

การเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียในลำไส้หนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับผงชูรสเรื้อรัง

ทัศนพงษ์ พงษ์กิจ^{1,2,4}, รุ่งทิวา แดงตาโคตร¹, สุดารัตน์ อ่อนสุระทุม^{3,5}, อรุณา เอ้านันท^{3,4}, พรทิพย์ ปิ่นละอ^{2,4,*}

Received: August 26, 2019

Revised: September 20, 2019

Accepted: September 27, 2019

บทคัดย่อ

แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้มนุษย์มีมากกว่า 1,000 สปีชีส์ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีอิทธิพลต่อโฮสต์ทั้งในสภาวะปกติและเป็นโรค ปัจจุบันการบริโภคอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนของแบคทีเรียในลำไส้ ขณะนี้พบว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยเฉพาะในจังหวัดขอนแก่น มีค่าเฉลี่ยของปริมาณการบริโภคผงชูรสในอัตราที่สูง อย่างไรก็ตามการศึกษาในมนุษย์ไม่ได้ควบคุมปัจจัยภายนอกต่างๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อแบคทีเรียในลำไส้ และการศึกษาในสัตว์ทดลองก็ใช้เทคนิคไม่เหมาะสมซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผลการศึกษา ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการบริโภคผงชูรสปริมาณสูงต่อการเปลี่ยนของแบคทีเรียในลำไส้หนูแฮมสเตอร์ การศึกษาครั้งนี้ แบ่งสัตว์ทดลองเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มหนูแฮมสเตอร์ที่กินอาหารปกติ และกลุ่มหนูแฮมสเตอร์ที่กินอาหารปกติร่วมกับผงชูรสในน้ำดื่มที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเลี้ยงต่อเป็นเวลา 4 เดือน ต่อมาเมื่อครบกำหนดจึงเก็บตัวอย่างมูลหนู เพื่อสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียและวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA ที่ตำแหน่ง V3-V4 จากนั้นตรวจการเปลี่ยนของแบคทีเรียในลำไส้ ด้วยวิธี next-generation sequencing โดยคณะผู้วิจัยพบว่าความหลากหลายของแบคทีเรียแบบ alpha diversity ลดลงในกลุ่มที่ได้รับผงชูรสเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ และมีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในจีนัส *Methanobrevibacter*, *Desulfovibrio*, *Akkermansia* และ *Roseburia* ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วนและภาวะเมตาบอลิกซินโดรม โดยสรุป หนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับผงชูรสเป็นเวลา 4 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียในลำไส้และความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ลดลง การศึกษาครั้งนี้อาจเพิ่มความตระหนักถึงความสำคัญของการบริโภคผงชูรสปริมาณสูง ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดปัญหาสุขภาพ และข้อมูลที่ได้อาจนำไปใช้ประยุกต์เป็นตัวบ่งชี้โมโครไบโอม เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะโรคอ้วนและภาวะเมตาบอลิกซินโดรมในอนาคตได้

คำสำคัญ: แบคทีเรียในลำไส้, ผงชูรส, การวิเคราะห์ลำดับเบสรุ่นใหม่, หนูแฮมสเตอร์

¹ชีวเวชศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

³ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

⁴กลุ่มวิจัยป้องกันและชะลอโรคไตเรื้อรังในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

⁵ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

* ผู้รับผิดชอบบทความ

Gut microbiome changes in hamsters chronically exposed to monosodium glutamate

Thatsanapong Pongking^{1,2,4}, Rungtiwa Dangtakot¹, Sudarat Onsurathum^{3,5},
Ornuma Haonon^{3,4}, Porntip Pinlaor^{2,4,*}

Abstract

There are more than 1,000 species of human gut bacteria, which have the impact on host homeostasis and diseases. Nowadays, dietary consumption plays a crucial role in gut microbiota alteration. Currently, In Northeast Thailand, especially in Khon Kaen province, high average consumption rate of monosodium glutamate (MSG) is observed. However, a study in human do not control confounding factors and animal study was conducted by an improper technique which may have affect on gut microbiota results. Herein, we aimed to investigate the effect of high MSG consumption on gut microbiota alteration in hamsters. In this study, hamsters were divided into two groups as follows: hamsters fed with normal chow diet, and hamsters fed with chow diet and supplemented with MSG 20 mg/ml in drinking water for 4 months. Consequently, hamster feces were collected for bacterial DNA extraction. Then, investigation of gut microbiota alteration was performed by next-generation sequencing targeting V3-V4 region of the 16S rRNA gene. The result revealed that, bacterial alpha diversity in MSG group were decreased compared with normal controls. Moreover, increasing of metabolic syndrome-associated bacteria including bacteria in genus *Methanobrevibacter*, *Desulfovibrio*, *Akkermansia* and *Roseburia* were observed in MSG-fed hamsters. In conclusion, hamsters chronically exposed to high MSG for long-term changes gut microbiota and decreases bacterial alpha diversity. These findings may raise awareness on high dose MSG consumption in relation to health problem. In addition, gut microbiome profile might be applied as microbiome-based marker for screening risk in the obesity and metabolic syndrome in the future.

