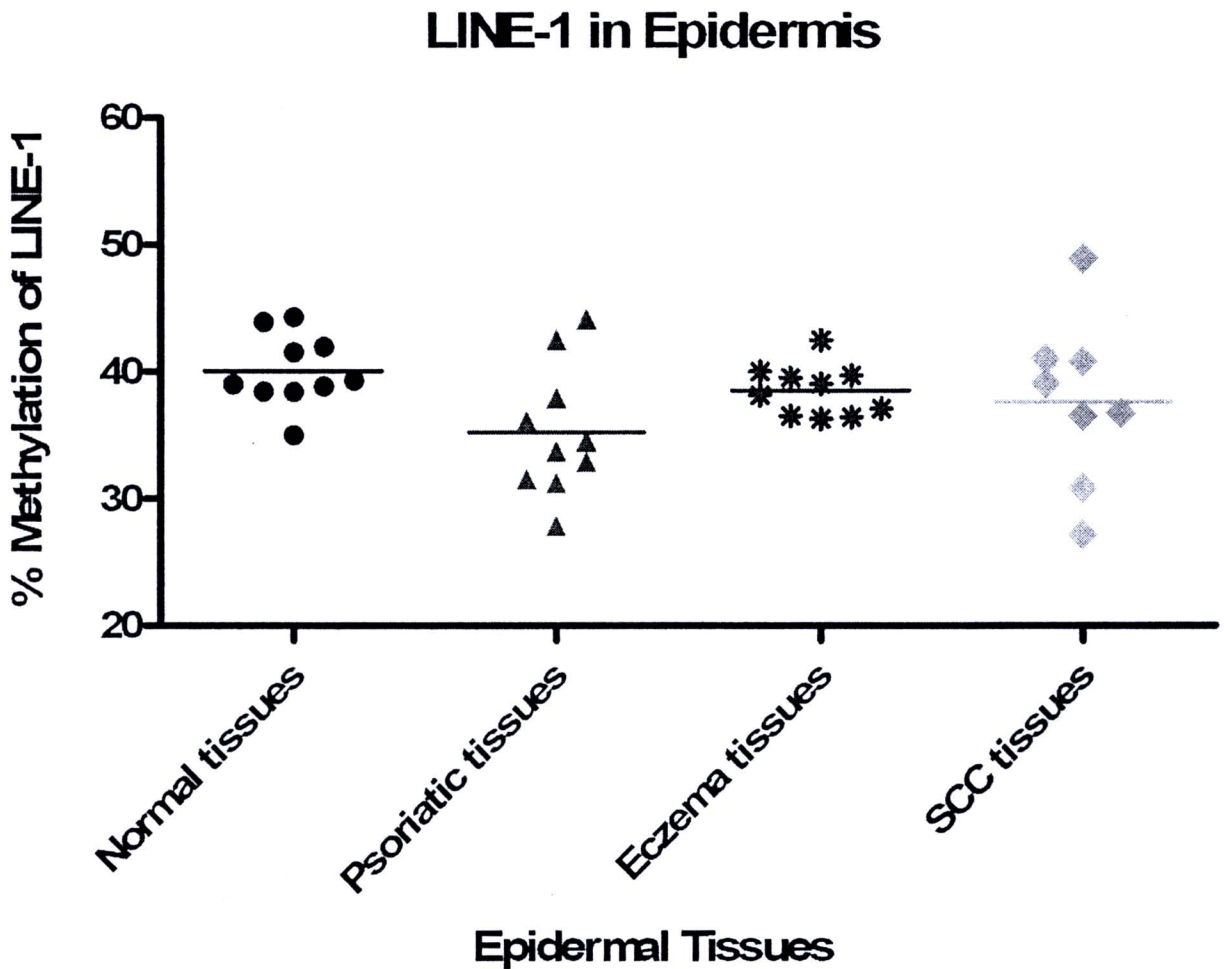


ผลการทดลอง

1. การศึกษา Genome-wide DNA methylation โดยใช้ repetitive sequences

ผลการศึกษาระดับ 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



เมื่อทำการศึกษาระดับ 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) และเมื่อแยกผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินตามระดับความรุนแรงของโรคโดยอาศัย 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

