

กลุ่มของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชัน ที่ผิวหนังและผิวหนังที่ไม่มีรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับผิวหนังคนปกติโดยวิธี เมทิลเลชันไมโครอะเรย์

เกรียงศักดิ์ อุชุศาสตร์¹ ลัดดาวัลย์ เทียมสิงห์¹ พรรณทิพา พรตเจริญ² และจางกลณี วงศ์ปิยะบวร²

¹สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ ถนนพหลโยธิน 11000

²คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพระรามที่ 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

บทคัดย่อ โรคสะเก็ดเงินมีอุบัติการณ์ประมาณร้อยละ 1-3 ของประชากรโลก สาเหตุของการเกิดโรคยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด การเปลี่ยนแปลงแบบนอกเหนือยีน (epigenetics) มีความสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน คณะผู้วิจัยทำการศึกษาการเกิด ดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน โดยใช้เทคนิคเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ โดยศึกษาจากผิวหนังและผิวหนังที่ไม่มีรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับผิวหนังปกติของคนปกติ โดยแบ่งกลุ่มละ 6 ตัวอย่าง พบยีนที่คาดว่าจะมีความสำคัญจำนวน 6 ยีน คือ ยีน *MSX1*, *TCP11*, *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* และ *TH* และคัดเลือกยีน *MSX1* ศึกษาภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยวิธีเมทิลเลชันสเปซิฟิกไฟโรเมอร์ (MSP) ในผิวหนังและเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับคนปกติ โดยพบว่าผิวหนังคนปกติเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจำนวน 3 ตัวอย่าง จาก 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75 ในขณะที่ผิวหนังไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจากทั้ง 6 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 0 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ ที่ศึกษาเป็นแบบ high through-put และจากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้สามารถคัดเลือกยีนที่สำคัญมาทำการศึกษาต่อ และ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีความสำคัญต่อพยาธิกำเนิดของโรคสะเก็ดเงิน

คำหลัก: โรคสะเก็ดเงิน, ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน, เมทิลเลชันไมโครอะเรย์, ยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วัน

Corresponding author E-mail: kriangsak.r@dmsc.mail.go.th

Received: 28 January 2021

Revised: 2 March 2021

Accepted: 11 March 2021

บทนำ

โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นโรคผิวหนังที่พบได้บ่อยประมาณร้อยละ 1-3 ของประชากรโลก⁽¹⁾ ความชุกของการเกิดโรคแตกต่างกันไปตามภูมิประเทศ เชื้อชาติ และสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างเช่น อัตราความชุกในประเทศซามัว (Samoa) ต่ำสุดถึงร้อยละ 0 แต่ในพื้นที่ Arctic-Kasach'ye กลับพบสูงถึงร้อยละ 11.8⁽²⁾ ทางด้านเอเชียซึ่งมีประชากรเชื้อชาติต่างๆ จำนวนมาก พบว่าความชุกของโรคสะเก็ดเงินในประเทศอินเดียร้อยละ 0.5-1.5 ประเทศมาเลเซียร้อยละ 4.0-5.5 ประเทศญี่ปุ่นร้อยละ 1.18 และประเทศคูเวตร้อยละ 3.1⁽³⁾ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยจากรายงานประจำปีของสถาบันโรคผิวหนัง กระทรวงสาธารณสุข เฉลี่ย 3,000 รายต่อปี ซึ่งคาดว่าน่าจะมีจำนวนผู้ป่วยทั่วประเทศมากกว่านี้

โรคสะเก็ดเงินเป็นโรคเกี่ยวกับภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเองที่เกี่ยวข้องกับเม็ดเลือดขาวชนิดทีลิมโฟไซท์ (T-lymphocyte mediated skin autoimmune disease)⁽⁴⁾ โดยผู้ป่วยมีพันธุกรรมที่มีแนวโน้มในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเป็นแบบ type 1 immune effector functions และปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคและกลไกการเกิดโรคที่ชัดเจน พันธุกรรมเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนเกี่ยวข้องโดยมีรายงานการวิจัยที่พบว่าผู้ป่วยในวัยเด็กที่เป็นโรคสะเก็ดเงินมักมีประวัติทางครอบครัวมาก่อน มากถึงร้อยละ 71⁽⁵⁾ และการศึกษาหา susceptibility regions บนตำแหน่งต่างๆ ของโครโมโซมเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน พบว่ามียีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค และการดำเนินของโรคสะเก็ดเงินคือ ยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมที่ 1q21, 3q21, 4q, 7p, 8, 11, 16q, 17q, 20p และ 6p⁽⁶⁾ เป็นต้น

แนวทางการวิจัยของโรคนี้ นอกจากวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในยีนแล้ว ยังมีการศึกษาการควบคุมแบบนอกเหนือพันธุกรรม (epigenetics) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงกลไกการทำงานของยีน โดยไม่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ (DNA) โดยเฉพาะการเกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ขึ้นภายในยีน เช่น ตัวอย่างการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการเกิดมะเร็งกับการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA demethylation/methylation) ทั้งในส่วนยีนควบคุมการแสดงออกของมะเร็ง (oncogene) และยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene)^(7, 8, 9) นอกจากนี้การศึกษาทางพันธุกรรมการเกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันกับการเกิดโรคสะเก็ดเงิน เช่น รายงานภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีน *SHP-1* ซึ่งทำหน้าที่เป็น negative regulatory signal gene ในเซลล์ผิวหนังของคนไข้โรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เป็นต้น⁽¹⁰⁾

ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธีไมโครเรย์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไว แม่นยำ รวดเร็ว และสามารถตรวจหาเบื้องต้น (Screening) ของยีนทั้งหมดที่ควบคุมด้วยกระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยมีรายงานข้อมูลที่เกี่ยวข้องและเป็นประโยชน์ เช่น การศึกษาการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันใน HeLa cell line⁽¹¹⁾ ในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Normal peripheral blood leukocytes) และชิ้นเนื้อของอวัยวะต่างๆ ของคนปกติ โดยพบว่าประมาณร้อยละ 4 ของยีนบนออโตโซม (autosomal gene) เกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชันขึ้นในส่วนโปรโมเตอร์ (บริเวณที่มี CpG islands) ของเซลล์ปกติเหล่านี้ ซึ่งเป็นหลักฐานสำคัญว่ากระบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีความสัมพันธ์กับกระบวนการ tissue-specific gene silencing ในเซลล์ปกติ⁽¹²⁾ และการศึกษาในชิ้นเนื้อของลูกอัณฑะ (testis) ชิ้นเนื้อสมอง (brain) และเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซท์ (Lymphocyte) ของคนปกติที่มีการแสดงออกของยีนมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเมทิลเลชันทั้งที่เกิดในและนอกส่วนโปรโมเตอร์ของยีน⁽¹³⁾ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของการเกิดภาวะเมทิลเลชันในโรคมะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate cancer) โดยสามารถบอกถึงยีนที่ค้นพบใหม่ที่ถูกควบคุมโดยกระบวนการเมทิลเลชันประมาณ 25 ยีน ซึ่งน่าจะมีความสำคัญกับพยาธิกำเนิดของโรค⁽¹⁴⁾ ในมะเร็งปอดสามารถพบยีนใหม่ประมาณ 11 ยีน (*LHX2, LHX4, PAX7, HOXB13, LBX1, SIX2, HOXD3, DLX1, HOXD1, ONECUT2* and *PAX9*) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเกิดภาวะเมทิลเลชันในโรคมะเร็งเป็นทั้งแบบครอบคลุมทั้งหมด (global DNA methylation)⁽¹⁵⁾ อย่างไรก็ตามข้อมูลการตรวจโดยใช้วิธีนี้ในกลุ่มโรคภูมิคุ้มกันต้านตนเอง (autoimmune diseases) โดยเฉพาะโรคสะเก็ดเงินยังมีไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษานี้

ผู้วิจัยจะสามารถค้นหายีนทั้งหมดที่เกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันที่เกี่ยวข้องกับโรคสะเก็ดเงิน และใช้เป็นแหล่งข้อมูลของยีนในการศึกษาพยากรณ์โรคต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา (Evaluation samples)

ผู้ป่วยประชากรไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

เกณฑ์การเลือกผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis patient)

Inclusion criteria:

- ผู้หญิงหรือผู้ชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี เชื้อชาติไทย หรือไทยจีน
- ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคสะเก็ดเงินชนิด chronic plaque type โดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญทางผิวหนัง พร้อมทั้งได้รับการตรวจชิ้นเนื้อทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย

Exclusion criteria:

- ผู้ป่วยที่ไม่สมัครใจที่ยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย
- ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่ได้รับยาทาเฉพาะที่ภายใน 2 สัปดาห์ หรือยารับประทานรักษาโรคสะเก็ดเงิน ภายใน 4 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
- ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่มคอร์ติโคสเตียรอยด์ (corticosteroid) รวมถึงยากดภูมิคุ้มกันอื่นๆ ขณะทำการศึกษา
- ผู้ป่วยที่มีภาวะ autoimmune diseases อื่นๆ
- ผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคมะเร็ง

เกณฑ์การเลือกกลุ่มควบคุม (healthy control)

Inclusion criteria:

- อาสาสมัครหญิงหรือชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปี เชื้อชาติไทย หรือไทยจีน
- อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี

Exclusion criteria:

- มีประวัติครอบครัวเคยเป็นโรคสะเก็ดเงิน และอาสาสมัครมีประวัติเป็น autoimmune diseases อื่นๆ

ขั้นตอนการเก็บข้อมูล

1. ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยลงนามในใบยินยอม
2. บันทึกข้อมูลที่สำคัญทางคลินิกของผู้ป่วย
 - ข้อมูลพื้นฐานทั่วไป (demographic data)
 - ประเมินความรุนแรงของโรค โดยอาศัยจากอาการ ใช้ Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score ซึ่งเป็น clinical score มาตรฐานในการประเมินความรุนแรงของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

การเก็บตัวอย่างเลือดและการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

เก็บตัวอย่างเลือด 30 มิลลิลิตร 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 บริเวณรอยโรค ผื่น (Involved skin) 1 ตำแหน่ง และผิวหนังปกติห่างจากรอยโรค 10 เซนติเมตร (ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค, Uninvolved skin) 1 ตำแหน่ง ซึ่งผู้วิจัยจะนำส่งตรวจพยาธิสภาพตามปกติ โดยการย้อม H&E และทำการตัดชิ้นเนื้อจาก paraffin section และแบ่งชิ้นเนื้อบางส่วนเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (°C) เพื่อเตรียม frozen section จากนั้นนำมาแยกเซลล์ชั้นหนังกำพร้าออกมาศึกษาโดยทำการแยกเซลล์ด้วยวิธี Laser capture microdissection (LCM)

ตัวอย่างที่ตรวจหาดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ (methylation microarray)

โดยใช้เซลล์หนังกำพร้าจากผู้ป่วยจำนวน 6 ราย โดยทำบริเวณผื่นโรคสะเก็ดเงิน (Involved skin) 6 ชิ้น (ตัวอย่าง), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) 6 ชิ้น (ตัวอย่าง) และผิวหนังปกติ (Normal skin) 6 ชิ้น (ตัวอย่าง) จากคนปกติจำนวน 6 ราย รวมจำนวนทั้งสิ้น 18 ชิ้น (ตัวอย่าง) ทำการแยกเซลล์ด้วยวิธี Laser capture microdissection (LCM) นอกจากนั้นใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line, HaCaT) 2 ตัวอย่าง PBMC ของคนปกติ 1 ตัวอย่าง PBMC ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน 1 ตัวอย่าง และตัวควบคุมของอีลูมินา (Illumina control) 2 ตัวอย่าง (มาพร้อมกับชุด Illumina Infinium Human Methylation27 BeadChip) รวมจำนวนทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง การศึกษาครั้งนี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รหัส 300/54