Keywords: Gut microbiome, Monosodium glutamate, Next-generation sequencing, Hamster

¹Biomedical Sciences, Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand

²The Centre for Research and Development of Medical Diagnostic Laboratories (CMDL),
Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand

³Department of Parasitology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand

⁴Chronic Kidney Disease Prevention in The Northeast of Thailand (CKDNET),
Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand

⁵Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

*Corresponding author: (e-mail: porawa@kku.ac.th)

บทนำ

ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีแบคทีเรียอาศัยอยู่มากกว่า 100 ล้านล้านเซลล์ ซึ่งมีมากกว่าเซลล์ในร่างกายของมนุษย์ถึงสิบเท่า⁽¹⁾ โดยจำนวนและชนิดของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น เพศ อายุ เชื้อชาติ ลักษณะทางภูมิศาสตร์ กระบวนการเมตาบอลิซึม ระบบภูมิคุ้มกันของแต่ละคน การออกกำลังกาย รวมทั้งการบริโภคอาหาร ซึ่งพฤติกรรมการบริโภคอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อจำนวนและชนิดของแบคทีเรียในลำไส้⁽²⁾ โดยปกติแบคทีเรียในลำไส้มีหน้าที่ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเจริญเติบโต ช่วยปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย ช่วยย่อยและดูดซึมสารอาหาร และช่วยร่างกายสังเคราะห์วิตามินต่างๆ^(3, 4) แบคทีเรียสองไฟลัมที่พบมากที่สุด ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ แบคทีเรียชนิดดีไฟลัม Firmicutes และแบคทีเรียไฟลัม Bacteroidetes⁽⁵⁾ โดยแบคทีเรียในไฟลัมดังกล่าวถูกใช้เป็นตัวชี้วัดความไม่สมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ (gut dysbiosis)⁽⁶⁾ ซึ่งเป็นภาวะความไม่สมดุลของแบคทีเรียชนิดดีและชนิดไม่ดีในลำไส้⁽⁷⁾ ภาวะดังกล่าวนี้ก่อให้เกิดความผิดปกติของร่างกายและโรคต่าง ๆ เช่น โรคภูมิแพ้ โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคหัวใจและหลอดเลือด และภาวะเมตาบอลิกซินโดรม เป็นต้น

ผงชูรส (monosodium glutamate) คือ สารปรุงแต่งรสชาติอาหาร ที่มีอัตราการบริโภคที่สูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะในจังหวัดขอนแก่น⁽⁸⁾ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า การบริโภคผงชูรสปริมาณสูงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว และการเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม ที่อาจจะนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ตามมา นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่าการกินผงชูรสเป็นเวลานานก่อให้เกิดภาวะความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ไต นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไต อีกทั้งยังมีการเหนี่ยวนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีบทบาทในกระบวนการอักเสบเข้ามาสู่บริเวณเนื้อเยื่อไตชั้นนอก (renal cortex) และยังเป็นสาเหตุของการบวม น้ำของเซลล์ไต (edema) และเกิดการ

บาดเจ็บของไตในที่สุด⁽⁹⁾ นอกจากนี้ยังมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าผงชูรสส่งผลต่อการบาดเจ็บของไต โดยการเพิ่มอนุมูลอิสระจากกระบวนการ lipid peroxidation จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้สุกร พบว่าการกินผงชูรสส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียชนิด *Faecalibacterium prausnitzii* และ *Roseburia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับสารที่เป็นแหล่งพลังงานให้กับโฮสต์⁽¹⁰⁾ ต่อมาได้มีการศึกษาผลกระทบของการบริโภคผงชูรสปริมาณ 2 กรัมต่อวัน ต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียชนิด *Faecalibacterium*, *Megamonas*, *Blautia* รวมไปถึง *Collinsella* มีแนวโน้มที่จะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับกลุ่มคนสุขภาพดี⁽¹¹⁾ โดยการเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะนำไปสู่ความไม่สมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดความผิดปกติของร่างกายหรือกระตุ้นการดำเนินของโรคต่างๆ ได้ด้วย⁽¹²⁾

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Feng และคณะ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียในลำไส้สุกร โดยใช้เทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) ซึ่งวิธีดังกล่าวมีวิธีการที่ยุ่งยากและเสียเวลาอีกทั้งยังมีความไวที่ต่ำกว่าวิธีเทคนิคขั้นสูง⁽¹³⁾ เช่น วิธี next-generation sequencing ซึ่งอาจมีผลให้การสำรวจไม่ครอบคลุมแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ และอาจไม่พบแบคทีเรียบางกลุ่มที่มีการเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ การศึกษาดังกล่าวได้ทำการทดสอบในมนุษย์ ซึ่งปริมาณผงชูรสที่ได้รับไม่สอดคล้องกับปริมาณการบริโภคเฉลี่ยของคนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 0.4-14 กรัมต่อวัน⁽⁸⁾ ยิ่งไปกว่านั้นการวิจัยในมนุษย์มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง และเป็นไปได้ยากที่จะควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ เช่น การบริโภคอาหารในชีวิตประจำวัน การช้ยาและสารเคมี และกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกายแต่ละคน อีกทั้งในการศึกษาดังกล่าวใช้ระยะเวลาเพียง 5 สัปดาห์เท่านั้น ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ได้ ดังนั้นการศึกษารั้งนี้ ผู้วิจัย

จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการบริโภคผงชูรสปริมาณสูงต่อการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้หนูแฮมสเตอร์ โดยใช้เทคนิคขั้นสูง คือ next-generation sequencing โดยตั้งสมมติฐานว่าการบริโภคผงชูรสปริมาณสูงเป็นเวลานาน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ได้ และลดความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

1. จริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลองและการออกแบบการทดลอง

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองจริยธรรมในสัตว์ทดลอง จากคณะกรรมการจริยธรรมในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยขอนแก่น หมายเลขโครงการ ACUC-KKU-51/2559 ผู้วิจัยใช้หนูแฮมสเตอร์เพศผู้ (*Mesocricetus auratus*) อายุระหว่าง 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 100-120 กรัมเลี้ยงที่หน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยเลี้ยงภายใต้แสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมง และความมืด 12 ชั่วโมง ให้อาหารสัตว์ทดลองสำเร็จรูป (Smart Heart, Thailand) และน้ำดื่มแบบไม่จำกัดปริมาณ ทำความสะอาดกรงเลี้ยงด้วยน้ำยาล้างจาน (Sunlight, Unilever, Thailand) และน้ำยาฆ่าเชื้อจุลชีพ (Dettol, Thailand) จำนวน 3-4 ครั้งต่อสัปดาห์ เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของแบคทีเรียจากกรงเลี้ยงสัตว์ แบ่งหนูแฮมสเตอร์ออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มที่กินอาหารปกติ (กลุ่มควบคุมปกติ) จำนวน 10 ตัว และกลุ่มที่กินอาหารปกติร่วมกับได้รับผงชูรส (Commercial grade, Bangkok, Thailand) ในน้ำดื่ม ในความเข้มข้น 20 มก./มล. จำนวน 10 ตัว เป็นเวลา 4 เดือน เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการการุณยฆาต เพื่อเก็บตัวอย่างสำหรับการทดลองต่อไป ขั้นตอนดำเนินการวิจัยแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

2. การเก็บตัวอย่างมูลหนูแฮมสเตอร์และการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย

ผู้วิจัยได้ทำการเก็บมูลหนูแฮมสเตอร์โดยเทคนิคปราศจากเชื้อ ด้วยใช้มีดและกรรไกรผ่าตัดปราศจากเชื้อผ่าลำไส้และเก็บอุจจาระโดยตรงจากลำไส้ให้หลุดทดลองปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียต่อไป สำหรับการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย ผู้วิจัยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป TIANamp Stool DNA kit (Tiangen Biotech, Beijing) และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้โดยเครื่อง NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธี gel electrophoresis ด้วย 1.5% agarose gel

ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น ดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมารวมกันเป็นกลุ่ม กลุ่มละหนึ่งตัวอย่าง

3. การเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA

ผู้วิจัยได้ทำการตรวจหาและเพิ่มจำนวนชุดดีเอ็นเอ แบคทีเรียของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ต่อ V3-V4 region (Forward: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3', Reverse primer: 5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3') ของเซลล์โพรแคริโอตด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย dNTP 0.3 µM, 1 เท่าของพีซีอาร์บัฟเฟอร์ที่มี MgCl₂ 1 mM, primers 0.25 µM, platinum Taq DNA polymerase 0.025 U และ DNA template 42-100 ng และปรับให้ได้ปริมาตรสุทธิด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลอดควบคุมผลลบจะไม่ใส่ DNA template ลงไป ส่วนหลอดควบคุมผลบวกใช้ DNA template ของเชื้อ แบคทีเรียอ้างอิง *Helicobacter pylori* ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเครื่อง C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) เริ่มต้นด้วย pre-denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น เข้าสู่ปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 30 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 40 วินาที ตามด้วย annealing ที่ 52.8°C เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่ 72°C เป็นเวลา 2 นาที และ final extension ที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจ PCR product โดยใช้ 100 bp Plus DNA Ladder maker ปริมาตร 5 µl ผสม loading dye ปริมาตร 1 µl ใน 1.5% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นตรวจ ดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง transilluminator ซึ่ง PCR product จะมีขนาด 456 bp

4. การหาลำดับเบสของแบคทีเรียโดยวิธี next-generation sequencing และการวิเคราะห์ทาง ชีวสารสนเทศ

ตรวจหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA โดยใช้ HiSeq 2500 platform (Illumina Inc., California, USA) ขั้นตอนของการหาลำดับเบสด้วย Illumina เริ่มต้นด้วย