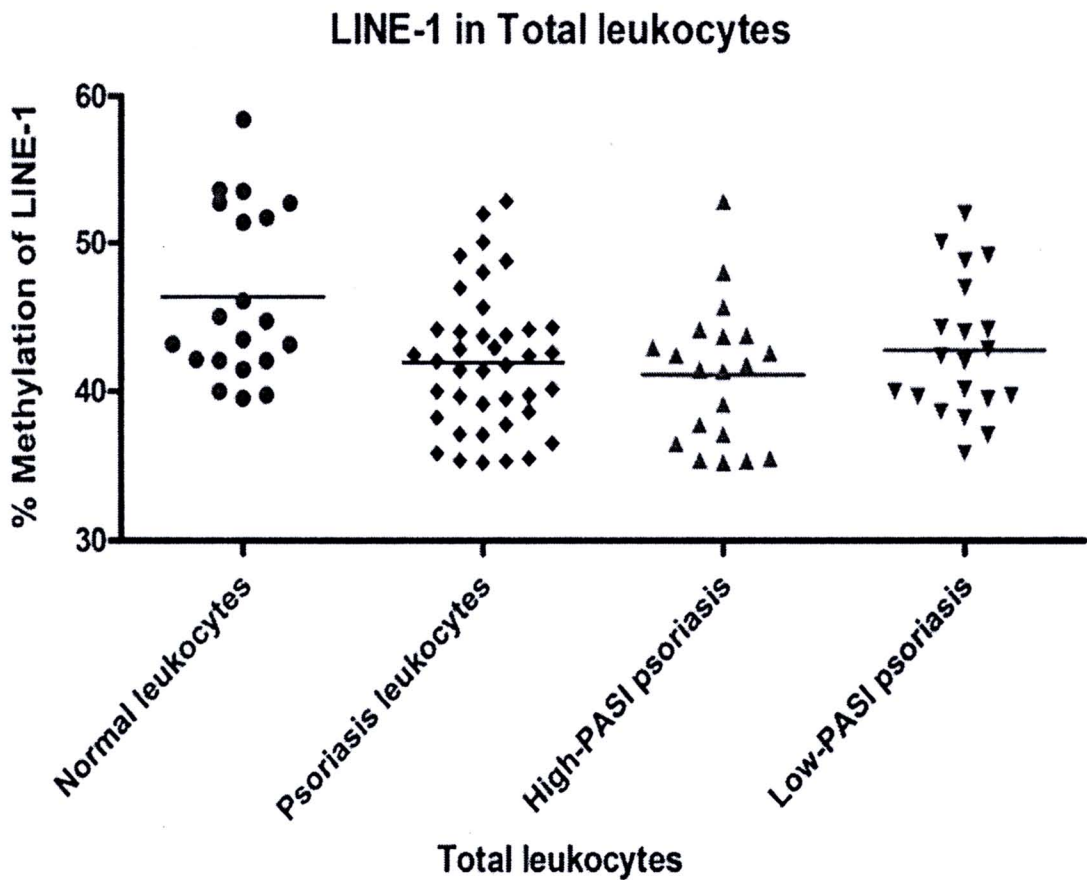


Figure 2

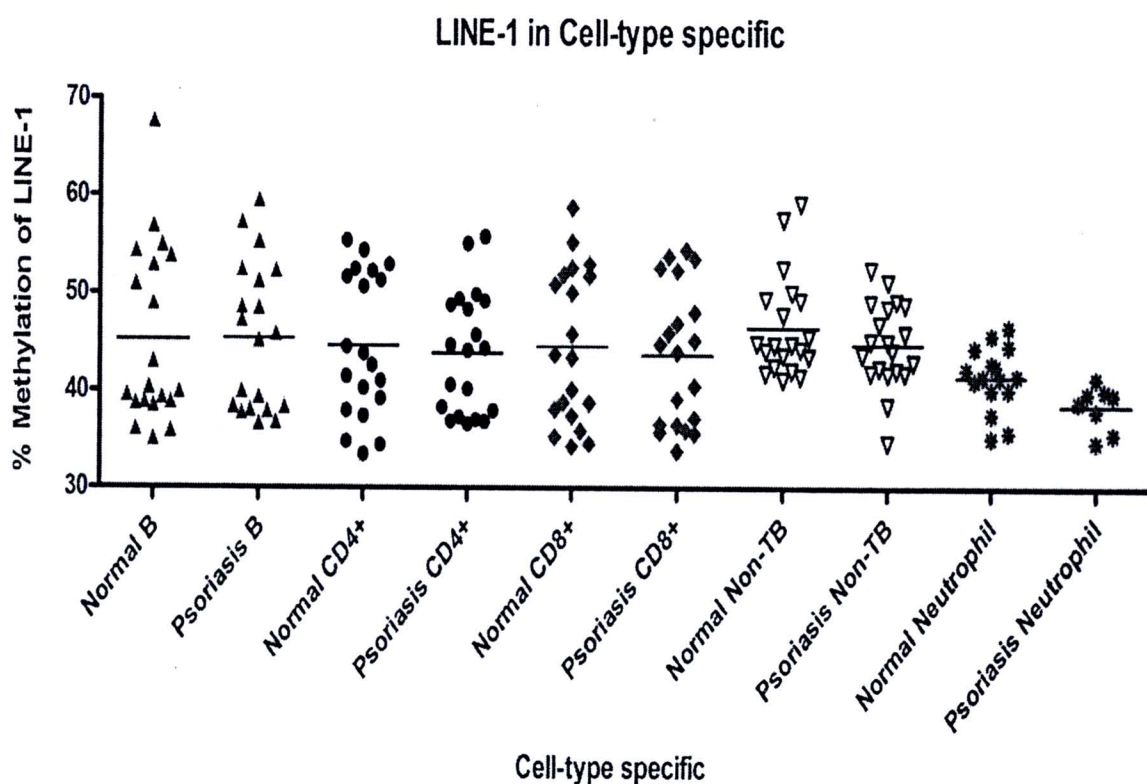
% Methylation of high PASI score (severe psoriasis) compared to normal total leukocytes: P-value = 0.003

% 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 ID4promoter 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 และUACC903 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

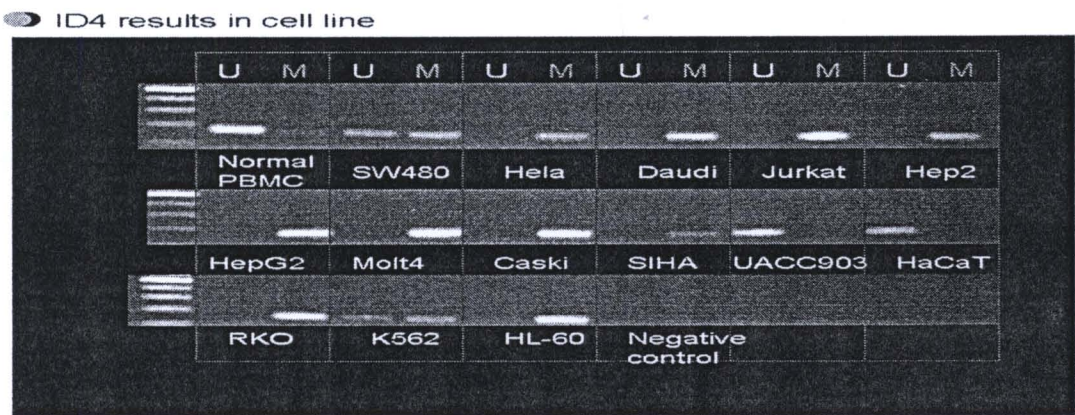


Table 1 Inverse correlation of ID4 promoter status and mRNA level of 11 Cell lines

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)