การเตรียมตัวอย่างโดยการวิธี Bisulfite treated-DNA⁽¹⁶⁾

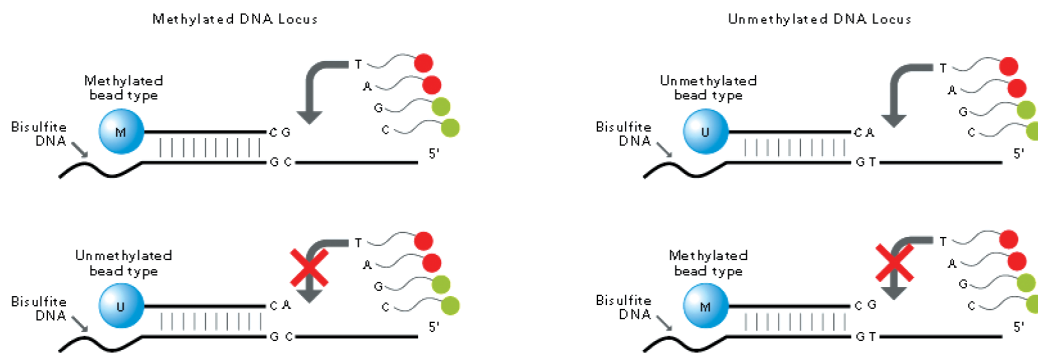
การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด QIamp DNA Min Kit (Qiagen, Hilden, Germany) (ตาม Protocol) และตามด้วยการทำ Bisulfite treated-DNA⁽¹⁶⁾ โดยวิธีการย่อดังนี้ ใช้ดีเอ็นเอ 2 µg ในน้ำ 50 µl แล้วทำให้ดีเอ็นเอแยกสาย โดยใช้ 2 M NaOH นาน 10 นาที 37 °C จากนั้นเติม 30 µl ของ 10 mM hydroquinone และ 520 µl ของ 3 M sodium bisulfite (pH 5.0) นำตัวอย่างที่ได้ไปต้ม (incubated) ที่ 50 °C นาน 16-20 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้ (Bisulfite-treated DNA) ถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น โดยใช้ Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกแยกออกมาโดยใช้น้ำที่อุณหภูมิ 95 °C จำนวน 50 µl หลังจากนั้นเติม 5.5 µl ของ 3 M NaOH ที่ไว้นาน 5 นาที ตกตะกอนด้วยเอทานอลและไกลโคเจน จากนั้นเติมน้ำจำนวน 20 µl Bisulfite-treated DNA จะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

วิธีการ

วิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ (methylation microarray) โดย Illumina Infinium Human Methylation27 BeadChip

Bisulfite-treated DNA คือการเปลี่ยน cytosine เป็น uracil (unmethylated DNA) ในขณะที่ cytosine ที่ถูก methylated จะคงเป็น cytosine (methylated DNA) จากนั้น U bead type (ที่จำเพาะกับ unmethylated CpG) และ M bead type (ที่จำเพาะกับ methylated CpG) ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยใช้ Illumina Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina, Inc. San Diego, CA, USA) (The manufacturer's instruction) สแกนด้วย Illumina BeadArray Reader แล้วประมวลผลโดยซอฟต์แวร์ GenomeStudio 3.2 (Genomestudio Methylation Module v3.2, User Guide. Illumina Inc., San Diego, CA, USA) ข้อมูลดิบได้รับการฝากไว้ในฐานข้อมูล NCBI GEO ภายใต้หมายเลข Accession ของ GSE23789 ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CU-DREAM (CU-DREAM program)⁽¹⁷⁾ เพื่อคำนวณค่าเมทิลเลชันเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่างในแต่ละ

การทดลอง (ซีพีจี 27,578 ตำแหน่ง บนจีโนม) และนำข้อมูลที่ได้มารวบรวมและจัดเรียงลงในโปรแกรม Microsoft Excel



ภาพที่ 1 หลักการของเมทิลเลชันไมโครอะเรย์ (methylation microarray) โดย Bisulfite-treated DNA คือการเปลี่ยน cytosine เป็น uracil (unmethylated DNA) ในขณะที่ cytosine ที่ถูก methylated จะคงเป็น cytosine (methylated DNA) จากนั้น U bead type (ที่จำเพาะกับ unmethylated CpG) และ M bead type (ที่จำเพาะกับ methylated CpG) (Illumina user Guide line, 2008)

การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติ

การวิเคราะห์เมทิลเลชันไมโครอะเรย์ เพื่อดูความสัมพันธ์ของยีนที่น่าสนใจ (candidate gene) กับโรค สะเก็ดเงิน จะถูกวิเคราะห์แต่ละยีนในทางสถิติ เช่น ค่า beta value (β) และค่า Difference score (*DiffScore*) ในตำแหน่งของ CpG locus เป็นค่าที่ใช้ประมาณค่าของระดับของดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$\beta = \frac{\text{Max (signal B, 0)}}{\text{Max (signal A, 0) + Max (signal B, 0) + 100}}$$

สำหรับค่า *DiffScore* เป็นการคำนวณความแตกต่างของดีเอ็นเอเมทิลเลชันโดยใช้ค่าของ β ของกลุ่มตัวอย่าง (condition group) กับกลุ่มอ้างอิง (reference group) โดยมีสูตรคำนวณดังนี้

$$p = z \left(\frac{|\beta_{\text{cond}} - \beta_{\text{ref}}|}{\sqrt{\frac{S^2_{\text{ref}}}{N_{\text{ref}}} + \frac{S^2_{\text{cond}}}{N_{\text{cond}}}}} \right)$$

$$\text{DiffScore} = 10 \text{sgn} (\beta_{\text{cond}} - \beta_{\text{ref}}) \log_{10} p$$

โดยค่า Difference score (*DiffScore*) > 20 มีค่า $p < 0.01$ ^(18, 19) และการให้เกณฑ์การแปลผล *DiffScore* แยกเป็น *DiffScore* < -40 เกิดภาวะดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน และ *DiffScore* > 40 เกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน การสรุปข้อมูลอื่นๆ ใช้ mean $\pm$ 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 และจะถือว่ามียีนสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $\alpha=0.05$

วิธีตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยเมทิลเลชันสเปซิฟิกไพรเมอร์ (**Methylation Specific Primer, MSP**) ของยีนเอ็มเอสเอ็กซ์วัน (*MSX1*)

Bisulfite-treated DNA ถูกตรวจหาการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยใช้ $1 \times$ PCR buffer (Tris-Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 mM MgCl_2 , pH 8.3), 1 unit HotStarTaq DNA Polymerase, 200 nM of each dNTPs (Qiagen, USA), 0.25 μM of each forward and reverse primers and 2 μl of the Bisulfite treated DNA. Primer *MSX1* MF AGG-ATT-TCG-TTT-TCG-GTA-AGT-CGG-C 25 bp (ตำแหน่ง 282 – 306) และ Primer *MSX1* MR CTC-GAA-AAA-CGC-CAA-AAC-GCT-CT 23 bp (ตำแหน่ง 487 – 465) (สำหรับ methylated form) และ primer *MSX1* UF TTT-TGT-TTT-TGG-TAA-GTT-GGT-GGG-G 25 bp (ตำแหน่ง 291 – 315) และ *MSX1* UR CCC-TCA-AAA-AAC-ACC-AAA-ACA-CTC-T 25 bp (ตำแหน่ง 487 – 465) (RefSeqID: NM_002448) สำหรับ unmethylated form จากนั้นทำ PCR ด้วยเครื่อง Gene Amp 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