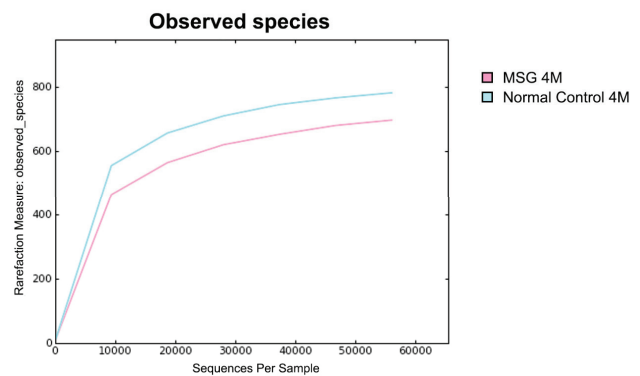
ดีเอ็นเอของแบคทีเรียจะถูกทำให้เป็นชิ้นเล็กๆ (fragment) โดยทั้งสองข้างของแต่ละชิ้น (paired end) จะถูกเชื่อมต่อกันด้วย adaptor ชนิดพิเศษที่เปรียบเหมือนบาร์โค้ดและ มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอชิ้นนั้นๆ ซึ่งลำดับเบสที่หาได้ จะถูกเรียกว่า read ซึ่ง paired-end read จะถูกนำมา เทียบกันโดยใช้โปรแกรม FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>)⁽¹⁴⁾ เมื่อมี read ที่มีส่วนที่ เหลื่อมกันจะถูกอ่านให้เป็น read ใหม่ ซึ่งจะถูกเรียกว่า raw tags ต่อจากนั้น raw tags ที่มีคุณภาพสูงจะถูกกรอง โดยโปรแกรม QIIME (Version 1.7.0, http://qiime.org/scripts/split_libraries_fastq.html) ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการ คัดกรอง raw tags ที่จะทำได้ raw tags ที่มีคุณภาพสูง ได้ใช้เกณฑ์เดียวกันกับการศึกษาก่อนหน้านี้⁽¹⁵⁾ หลังจากได้ tags ที่มีคุณภาพสูง tags จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับฐาน ข้อมูลอ้างอิง โดยใช้ UCHIME-algorithm (http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) เพื่อทำการตรวจหาลำดับเบสที่ปนเปื้อน (chimera sequences) และทำการลบออกไป⁽¹⁶⁾ ท้ายสุดจะได้ tags ที่มีประสิทธิภาพ ต่อจากนั้น tags ที่มีประสิทธิภาพจะถูก นำไปเทียบหา operational taxonomic units (OTUs) โดยใช้โปรแกรม UPARSE software (UPARSE v7.0.1001 <http://drive5.com/uparse/>)⁽¹⁷⁾ ซึ่ง tags ที่มีความเหมือน ร้อยละ ≥ 97 กับ OTUs ใด ๆ จะถูกจัดเข้าไปอยู่ใน OTUs นั้น ๆ หลังจากนั้นจะมีเพียงลำดับเบสเดียวเท่านั้น ที่ถูกเลือกให้เป็นตัวแทนของแต่ละ OTU เพื่อนำไปเปรียบ เทียบกับฐานข้อมูลและทำการวิเคราะห์อนุกรมวิธาน ของเชื้อแบคทีเรีย ในขั้นตอนวิเคราะห์อนุกรมวิธาน ลำดับ เบสที่เป็นตัวแทนของแต่ละ OTU จะถูกนำไปเปรียบ เทียบกับฐานข้อมูลอ้างอิง SSU rRNA database of SILVA database (<http://www.arb-silva.de/>)⁽¹⁸⁾ เพื่อระบุ kingdom, phylum, class, order, family และ genus ข้อมูลความชุกของ OTUs จะถูกทำให้เป็นมาตรฐาน (normalized) ด้วยระดับของจำนวนลำดับเบสมาตรฐาน ที่มีความสอดคล้องกับตัวอย่างที่มีลำดับเบสจำนวนน้อย ที่สุด หลังจากนั้นข้อมูลที่ถูกทำให้เป็นมาตรฐานแล้ว จะถูก นำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ (alpha diversity) ซึ่งได้แก่ observed species ซึ่งใน

ขั้นตอนนี้จะใช้โปรแกรม QIIME (version 1.7.0) ในการคำนวณและใช้โปรแกรม R software (version 2.15.3) ในการแสดงผล