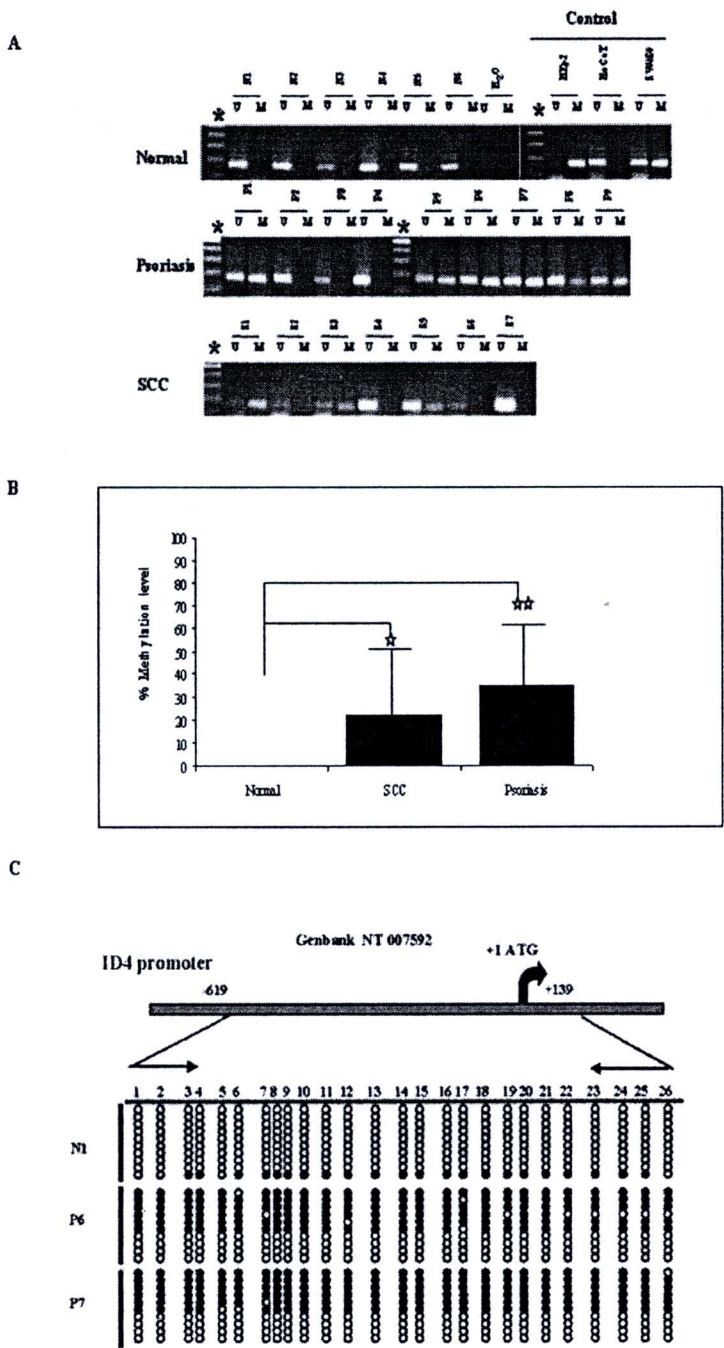
จากนั้นจึงทำการศึกษา promoter ID4 methylation ในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วยโรคมะเร็ง เทียบกับ โรคมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma of skin และผิวหนังจากคนปกติ โดยเริ่มศึกษาในผื่นโรคมะเร็งก่อน พบว่ามี non-methylated bands เกิดขึ้นอย่างเดียวนในผิวหนังจากคนปกติ ทั้งหมดจำนวน 6 ราย แต่ในผู้ป่วยโรคมะเร็งจะพบทั้ง non-methylated bands และ methylated bands 6 รายจาก 9 ราย มีระดับID4 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 มีระดับID4 promoter methylation= 21.84% (Figure 3A) เมื่อคำนวณทางสถิติพบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งและ 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



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่.....28.....ก.ย. 2555.....
เลขทะเบียน.....246367.....
เลขเรียกหนังสือ.....

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) พบว่าเซลล์ผิวหนังกำพร้าส่วนบนบริเวณที่เกิด parakeratosis ในโรคต่างๆ จะไม่มีการแสดงออกของ ID4 protein (Figure 4)