ขั้นตอน PCR

94°C นาน 5 นาที	1 รอบ
94°C นาน 1 นาที	40 รอบ (met/unmet)
55°C นาน 1 นาที	
72°C นาน 1 นาที	
72°C นาน 5 นาที	1 รอบ

การตรวจชิ้นส่วนที่ได้ (PCR product) ทั้งหมดนำมาแยกด้วย gel electrophoresis

เตรียม 2% agarose gel ที่มีความเข้มข้น $0.5 \times$ TBE buffer ในความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ นาน 45 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide ดูภายใต้แสง UV เพื่อสังเกตหา PCR product ของยีน *MSX1* ทั้ง 2 แบบ (M, methylated form และ U, unmethylated form) ขนาด 206 และ 199 bp ตามลำดับ

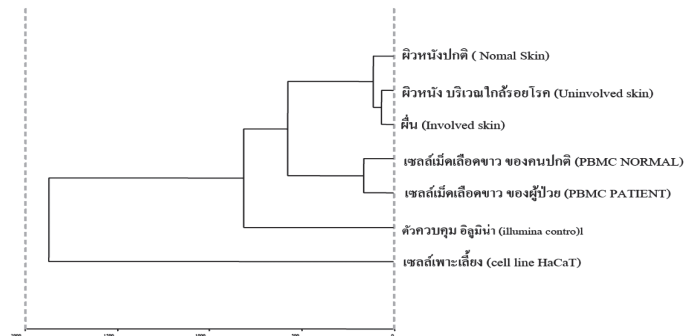
ผล

การแยกกลุ่มตัวอย่างตามลักษณะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation)

การทำ methylation microarray สามารถวิเคราะห์ข้อมูลของ 24 ตัวอย่าง ($n=24$) ซึ่งแต่ละตัวอย่างมีตำแหน่งซีพีจี (CpG site) ทั้งหมด 27,578 ตำแหน่ง (หรือจำนวนยีนทั้งหมด 14,495 ยีน) ที่สามารถแสดงสัญญาณ (signal) ตามค่าที่อ่านได้โดยใช้โปรแกรม Genome Studio ซึ่งพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของตัวอย่างตามค่า beta value (β) ทำให้เกิดลักษณะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation) ดังนั้นคือ กลุ่มที่เป็นชิ้นเนื้อจะอยู่ใกล้กันเป็นคลัสเตอร์ (Cluster) แตกต่างจากกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line, HaCaT) และตัวควบคุมของอิลูมินา (Illumine control) จะมีความแตกต่างมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 2

การแสดงออกของการเกิดภาวะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) หรือการเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน (DNA demethylation) (ตารางที่ 1)

ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*DiffScore*) ของแต่ละตำแหน่งของยีน (CpG site) และรวบรวมเป็นยีนนั้น พบว่าในกลุ่มของชิ้นเนื้อ ก) ผิวหนังคนปกติ (Normal skin) มีความแตกต่างจากผิว (Involved skin) ในจำนวน (CpG sites) 1,293 ซีพีจี (หรือจำนวน 1,019 ยีน) โดยแยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 (เกิดกระบวนการ DNA demethylation) จำนวน 861 ซีพีจี และค่า *DiffScore* > 40 (เกิดกระบวนการ DNA methylation) จำนวน



ภาพที่ 2 การจัดกลุ่มตัวอย่าง (Cluster) ของตัวอย่างทั้ง 4 ประเภท ได้แก่ ชิ้นเนื้อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์เพาะเลี้ยง และตัวควบคุมอีลูมินา ตามลักษณะการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation)

432 ซีพจี และระบุเป็นยีนได้เป็นจำนวน 637 ยีน และ 382 ยีน ตามลำดับ ข) ผิวหนังปกติ กับผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) ในจำนวน (CpG sites) 1,072 ซีพจี (หรือจำนวน 804 ยีน) โดยแยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 จำนวน 833 ซีพจี และค่า *DiffScore* > 40 จำนวน 239 ซีพจี และระบุเป็นยีนได้ 591 ยีน และ 213 ยีน ตามลำดับ ค) ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) กับ ผื่น (Involved skin) มีความแตกต่างกันในจำนวน 602 ซีพจี (หรือจำนวน 533 ยีน) แยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 จำนวน 317 ซีพจี และค่า *DiffScore* > 40 จำนวน 285 ซีพจี ระบุเป็นยีนได้เป็นจำนวน 276 ยีน และ 257 ยีน ตามลำดับ

สำหรับกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว พบว่าระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ (PBMC normal) กับเซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (PBMC psoriasis) มีความแตกต่างกันจำนวน 483 ซีพจี (จำนวน 359 ยีน) แยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 จำนวน 39 ซีพจี และค่า *DiffScore* > 40 จำนวน 444 ซีพจี ระบุเป็นยีนได้ 32 ยีน และ 327 ยีน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของจำนวนซีพจี (CpG site) และจำนวนของยีนทั้งหมดที่ได้จากค่า *DiffScore* โดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง (ผิวหนังปกติ, Normal skin) (ผื่น, Involved skin, IN) (ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค, Uninvolved skin, UN) และกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC)

