytochrome c from mitochondria. *J Biol Chem* 278:14461.
32. Ng, F. W., M. Nguyen, T. Kwan, P. E. Branton, D. W. Nicholson, J. A. Cromlish, and G. C. Shore. 1997. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 139:327.
33. Sigmundsdottir, H., A. Johnston, J. E. Gudjonsson, B. Bjarnason, and H. Valdimarsson. 2004. Methotrexate markedly reduces the expression of vascular E-selectin, cutaneous lymphocyte-associated antigen and the numbers of mononuclear leucocytes in psoriatic skin. *Exp Dermatol* 13:426.

34. Torres-Alvarez, B., J. P. Castanedo-Cazares, C. Fuentes-Ahumada, and B. Moncada. 2007. The effect of methotrexate on the expression of cell adhesion molecules and activation molecule CD69 in psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 21:334.
35. Johnston, A., J. E. Gudjonsson, H. Sigmundsdottir, B. R. Ludviksson, and H. Valdimarsson. 2005. The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis, but by the suppression of activation and adhesion molecules. *Clin Immunol* 114:154.
36. Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang. 2007. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445:648.
37. Caproni, M., E. Antiga, L. Melani, W. Volpi, E. Del Bianco, and P. Fabbri. 2009. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *J Clin Immunol* 29:210.
38. Gottlieb, A. B., F. Chamian, S. Masud, I. Cardinale, M. V. Abello, M. A. Lowes, F. Chen, M. Magliocco, and J. G. Krueger. 2005. TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol* 175:2721.
39. Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman, and R. de Waal Malefyt. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950.
40. Zaba, L. C., I. Cardinale, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, M. Suarez-Farinas, J. Fuentes-Duculan, I. Novitskaya, A. Khatcherian, M. J. Bluth, M. A. Lowes, and J. G. Krueger. 2007. Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med* 204:3183.
41. Kryczek, I., A. T. Bruce, J. E. Gudjonsson, A. Johnston, A. Aphale, L. Vatan, W. Szeliga, Y. Wang, Y. Liu, T. H. Welling, J. T. Elder, and W. Zou. 2008. Induction of IL-17+ T cell trafficking and development by IFN-gamma: mechanism and pathological relevance in psoriasis. *J Immunol* 181:4733.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

- Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J*, Protjaroen P, Chaipipat M, Shuangshoti S, Thorner PS , Mutirangura A., Parakeratosis in skin is associated with loss of Inhibitor of Differentiation 4 (ID4) via promoter methylation. Human Pathology (accepted, In press)
*corresponding author
- Mephansan J, Ruchusatsawat K, Sindhupak W, Thorner PS , Wongpiyabovorn J*, Effect of methotrexate on serum levels of IL-22 in patients with psoriasis. European Journal Dermatology (accepted, In press)
*corresponding author
- Ruchusatsawat K, Kampeng J, Wongpiyabovorn J*, BCAP 31 promoter methylation in psoriasis.(manuscript in prep)
*corresponding author
- Youyongsatit S, Wongpiyabovorn J*, Ruchusatsawat K, Mutirangura A., LINE-1 methylation in psoriasis. (manuscript in prep)
*corresponding author