Figure 4

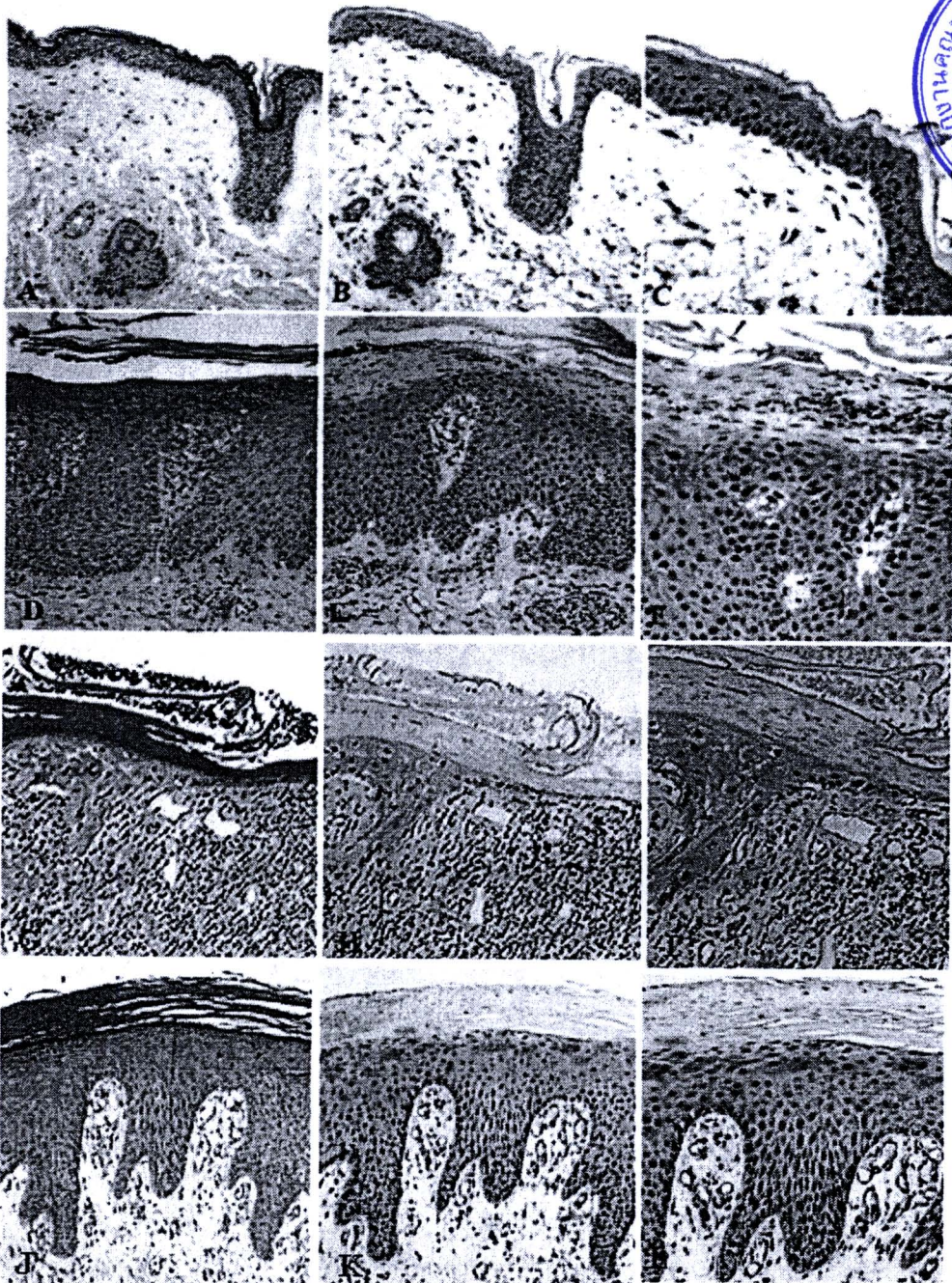
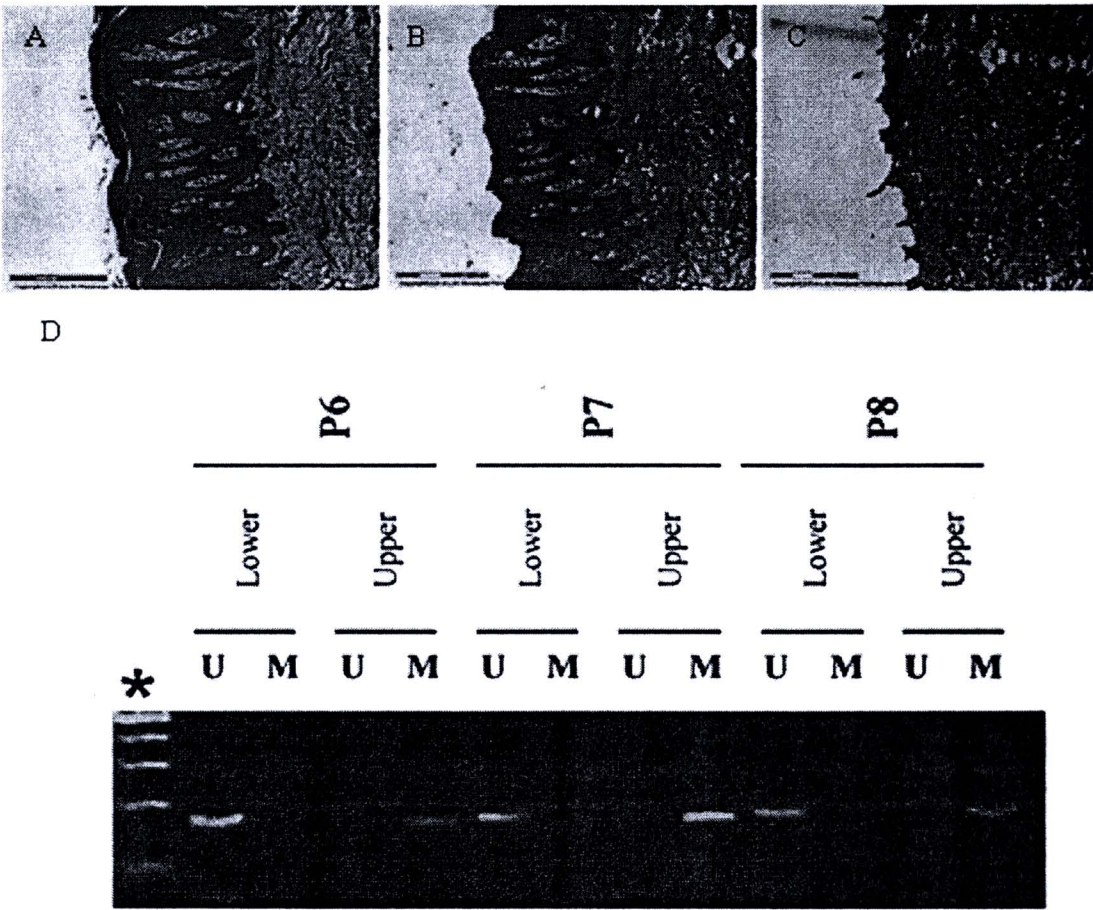


Figure 4 immunohistochemistry ของ ID4 (A-C) ผิวหนังคนปกติ (D-F) ผื่นโรคสะเก็ดเงิน (G-I) ผื่นโรคมะเร็งชนิด squamous cell carcinoma of skin และ (J-L) ผื่นโรค chronic eczema

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

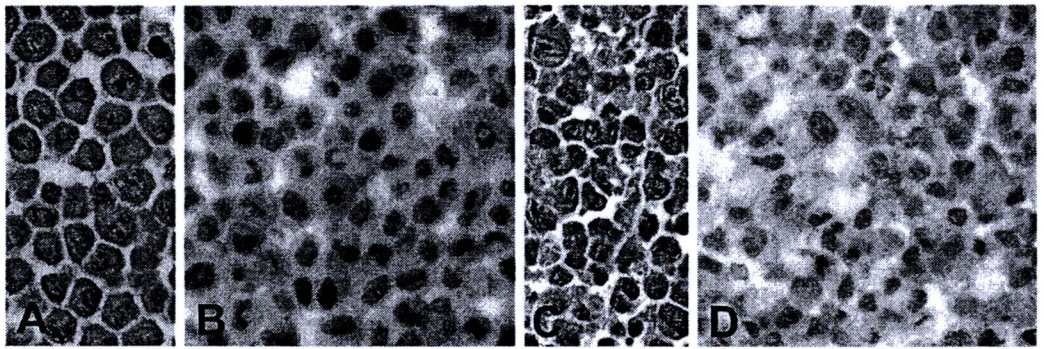


Figure 6

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 ได้ทำการศึกษาระดับ 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