ผลการศึกษา

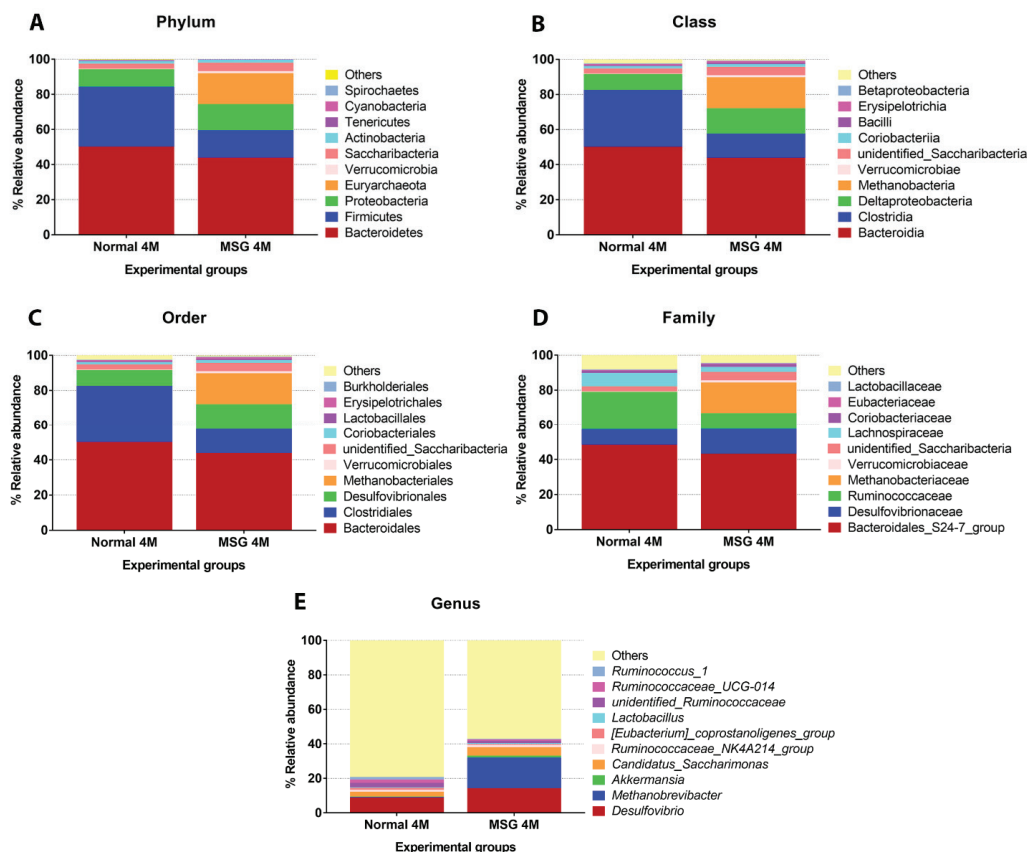
จากผลการหาลำดับเบส และนำ tags ที่มีคุณภาพสูงมาคำนวณหาค่า alpha diversity แล้ว ดังแสดงใน **รูปที่ 2** พบว่ากลุ่มหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับผงชูรสในน้ำดื่มเป็นเวลา 4 เดือน มีความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้แบบ alpha diversity น้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารและน้ำแบบปกติ และจากตัวอย่างทั้งหมดสามารถจำแนกแบคทีเรียได้เป็นระดับ 15 phyla, 28 classes, 39 orders, 65 families และ 150 genera จากนั้นทำการคัดเลือกชนิดแบคทีเรียที่มีความชุกสูงสุด 10 อันดับแรกในแต่ละตัวอย่าง เพื่อสร้างแผนภูมิฮิสโตแกรมในรูปแบบร้อยละของความชุกแบคทีเรียแต่ละชนิด ในระดับ phylum, class, order, family และ genus ดังแสดงใน **รูปที่ 3**

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่า การจำแนกแบคทีเรียระดับไฟลัมที่มีความชุกเด่นชัด ซึ่งสามารถพบได้ทั้งสองกลุ่มการทดลอง ได้แก่ Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria และ Saccharibacteria ส่วนกลุ่มที่ได้รับผงชูรสพบแบคทีเรียในไฟลัม Euryarchaeota มีระดับเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติถึง 94.35 เท่า (Normal = ร้อยละ 0.19 , MSG = ร้อยละ 17.66) แต่เป็นที่น่าสนใจว่าการลดลงของแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes ถึงร้อยละ 6.24 (Normal = ร้อยละ 50.21, MSG = ร้อยละ 43.97) และ Firmicutes ร้อยละ 18.56 (Normal = ร้อยละ 34.13, MSG = ร้อยละ 15.57) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนของไฟลัม Firmicutes ต่อ Bacteroidetes มีค่าลดลงในกลุ่มที่ได้รับผงชูรส (Normal = ร้อยละ 0.68, MSG = ร้อยละ 0.35)



รูปที่ 2 Alpha diversity ของ read ลำดับเบสดีเอ็นเอแบคทีเรีย ที่ได้จากมูลของหนูแฮมสเตอร์ที่ได้รับอาหารปกติ และอาหารที่เสริมด้วยผงชูรสนาน 4 เดือน

การจำแนกแบคทีเรียระดับ class (**รูปที่ 3B**) พบว่าค่าร้อยละความชุกแบคทีเรียในลำไส้ที่โดดเด่นทั้งสองกลุ่มการทดลอง มี class Bacteroidia>Clostridia>Deltaproteobacteria>unidentified_Saccharibacteria>Coriobacteriia ส่วนกลุ่มที่ได้รับผงชูรส พบว่าแบคทีเรีย class Methanobacteria ถูกตรวจพบมากที่สุด คิดเป็น 94.35 เท่าของกลุ่มควบคุมปกติ นอกจากนี้เมื่อเทียบค่าร้อยละความชุกกับของกลุ่มที่ได้รับผงชูรสกับกลุ่มควบคุมปกติ พบว่าแบคทีเรียใน class Bacteroidia ลดลงร้อยละ 6.23 และ Clostridia ลดลงร้อยละ 18.56 แต่เป็นที่น่าสนใจคือเชื้อแบคทีเรียในอนุกรมวิธาน class Deltaproteobacteria, unidentified_Saccharibacteria, Verrucomicrobiae มีการเพิ่มขึ้นจากค่าความชุกของกลุ่มควบคุมปกติ ร้อยละ 5.36, 1.99 และ 0.97 ตามลำดับ