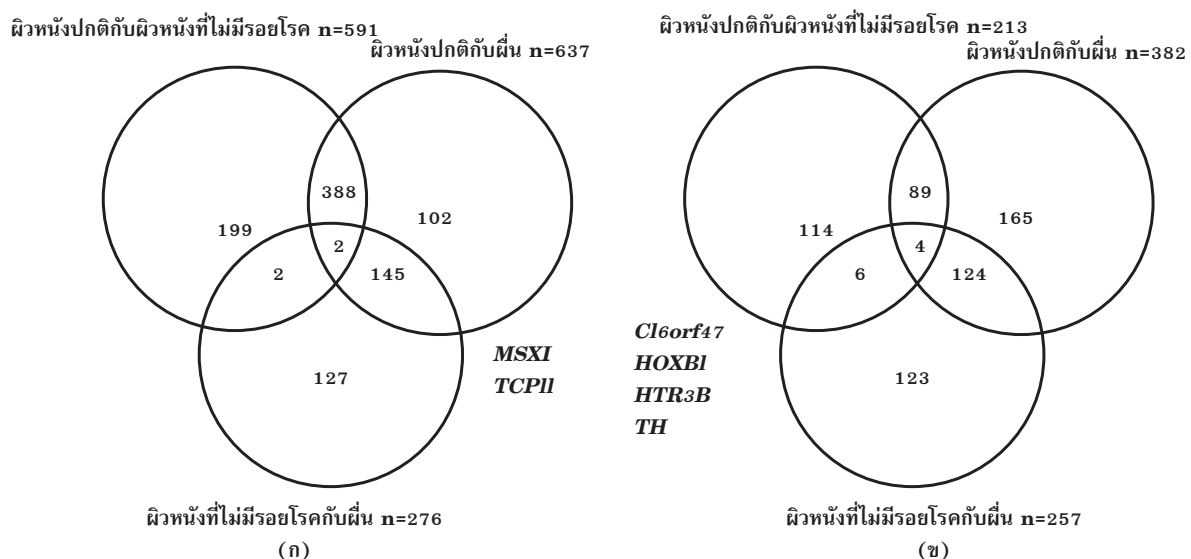
การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง	จำนวนซีพจี (n=27,578)	จำนวนยีน (n= 14,495)	ค่า Difference Score (<i>DiffScore</i>)	
			มากกว่าหรือ เท่ากับ (≥ 40)	น้อยกว่า -40 (< -40)
			จำนวนซีพจี (ยีน)	จำนวนซีพจี (ยีน)
ผิวหนังปกติ กับ ผื่น	1293	1019	432 (382)	861 (637)
ผิวหนังปกติ กับ ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค	1072	804	239 (213)	833 (591)
ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค กับ ผื่น	602	533	285 (257)	317 (276)
เซลล์เม็ดเลือดขาวของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน กับ เซลล์เม็ดเลือดขาวคนปกติ*	483	359	444 (327)	39 (32)
เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line, HaCaT)**				

* จำนวนตัวอย่างที่เปรียบเทียบกันอย่างละ 1 ตัวอย่าง

** เป็นเซลล์ลักษณะเฉพาะ ไม่มีการเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง

ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างกลุ่มของผิวหนังคนปกติ (Normal skin), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) และผิว (Involved skin)

โดยยีนที่มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*DiffScore*) ซึ่งแยกเป็นค่า *DiffScore* < -40 และค่า *DiffScore* > 40 พบว่า ก) ในกลุ่มยีนระหว่างยีนของกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิว (Normal skin-Involved skin) กับกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Normal-uninvolved skin) มียีนที่เหมือนกันจำนวน 388 ยีน และ 89 ยีน ตามลำดับ ข) ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างในกลุ่มยีนของผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค-ผิว (Uninvolved skin-Involved skin) กับกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิว (Normal skin-Involved skin) มียีนที่เหมือนกันจำนวน 145 ยีน และ 124 ยีน ตามลำดับ ค) ความสัมพันธ์ของยีนระหว่างในกลุ่มยีนของผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค-ผิว (Uninvolved skin-Involved skin) กับกลุ่มผิวหนังคนปกติ-ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Normal skin-Uninvolved skin) มียีนที่เหมือนกันจำนวน 2 ยีน และ 6 ยีน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3 นอกจากนี้ยังพบยีนที่เป็น “Hot spot” สำหรับค่า *DiffScore* < -40 (ภาวะ demethylation) จำนวน 2 ยีน คือ *MSX1* และ *TCP11* และสำหรับค่า *DiffScore* > 40 (ภาวะ methylation) 4 ยีน คือ *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* และ *TH* โดยพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างเป็นลำดับ เช่น ยีน *MSX1* มีค่า β Value ลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มจากผิวหนังคนปกติ (Normal skin), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) และผิว (Involved skin) คือ 0.602, 0.420 และ 0.251 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2



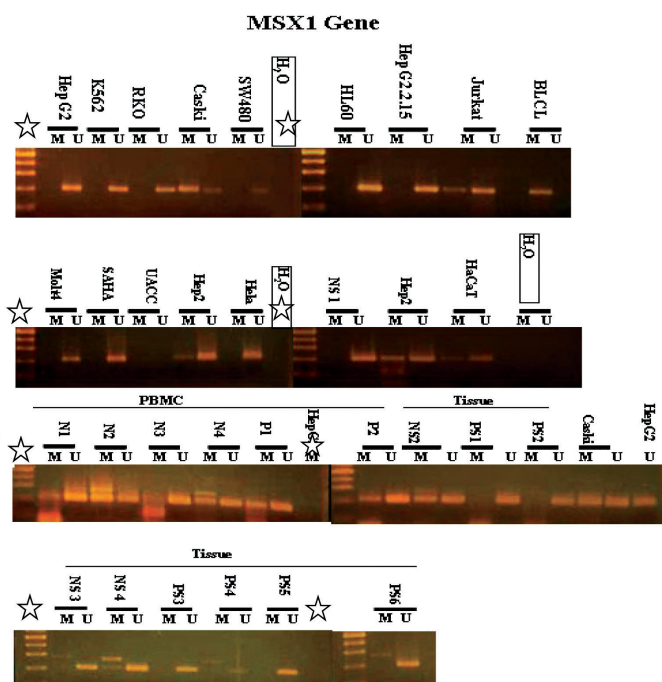
ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของยีนทั้งหมด จำนวนตำแหน่งซีพีจี (CpG) ทั้งหมด 27,578 ตำแหน่ง (ของจำนวนยีนทั้งหมด 14,495 ยีน) ระหว่างผิวหนังคนปกติ (Normal skin), ผิวหนังที่ไม่มีรอยโรค (Uninvolved skin) และผิว (Involved skin) ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ค่า *DiffScore*) ซึ่งแยกเป็น ก) ค่า *DiffScore* < -40 (ขบวนการเกิดดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน) และ ข) ค่า *DiffScore* > 40 (ขบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน)

ตารางที่ 2 ยีนที่มีความสำคัญ 6 ยีน และยีนที่มีรายงานที่มีความสัมพันธ์กับโรคสะเก็ดเงิน