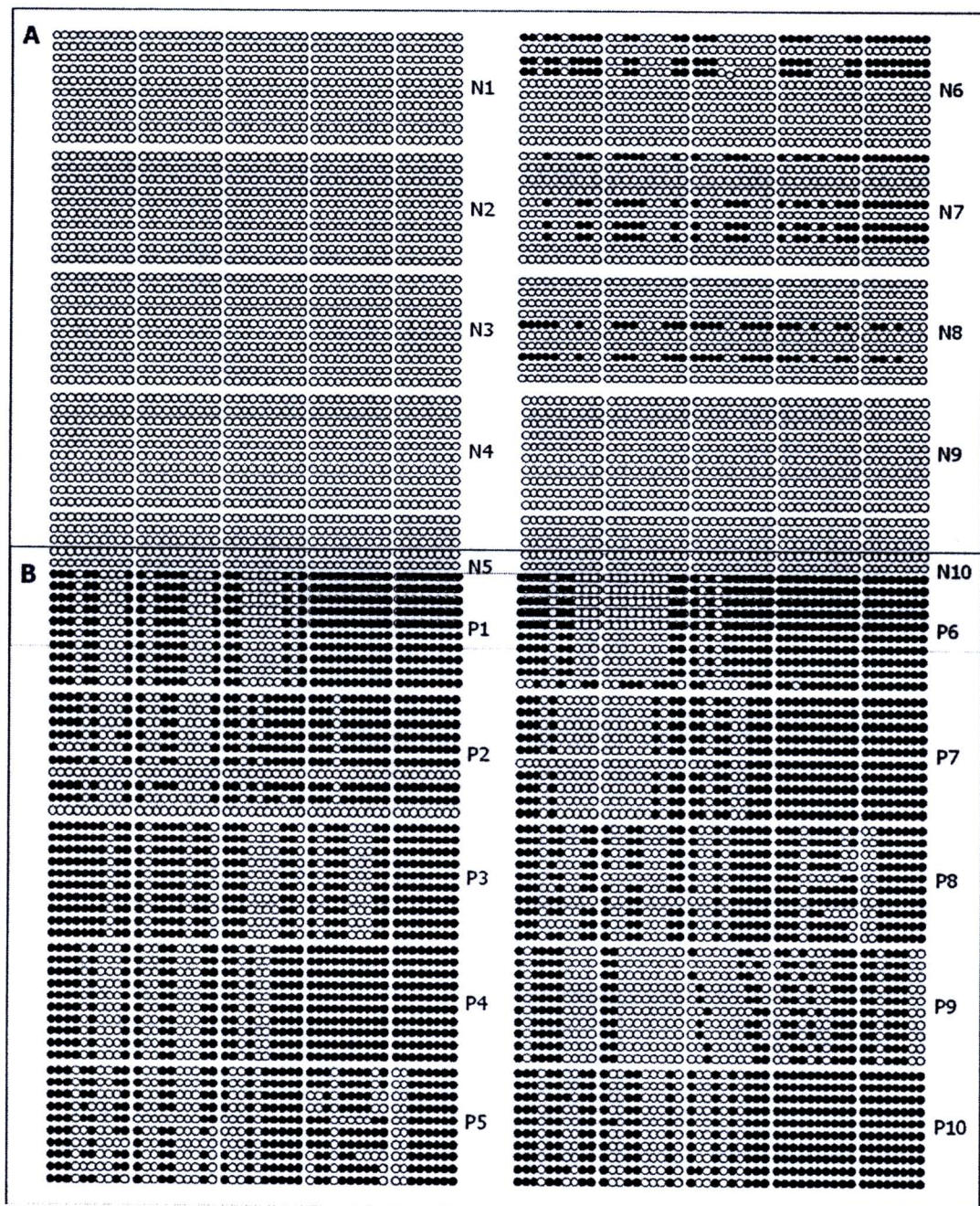
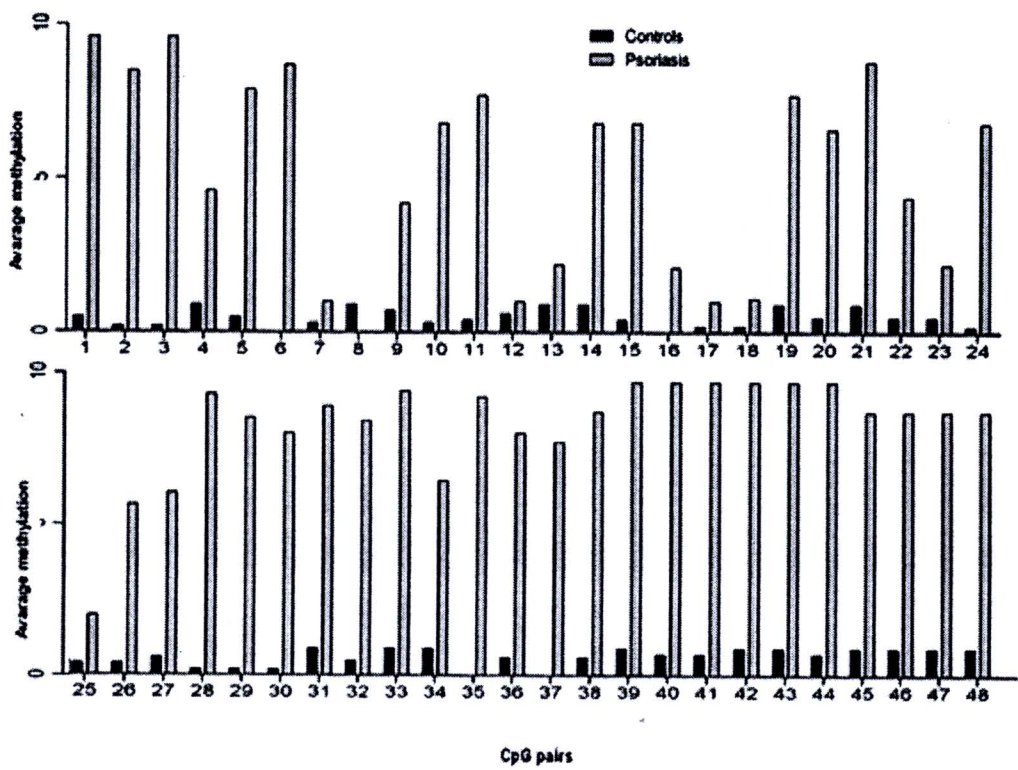


Figure 1 แสดงตัวอย่างผล bisulfite treatment, cloning and sequencing แต่ละราย Fig 1A แสดงผล methylation ของคนปกติ 10 ราย รายละ 10 โคลน Fig 1B แสดงผล methylation ของผู้ป่วยโรคสะกดเงิน 10 ราย รายละ 10 โคลน วงกลมสีขาวแสดงถึงตำแหน่งที่เป็น Unmethylation วงกลมสีดำแสดงถึงตำแหน่งที่เป็น Methylation