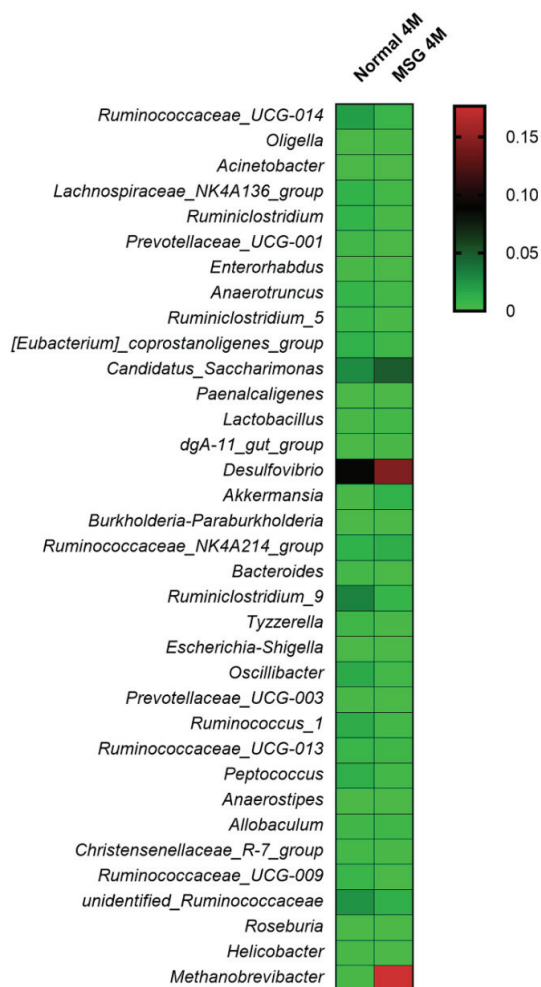


รูปที่ 3 องค์ประกอบของแบคทีเรียในลำไส้หนูแฮมสเตอร์ ที่ระดับอนุกรมวิธานต่าง ๆ ประกอบไปด้วย ระดับ phylum class, order, family และ genus ระหว่างกลุ่มควบคุมปกติและกลุ่มที่ได้รับผงชูรสนาน 4 เดือน (A = ระดับ phylum, B = ระดับ Class, C = ระดับ Order, D = ระดับ Family และ E = Genus)

การจำแนกแบคทีเรียระดับ order (รูปที่ 3C) ค่าร้อยละความชุก 5 ลำดับแรกของแบคทีเรียในลำไส้ที่โดดเด่นในทุกกลุ่มการทดลองพบว่า order Bacteroidales>Clostridiales>Desulfovibrionales>unidentified_Saccharibacteria>Verrucomicrobiales นอกจากนี้แบคทีเรีย order Methanobacteriales มีค่าความชุกสูงสุดในกลุ่มที่ได้รับผงชูรส คิดเป็นร้อยละ 17.47 ที่เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมปกติ ยิ่งไปกว่านั้นแบคทีเรียใน order Desulfovibrionales, unidentified_Saccharibacteria และ Verrucomicrobiales ในกลุ่มที่ได้รับผงชูรส มีค่าความชุกเพิ่มขึ้น ร้อยละ 1.58, 5.37 และ 1.69 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมปกติ

เมื่อเน้นไปที่ระดับ family (รูปที่ 3D) พบว่าค่าร้อยละความชุกของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มที่มีความโดดเด่น

เด่น 4 ลำดับแรก ได้แก่ family Bacteroidales_S24-7_group>Ruminococcaceae>Desulfovibrionaceae>Lachnospiraceae และเป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อหนูได้รับผงชูรสพบว่าแบคทีเรีย family Methanobacteriaceae มีความชุกสูงขึ้นเพิ่มขึ้น 94.35 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ นอกจากนี้ยังพบว่า family Desulfovibrionaceae และ unidentified_Saccharibacteria เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับผงชูรสเช่นเดียวกัน โดยมีค่าเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมปกติร้อยละ 5.36 และ 1.99 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน family Ruminococcaceae, Bacteroidales_S24-7_group และ Lachnospiraceae มีค่าร้อยละความชุกลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ ร้อยละ 12.44, 5.12, และ 4.75 ตามลำดับ



รูปที่ 4 Heat map ของแบคทีเรียในระดับ genus ที่มีความโดดเด่นมากที่สุด 35 อันดับ ในหนูแฮมสเตอร์ กลุ่มควบคุมปกติและกลุ่มที่ได้รับผงชูรสนาน 4 เดือน