SYMBOL	TargetID	ACCESSION	NS.AVG_Beta	US .AVG_Beta	IS.AVG_Beta
<i>MSX1</i>	cg01785568	NT_006051.17	0.6020483	0.4197896	0.2507048
<i>TCP11</i>	cg22407458	NM_018679.2	0.4433122	0.2945935	0.16112
<i>C16orf47</i>	cg17500962	NM_207385.1	0.3640586	0.612873	0.5986091
<i>HOXB1</i>	cg07823492	NM_002144.2	0.5164548	0.8563957	0.9095344
	cg17233506	NM_002144.2	0.2837003	0.4803769	0.6322188
<i>HTR3B</i>	cg06531741	NM_006028.3	0.3813598	0.5289409	0.6747844
<i>TH</i>	cg05912121	NM_199292.1	0.6278027	0.7132202	0.8366116
	cg08573687	NM_199292.1	0.6536191	0.7545237	0.8691378
<i>S100A9</i>	cg16139316	NM_002965.2	0.7513244	0.7351661	0.2919489
<i>BCAP31</i>	cg01910452	NM_005745.6	0.5188954	0.1628981	0.1689605
<i>ID4</i>	cg17252960	NM_001546.2	0.1637356	0.06758781	0.07560308

ยีนที่นำเสนอของโรคสะเก็ดเงิน (DNA methylated of candidate gene for psoriasis)

ยีน *MSX1* ทดสอบด้วยวิธีตรวจดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดย Methylation Specific Primer (MSP) กับ ก) เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line) จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ BLCL, RKO, SW480, HL60, HepG2, HepG2.2.1.5, K562, Malt4, SAHA, UACC, HeLa, CaSki, Jurkat, Hep2 และ HaCaT พบว่าเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) (โดยพบแถบ M, methylated form) กับเซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line) 4 ชนิด คือ CaSki, Jurkat,



ภาพที่ 4 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันของยีน *MSX1* ของเซลล์เพาะเลี้ยง ตัวอย่างชิ้นเนื้อ และตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือด M=methylated form และ U=unmethylated form, เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell line) BLCL, RKO, SW480, HL60, HepG2, HepG2.2.1.5, K562, Malt4, SAHA, UACC, HeLa, CaSki, Jurkat, Hep2 และ HaCaT (ผิวหนัง, PS=Involved skin) (ผิวหนังปกติ, NS= Normal skin), PBMC (คนปกติ, N=Normal, ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน, P=Psoriasis) เหมือนในภาพ ☆DNA marker, PCR product (M=206 bp และ U=ขนาด 199 bp)

Hep2 และ HaCaT ข) ทดสอบกับตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนนิวเคลียส (PBMC) จำนวน 6 ตัวอย่าง (คนปกติ, N=Normal, n=4 ตัวอย่าง ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน, P=Psoriasis, n=2 ตัวอย่าง) พบว่าให้ผลเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งหมด และ ค) ทดสอบกับตัวอย่างที่เป็นชั้นเนื้อ (tissue) จำนวน 10 ตัวอย่าง (ผิวหนังคนปกติ, NS=Normal skin, n=4 ตัวอย่าง), (ผื่น, PS=Involved skin, n=6 ตัวอย่าง) พบว่าผิวหนังคนปกติเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันจำนวน 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 75 ในขณะที่ผื่น (Involved skin) ไม่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 0 ดังแสดงในภาพที่ 4 และตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันของยีน *MSX1* ของเซลล์เพาะเลี้ยง ตัวอย่างชั้นเนื้อ และตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาว

ชนิดตัวอย่าง	การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (ร้อยละ)	
เซลล์เพาะเลี้ยง (n=15)	1. กลุ่มเซลล์เยื่อบุ (Epithelial) n=9 (3) ได้แก่ RKO, SW480, HepG2, HepG2.2.1.5, SAHA, UACC, HeLa, CaSki*, Hep2* และ HaCaT* ร้อยละ 33.3	2. กลุ่มเซลล์เม็ดเลือด (Hematopoietic) n=6 (1) ได้แก่ BLCL, HL60, K562, Malt4, SAHA และ Jurkat* ร้อยละ 16.6
เซลล์เม็ดเลือดขาว (n=6)	1. คนปกติ (Normal) n=4 (4) ร้อยละ 100	2. ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) n=2 (2) ร้อยละ 100
เนื้อเยื่อ (n=10)	1. คนปกติ (Normal) n=4 (3) ร้อยละ 75	2. ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (Psoriasis) n=6 (0) ร้อยละ 0

*แสดงตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยงที่เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชัน

วิจารณ์

การศึกษาดีเอ็นเอเมทิลเลชัน โดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์

ข้อมูลตามลักษณะดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (pattern of methylation) ที่แบ่งเป็นกลุ่มตัวอย่าง (Cluster) เป็นการแสดงถึงการเกิดเมทิลเลชันที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งซีพีจีในส่วนทั้งที่อยู่บนโปรโมเตอร์ หรือส่วนนอกของโปรโมเตอร์ของยีนนั้น ๆ ตามแต่ละชนิดของตัวอย่าง ซึ่งบ่งบอกถึงการเป็น tissue-specific gene ในเซลล์แต่ละชนิดได้เป็นอย่างดี⁽¹²⁾ และการศึกษาครั้งนี้เป็นการเริ่มต้นเพื่อให้ได้กลุ่มยีนที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งข้อมูลที่สำคัญและสอดคล้องกับยีนเหล่านี้ที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอเมทิลเลชันในโรคสะเก็ดเงิน เช่น *SHP-1* (*PTP1C*, *HCP*, *SH-PTP1*, *PTPN6*)⁽¹¹⁾ *p15*, *p16 ink* (*CDKN2A*, *MTS1*, *TP16*, *ARF*), *S100A9*, *PDCD5*, *TIMP2*⁽²⁰⁾ *SFRP* เกี่ยวข้องกับ *Wnt pathway*⁽²¹⁾ เป็นต้น

วิธีเมทิลเลชันไมโครอะเรย์สามารถค้นพบกลุ่มของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่สำคัญ โดยเมื่อหาความสัมพันธ์ของยีนระหว่าง Normal skin, Uninvolved และ Involved skin ในกลุ่มของยีนที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (*DiffScore*) ซึ่งแยกเป็น *DiffScore* < -40 และ *DiffScore* > 40 พบว่าในกลุ่มยีนของ Normal-uninvolved และ Normal-involved มียีนที่เหมือนกันจำนวน 388 ยีน และ 89 ยีน ตามลำดับ ซึ่งยีนกลุ่มนี้น่าจะเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการเกิดโรคของผู้ป่วย หรืออาจเป็นยีนที่มีความผิดปกติทำให้เกิดโรคสะเก็ดเงิน