Figure 2

A



B

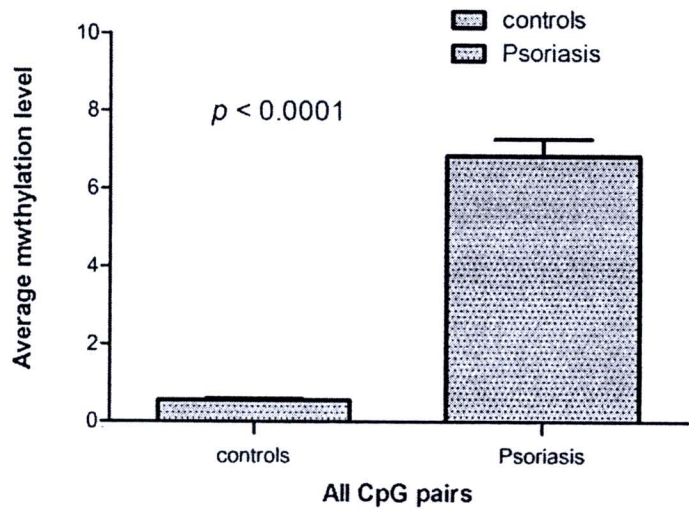


Figure 2

(A)

แสดงค่าเฉลี่ยระดับ DNA methylation ของ CpG แต่ละตำแหน่งทั้งหมด 48 ตำแหน่ง เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ (B) แสดงค่าเฉลี่ยระดับ DNA methylation ของ CpG ทั้งหมด 48 ตำแหน่ง เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ พบว่า ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีระดับ 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

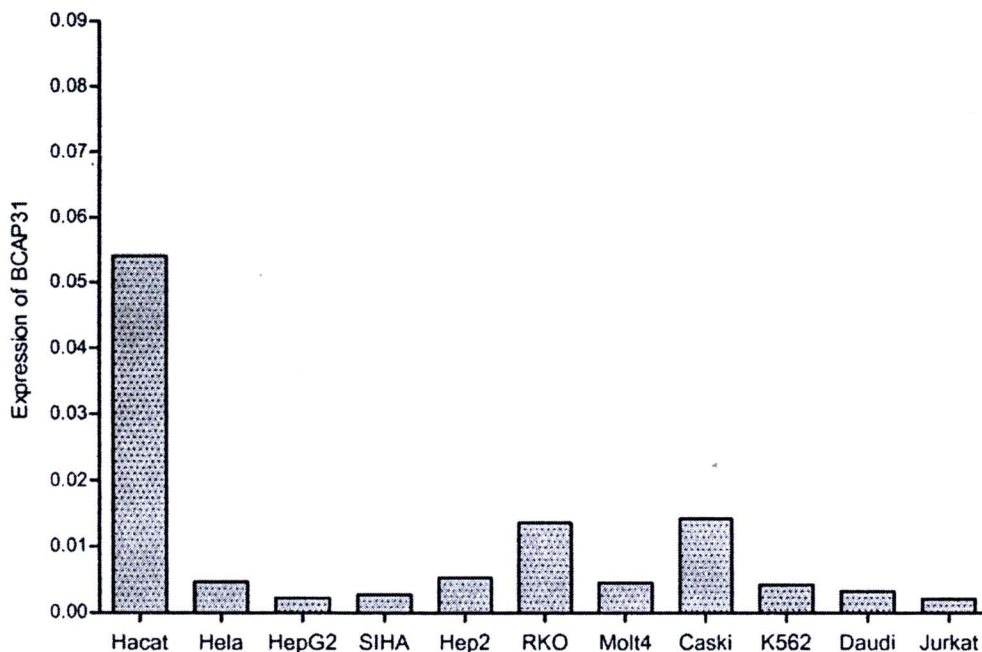


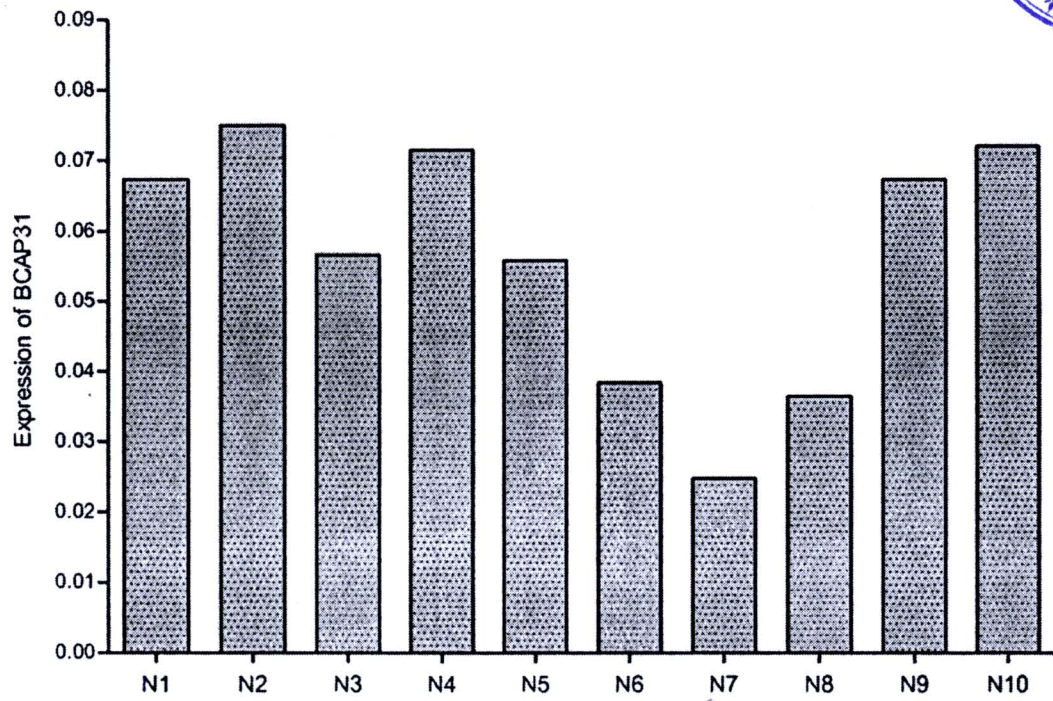
Figure 3 แสดงระดับ mRNA ของยีน BCAP31 โดยวิธี real-time RT PCR และ normalized ด้วยยีน 18 S ของ human cell lines ทั้งหมด 11 cell lines