พบแบคทีเรีย 4 genus ที่มีความโดดเด่นในลำไส้ของหนูทดลองทั้งสองกลุ่ม แสดงในรูปที่ 3E ได้แก่ *Desulfovibrio*>*Candidatus_Saccharimonas*>*unidentified_Ruminococcaceae*>*Ruminococcaceae_UCG-014* ตามลำดับ แต่เป็นที่น่าสนใจว่า แบคทีเรีย genus *Methanobrevibacter* มีการเพิ่มสูงขึ้นอย่างเด่นชัดในหนูที่ได้รับผงชูรส โดยเพิ่มขึ้น 94.32 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ นอกจากนี้ยังพบว่า *Desulfovibrio*, *Candidatus_Saccharimonas* และ *Akkermansia* มีค่าร้อยละความชุกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ โดยเพิ่มขึ้น 1.60, 1.69 และ 5.37 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ผล heatmap ของแบคทีเรียในระดับ genus

มี 35 อันดับ ที่มีความโดดเด่นมากที่สุด (รูปที่ 4) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ *Helicobacter*, *Prevotellaceae_UCG-001*, *Paenaltcaligenes*, *Bacteroides*, *Ruminiclostridium*, *Oscillibacter*, *Ruminococcaceae_UCG-009*, *Ruminiclostridium_9*, *Tyzzerella*, *Peptococcus* และ *Ruminococcus_1* มีการลดลง 24, 7.14, 6.1, 4.81, 4.52, 4.37, 4.20, 3.84, 3.72, 3.67 และ 3.57 เท่า ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามกลุ่มที่ได้รับผงชูรส พบ *Candidatus_Saccharimonas*, *Paraburkholderia*, *Oligella*, *Desulfovibrio*, *dgA-11_gut_group*, *Burkholderia* และ *Roseburia* เพิ่มขึ้น 1.70, 1.50, 1.98, 1.60, 1.57, และ 1.45 เท่าตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การบริโภคผงชูรสสามารถเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียในลำไส้ได้ ซึ่งปริมาณของผงชูรสที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ อยู่ในช่วงปริมาณที่ประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยบริโภคอยู่เป็นประจำ คือ ค่าเฉลี่ย 0.4-14 กรัมต่อวัน⁽⁸⁾ ซึ่งสอดคล้องกับแนวโน้มการบริโภคผงชูรสที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มประชากรดังกล่าว การศึกษารั้งนี้ผู้วิจัยได้รายงานให้เห็นว่าการบริโภคอาหารที่มีผงชูรสสูงนั้นสามารถลดความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ (alpha diversity) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้⁽¹¹⁾ รวมทั้งยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของแบคทีเรียในลำไส้ อีกทั้งยังลดสัดส่วนของแบคทีเรียชนิดดีและไม่ดีบางชนิดที่ก่อให้เกิดภาวะไม่สมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ได้ ซึ่งส่งผลให้มีการเพิ่มของแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคอ้วนและภาวะเมตาบอลิกซินโดรม ได้แก่ *Desulfovibrio*, *Methanobrevibacter*, *Akkermansia* และ *Roseburia*

จากการศึกษาก่อนหน้าของ Feng และคณะ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ในสุกร โดยใช้เทคนิค denaturing gradient gel electrophoresis และหลังจากนั้นนำมาหาลำดับเบสและทำ q-PCR ในการหาปริมาณแบคทีเรียเพื่อนำมาคำนวณความชุก วิธีดังกล่าวมีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อนและมีค่าความไวต่ำกว่า

การวิเคราะห์ลำดับเบสแบบ next-generation sequencing ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลำดับเบสจำนวนมากในเวลาเดียวกัน (massive parallel sequencing)^(10, 13) นอกจากนี้การศึกษาของ Peng และคณะ ถึงแม้ว่าจะมีการใช้เทคนิค next-generation sequencing ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้มนุษย์หลังจากได้รับผงชูรส แต่การศึกษาในมนุษย์มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้ที่ควบคุมได้ยากกว่าการศึกษาในสัตว์ทดลอง อีกทั้งยังใช้ความเข้มข้นของผงชูรสที่อยู่ในช่วงของการบริโภคของคนทั่วไป ซึ่งไม่สะท้อนถึงการบริโภคผงชูรสในปริมาณที่สูงของกลุ่มประชากรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย^(2, 8, 11) การศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ จึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในลำไส้หลังจากได้รับผงชูรสในปริมาณที่สัมพันธ์กับการบริโภคผงชูรสเฉลี่ยของคนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย⁽⁸⁾ โดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นโมเดลในการศึกษาที่สามารถควบคุมปัจจัยที่เป็นตัวแปรกวน (confounding factor) ได้

จากการหาลำดับเบสด้วยวิธี next-generation sequencing ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง V3-V4 ของยีน 16S rRNA ของโพรแคริโอตแสดงให้เห็นว่าการบริโภคผงชูรสปริมาณสูงเป็นเวลา 4 เดือน สามารถลดความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ และลดสัดส่วนแบคทีเรีย Firmicutes ต่อ Bacteroidetes ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรหลักของแบคทีเรียในลำไส้ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการบริโภคผงชูรสเป็นเวลานานนั้นเป็นหนึ่งในปัจจัยของการบริโภคในชีวิตประจำวันที่สามารถก่อให้เกิดความไม่สมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ได้ นอกจากนี้ยังทำให้แบคทีเรีย genus *Methanobrevibacter*, *Oligella*, *Desulfovibrio*, *Akkermansia*, *Burkholderia-Paraburkholderia*, และ *Roseburia* เพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้า^(10, 11) *Methanobrevibacter* เป็นอาร์เคียแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน phylum Euryarchaeota โดยการศึกษาก่อนหน้านี้มีการรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียชนิดนี้ในลำไส้มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอ้วน⁽²⁰⁾ ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวนี้เมื่อมีปริมาณสูงในลำไส้จะมีส่วนช่วยในการหมัก