โดยผ่าน Wnt signaling pathway, Infergin signaling pathway และ Cadherin Signaling pathway เป็นต้น⁽²²⁾ เช่น (*BCAP31*, *DXS9879E*, *EFNB1*, *ELK1*, *EMD*, *FLJ44112*, *GRIA3*, *IL13RA1*, *MSX1*, *OTUD5*, *PHF8*, *PLP2*, *RPL10*, *S100A9*, *SLC9A6*, *TSC22D3*, *WDR45*, *RAB33A*, *RPGR*, *CXorf40A* และ *CXorf34*) และ (*GPR81*, *HAK*, *HOXB1*, *HOXB3*, *HTR3B*, *IL11RA*, *IL17RC*, *ITGBL1*, *KCTD4*, *KIAA0240*, *KSP37*, *LGALS1*, *NUMBL*, *PHACTR3*, *PRX*, *RDH5*, *RHOJ*, *SLC7A11*, *SORBS3*, *SPRR1A* และ *TH*) นอกจากนี้แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ระดับปกติจนถึงเกิดเป็นโรค โดยมีรายงานที่สอดคล้องกับยีน *ID4* (inhibitor of differentiation 4) ที่พบว่าการแสดงออกของโปรตีนลดลงในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินในชั้นของคอร์เนียม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดพาราเคอราโตซิส⁽²³⁾ และยีน *BCAP 31* (B-cell receptor associated protein 31) ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในขบวนการดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน เป็นต้น⁽²⁴⁾ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างในกลุ่มยีนของ uninvolved-involved skin และ Normal-involved มียีนที่เหมือนกันจำนวน 145 ยีน และ 124 ยีน ตามลำดับ (*ABRA*, *ACADVL*, *ACOT11*, *ACOX2*, *ACVR1*, *ADAMTS13*, *BIK*, *BPIL1*, *BTBD4*, *C14orf68*, *C1orf42*, *C1orf52*, *C1orf61*, *GDF10*, *GDPD5*, *NNMT*, *NOX4*, *NPR2X*) และ (*FCGR3B*, *FFAR2*, *FGR*, *P2RY2*, *P53AIP1*, *PADI1*, *LAPTM5*, *LAT2* และ *LCE1B* เป็นต้น) สันนิษฐานว่ายีนกลุ่มนี้น่าจะเป็นยีนอยู่ในภาวะก่อนจะเกิดโรคสะเก็ดเงิน (prepsoriatic state) ซึ่งความผิดปกติขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด เช่น การถูกกระตุ้นด้วย infiltrating CD3+T-cells และ inflammatory DCs ทำให้เพิ่มการอักเสบมากขึ้น ยีนเหล่านี้อาจมีการแสดงออกมากขึ้น⁽²⁵⁾ นอกจากนี้ยีนกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ผ่านทาง Cadherin signaling pathway, Endothelin signaling pathway, PDGF signaling pathway⁽²²⁾ เป็นต้น

สำหรับค้นพบยีนที่มีภาวะดีเอ็นเอดีเมทิลเลชัน/ดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่อาจมีความสำคัญต่อการเกิดโรคสะเก็ดเงิน (Hot spot) ทั้งยีน *MSX1*, *TCP11*, *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* และ *TH* นั้น อาจนำมาใช้เป็น biomarker สำหรับโรคสะเก็ดเงินต่อไป ยีนนำเสนอ (candidate gene) *MSX1* (msh homeo box 1) เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม p16.2 มีความสำคัญกับการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell proliferation and differentiation) และ ectodermal organ morphogenesis โดยเฉพาะเซลล์ประสาท กระดูกและฟัน⁽²⁶⁾ มีการแสดงออกของยีน *MSX1* บริเวณที่มี tissue-tissue interaction และมีรายงาน mutation ของยีนนี้สัมพันธ์กับการเกิดโรคทางระบบประสาท โรค craniofacial disorders ความผิดปกติของฟัน⁽¹⁶⁾ และการลดการแสดงออกของ *MSX1* ในโรค osteonecrosis of jaw นอกจากนี้ยังมีรายงานการเกิด *MSX1* hypermethylation สัมพันธ์กับโรค childhood lymphoblastic leukemia⁽²⁷⁾ และสำหรับในการศึกษานี้พบว่าผื่นของผู้ป่วยโรคสะเก็ดมีการเกิดกระบวนการดีเอ็นเอดีเมทิลเลชันของยีน *MSX1* จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน *MSX1* มีความสำคัญกับการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตที่ผิดปกติของเซลล์หนังกำพร้า (keratinocyte) ของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน อย่างไรก็ตามยังคงต้องการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของการแสดงออกของระดับอาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน เพื่อทราบถึงบทบาทที่ชัดเจนของยีนนี้ในโรคสะเก็ดเงินต่อไป สำหรับการทดสอบกับกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งชนิดกลุ่มเซลล์เยื่อและกลุ่มเซลล์เม็ดเลือด ให้ผลลัพธ์การเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 33.3 กับร้อยละ 16.6) จึงยังไม่สามารถแยกความจำเพาะของยีนในการเป็น tissue specific gene ได้ การศึกษาโดยวิธีเมทิลเลชันไมโครอาร์เรย์มีข้อจำกัดเนื่องจากมีราคาแพง เทคนิคยุ่งยาก ต้องใช้ความชำนาญ และความเชี่ยวชาญอย่างมาก ทำให้สามารถศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติได้จำนวนจำกัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มผู้ป่วยและคนปกติให้มีจำนวนมากขึ้นเพื่อให้สามารถมีข้อมูลมากขึ้นนำไปใช้เป็น biomarker ได้อย่างแท้จริง

สรุป

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขบวนการดีเอ็นเอเมทิลเลชัน (DNA methylation) ในโรคสะเก็ดเงินแบบครอบคลุมยีนทั้งหมดโดยวิธี high through-put methylation microarray ซึ่งผลการศึกษา พบว่าวิธีนี้มีความน่าสนใจการทำนายการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเมทิลเลชันของยีนต่างๆ ที่ให้ผลสอดคล้องกับยีนที่เคยมีการรายงาน เช่น ยีน *ID4* เป็นต้น และการศึกษาแบบครอบคลุมยีนทั้งหมดนี้ ยังทำให้พบกลุ่มของยีนที่มีการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคสะเก็ดเงิน และค้นพบยีนใหม่ที่น่าสนใจที่เป็น Hot spot ของโรค นอกจากนี้ความสัมพันธ์ของยีนในแต่ละกลุ่มที่มีความแตกต่างกันหรือยีนที่จำเพาะ ยังคงจำเป็นต้องเพิ่มเติมศึกษาในเชิงลึกเพื่อให้ทราบบทบาทและหน้าที่ของกลุ่มยีนหรือยีนที่จำเพาะ ซึ่งนำไปสู่ความเข้าใจในพยาธิกำเนิดที่ชัดเจนมากขึ้น และอาจพัฒนาต่อไปสู่การรักษาแบบใหม่ๆ ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

ขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) สนับสนุนในโครงการวิจัย รหัสโครงการ RES5309830006 ดร. สุรศักดิ์ อยู่ยงสถิต วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารอ้างอิง

1. Nickoloff BJ, Nestle FO. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest* 2004; 113(12): 1664-75.
2. Christophers E. Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol* 2001; 26(4): 314-20.
3. Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15(1): 16-7.
4. Bowcock AM, Krueger JG. Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(9): 699-711.
5. Schön MP, Boehncke WH. Psoriasis. *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1899-912.
6. Nickoloff BJ, Qin JZ, Nestle FO. Immunopathogenesis of psoriasis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2007; 33(1-2): 45-56.
7. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429(6990): 457-63.
8. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6(8): 597-610.
9. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174(3): 341-8.
10. Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Shuangshoti S, Hirankarn N, Mutirangura A. SHP-1 promoter 2 methylation in normal epithelial tissues and demethylation in psoriasis. *J Mol Med (Berl)* 2006; 84(2): 175-82.

11. Brown SE, Fraga MF, Weaver IC, Berdasco M, Szyf M. Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics* 2007; 2(1): 54–65.
12. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, et al. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet* 2007; 3(10): 2023–36.
13. Bock C, Paulsen M, Tierling S, Mikeska T, Lengauer T, Walter J. CpG island methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequence, repeats, and predicted DNA structure. *PLoS Genet* 2006; 2(3): e26. (10 pages).
14. Yu YP, Paranjpe S, Nelson J, Finkelstein S, Ren B, Kokkinakis D, et al. High throughput screening of methylation status of genes in prostate cancer using an oligonucleotide methylation array. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 471–9.
15. Rauch T, Li H, Wu X, Pfeifer GP. MIRA-assisted microarray analysis, a new technology for the determination of DNA methylation patterns, identifies frequent methylation of homeodomain-containing genes in lung cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66(16): 7939–47.
16. Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet* 2003; 12 Spec No 1: R69–73.
17. Wanichnopparat W, Suwanwongse K, Pin-on P, Apornthewan C, Mutirangura A. Genes associated with the cis-regulatory functions of intragenic LINE-1 elements. *BMC Genomics* 2013; 14(1): 205.
18. Weisenberger DJ, Trinh BN, Campan M, Sharma S, Long TI, Ananthnarayan S, et al. DNA methylation analysis by digital bisulfite genomic sequencing and digital MethyLight. *Nucleic Acids Res* 2008; 36(14): 4689–98.
19. Naumova OY, Lee M, Koposov R, Szyf M, Dozier M, Grigorenko EL. Differential patterns of whole-genome DNA methylation in institutionalized children and children raised by their biological parents. *Dev Psychopathol* 2012; 24(1): 143–55.
20. Zhang P, Zhao M, Liang G, Yin G, Huang D, Su F, et al. Whole-genome DNA methylation in skin lesions from patients with psoriasis vulgaris. *J Autoimmun* 2013; 41: 17–24.
21. Bai J, Liu Z, Xu Z, Ke F, Zhang L, Zhu H, et al. Epigenetic downregulation of SFRP4 contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis. *J Immunol* 2015; 194(9): 4185–98.
22. Verma D, Ekman AK, Bivik Eding C, Enerbäck C. Genome-wide DNA methylation profiling identifies differential methylation in uninvolved psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol* 2018; 138(5): 1088–93.
23. Ruchusatsawat K, Wongpiyabovorn J, Protjaroen P, Chaipipat M, Shuangshoti S, Thorner PS, et al. Parakeratosis in skin is associated with loss of inhibitor of differentiation 4 via promoter methylation. *Hum Pathol* 2011; 42(12): 1878–87.



24. Ruchusatsawat K, Thiemsing L, Mutirangura A, Wongpiyabovorn J. BCAP 31 expression and promoter demethylation in psoriasis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2017; 35(2): 86-90.
25. Johnson-Huang LM, Suárez-Fariñas M, Pierson KC, Fuentes-Duculan J, Cueto I, Lentini T, et al. A single intradermal injection of IFN- γ induces an inflammatory state in both non-lesional psoriatic and healthy skin. *J Invest Dermatol* 2012; 132(4): 1177-87.
26. Alappat S, Zhang ZY, Chen YP. Msx homeobox gene family and craniofacial development. *Cell Res* 2003; 13(6): 429-42.
27. Dunwell TL, Hesson LB, Pavlova TV, Zabarovska V, Kashuba VI, Catchpoole D, et al. Epigenetic analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics* 2009; 4(3): 185-93.

Global DNA Methylated Gene of Involved Skin and Uninvolved Skin of Psoriasis Compared with Normal Skin by Methylation Microarray

Kriangsak Ruchusatsawat¹ Laddawan Thiemsing¹ Phantipa Protjaroen² and Jongkonnee Wongpiyabovorn²

¹National Institute of Health, Department of Medical Sciences, Tiwanon Road, Nonthaburi 11000

²Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Rama 4 Road, Pathumwan, Bangkok 10330, Thailand

ABSTRACT Psoriasis is 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 DNA methylation by methylation microarray in tissue from 6 involved skins and uninvolved skins of chronic plaque type psoriasis patients compared to 6 normal skins from healthy controls. There are 6 candidate genes, *MSX1*, *TCP11*, *C16orf47*, *HOXB1*, *HTR3B* and *TH*. *MSX1* gene was selected from methylation microarray data and was analyzed DNA methylation correlated with genes expression in keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) compared between psoriasis and normal controls, using methylation specific primer (MSP). DNA methylation occurred in three of four samples of normal skins, accounting for 75%. Whereas DNA methylation from 6 of all 6 involved skin samples were represented 0%. In conclusion, the present study is the first study using high through-put technique (methylation microarray) to investigate DNA methylation in psoriasis. The result of methylation microarray could indicate the significant the candidate genes for further studying in psoriasis. Moreover, this study demonstrated DNA methylation plays an important role in pathogenesis and course of psoriasis

Keywords: Psoriasis, DNA methylation, Methylation microarray, *MSX1*