และเมื่อทำการศึกษาระดับ mRNA ของยีน BCAP31 เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมและคนปกติซึ่งได้ทำการศึกษาระดับ DNA methylation แล้ว พบว่าผู้ป่วยโรคมะเร็งเต้านมมีระดับการแสดงออกของ BCAP31 mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ (0.0565 ± 0.00550 VS. 0.00661 ± 0.0013 $p < 0.0001$) (Figure 4)

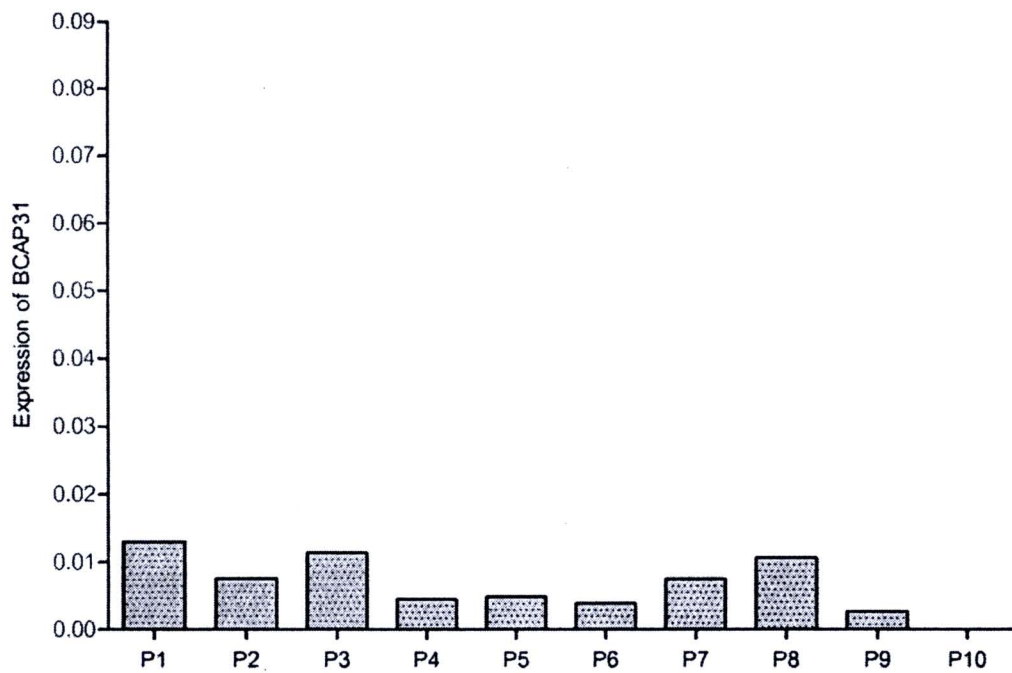


Figure 4

A



B



C

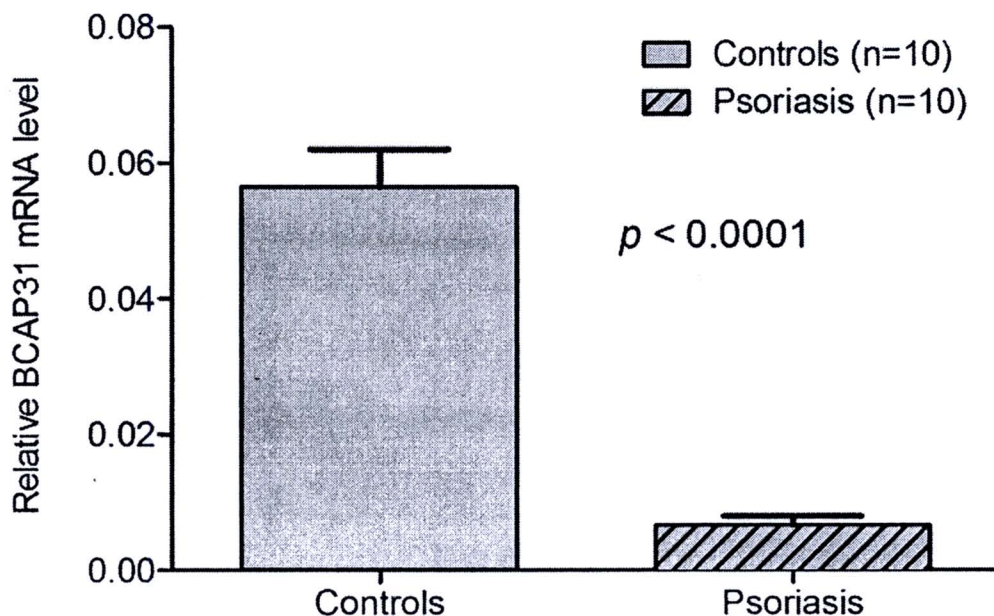


Figure 4 (A) แสดงระดับ BCAP31 mRNA ของคนปกติแต่ละราย (B) แสดงระดับ BCAP31 mRNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินแต่ละราย (C) แสดงค่าเฉลี่ย BCAP31 mRNA ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินเทียบกับคนปกติ พบว่าผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินมีระดับการแสดงออกของ BCAP31 mRNA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับคนปกติ

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 ในเพศชายมีแนวโน้มสูงกว่าเพศหญิงแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผู้ป่วยชายทั้งสิ้น 8 คนเคยได้รับการรักษาด้วย systemic treatment มาแล้วและส่วนใหญ่ได้รับยา Methotrexate ซึ่งผู้ป่วย 7 คนตอบสนองดีต่อยาดังกล่าว ผู้ป่วย 1 มีประวัติไม่ตอบสนองต่อยา Methotrexate แต่ตอบสนองดีต่อการรักษาด้วย PUVA และ Acitretin ผู้ป่วยหญิงทั้งหมดไม่ประวัติได้รับการรักษาด้วย systemic treatment มาก่อนการศึกษา ระดับ BMI ของผู้ป่วยส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์ปกติโดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 23 ข้อมูลพื้นฐานทั้งหมดของผู้ป่วยปดงไว้ในตารางที่ 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 แสดงระดับซีรัม 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

Figure 1

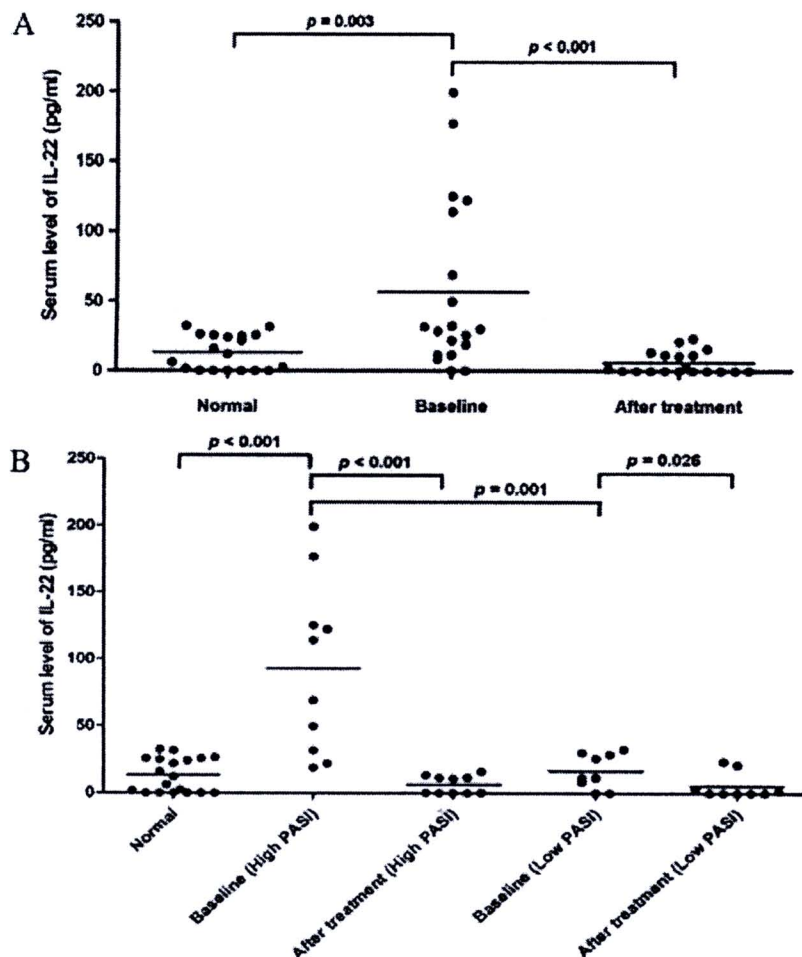


Figure 1 IL-22 serum level in healthy controls and in psoriasis patients at baseline and after treatment. Each dot represents the IL-22 serum level of a sample. Horizontal bars represent the mean. (A) Comparison between controls and psoriasis patients, at baseline and after treatment. (B) Comparison 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 ก่อนการรักษาเป็น กลุ่มที่มีระดับซีรัม IL-22 สูง ($IL-22 > 50$ pg/ml) ($n=6$) และกลุ่มที่มีระดับซีรัม IL-22 ต่ำ ($IL-22 \leq 50$ 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

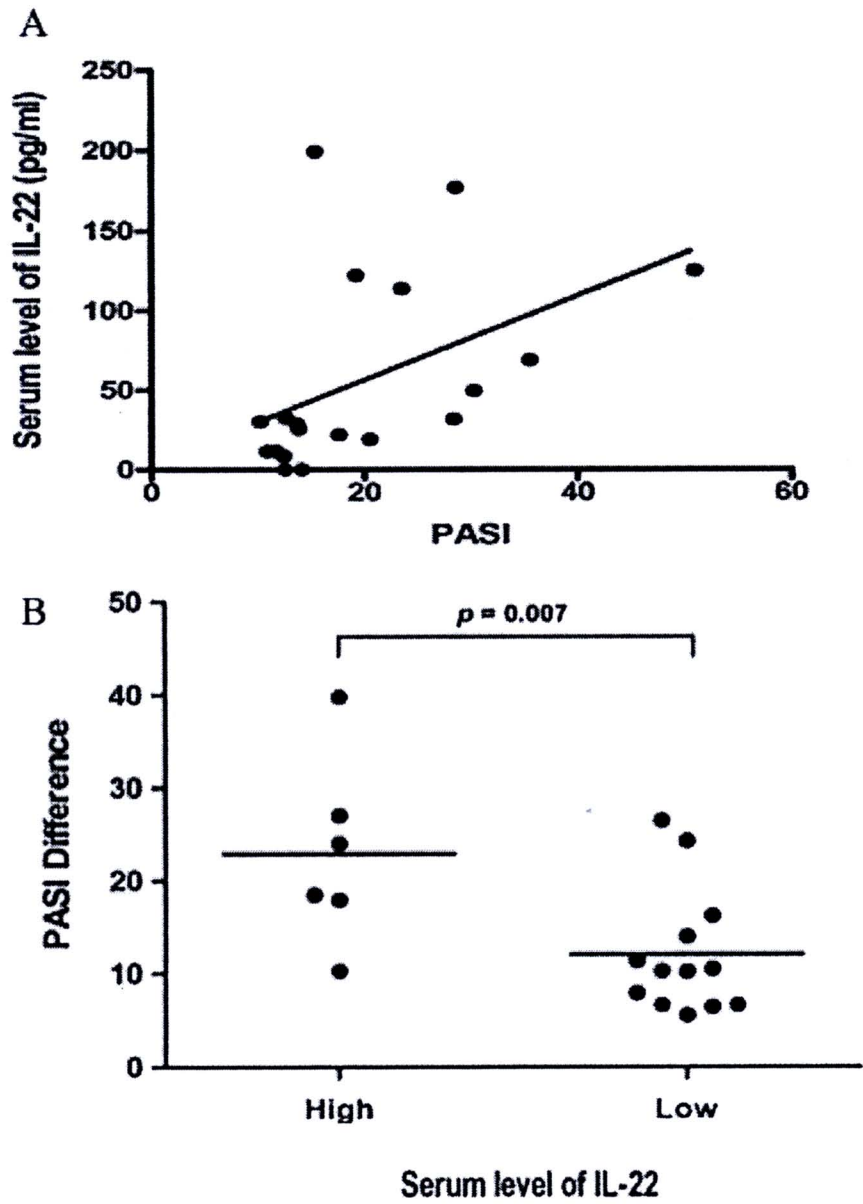


Figure 2 IL-22 serum level and PASI score in psoriasis patients. (A) Correlation between IL-22 serum level and PASI score at baseline ($r=0.63$, $p=0.004$). Each dot represents the IL-22 serum level and PASI score of each patient at baseline. (B) The clinical response to MTX was significant different 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 ≤ 50 pg/ml) ($n=13$).