อาหารที่มีไขมันสูงและเปลี่ยนให้เป็นกรดอะมิโนสายสั้น (short chain fatty acid) ซึ่งเมื่อสารเหล่านี้มีปริมาณสูงในร่างกายแล้ว จะไปกระตุ้นการสร้างและเก็บสะสมไขมันในร่างกายและนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและโรคอ้วนในที่สุด⁽²¹⁾ การเพิ่มขึ้นของ *Methanobrevibacter* นั้นอาจมีสาเหตุจากการบริโภคผงชูรสปริมาณสูง เนื่องจาก *Methanobrevibacter* มีความสามารถในการกระบวนการเมตาบอลิซึมของ glutamate ที่เป็นองค์ประกอบของผงชูรสได้⁽²²⁾ ในทำนองเดียวกันแบคทีเรีย genus *Desulfovibrio* ก็มีความสามารถในการกระบวนการเมตาบอลิซึมของ glutamate เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ *Desulfovibrio* นี้ อาจสืบเนื่องมาจากการได้รับผงชูรส จากสมมติฐานที่ว่า การเพิ่มขึ้นของแบคทีเรีย genus *Desulfovibrio* อาจทำให้เกิดโรคอ้วนได้นั้น ถูกสนับสนุนโดยรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่า *Desulfovibrio* เป็นแบคทีเรียที่มีการเพิ่มสูงขึ้นในคนและสัตว์ที่มีภาวะอ้วน อีกทั้งยังมีความสามารถในการสร้าง endotoxin lipid A ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของ lipopolysaccharides และนำไปสู่การอักเสบในระดับต่ำได้ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะอ้วนและเบาหวานในที่สุด⁽²³⁾ ส่วนแบคทีเรีย genus *Akkermansia* นั้น มีหลักฐานว่ามีความสัมพันธ์กับการสร้าง *p-cresol sulfate* ซึ่งเป็นของเสียในปัสสาวะ (uremic toxin)⁽²⁴⁾ และยังมีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของ *p-cresol sulfate* ในกระแสเลือดมีความสัมพันธ์กับการตายจากโรคหัวใจและหลอดเลือด⁽²⁵⁾ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า แบคทีเรีย genus *Roseburia* มีความสอดคล้องกันกับการศึกษาก่อนหน้า^(10, 11) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ *Roseburia* นั้นสามารถอธิบายได้จากการที่แบคทีเรีย genus ดังกล่าวมีความสามารถในการเปลี่ยน glutamate ไปเป็น butyrate ได้^(26, 27) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของ butyrate ยังมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่ามีความเกี่ยวข้องและเป็นสาเหตุของการเกิดเพิ่มการสะสมของไขมันและกระตุ้นให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) รวมทั้งภาวะความทนทานต่อน้ำตาลบกพร่อง (impaired glucose tolerance) อีกทั้งยังไปเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไขมัน (lipogenic genes) ในหนูทดลองอีกด้วย⁽²⁸⁾

จากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าการบริโภค ผงชูรสสามารถที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรมได้ในสัตว์ทดลอง^(29, 30) และสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ น้ำหนักนอกจากนี้ในทุก ๆ การเพิ่มปริมาณของการใช้ ผงชูรส 1 กรัม จะเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรมในคน⁽⁸⁾ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการบริโภค ผงชูรสเป็นปัจจัยโดยตรงที่ทำให้เกิดโรคอ้วนและภาวะ เมตาบอลิกซินโดรมได้ และยังตรวจพบการเปลี่ยนของ แบคทีเรียในลำไส้หนูแฮมสเตอร์หลังจากได้รับผงชูรส โดยมีการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียในกลุ่มที่ถูกรายงานว่า มีความสัมพันธ์ทั้งโดยตรงและโดยอ้อมกับการเกิดโรคอ้วน และภาวะเมตาบอลิกซินโดรม ซึ่งชี้ให้เห็นว่านอกจาก ผลกระทบโดยตรงที่ก่อให้เกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม จากการบริโภคผงชูรสแล้ว การที่แบคทีเรียในลำไส้เปลี่ยน ไปอาจจะเป็นปัจจัยโดยอ้อมหรือปัจจัยที่ส่งเสริมในการ เกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรมได้ อย่างไรก็ตามการศึกษา ในครั้งนี้เป็นเพียงการดูแนวโน้มการเปลี่ยนของแบคทีเรีย ในลำไส้หนูแฮมสเตอร์หลังจากได้รับผงชูรสเท่านั้น ไม่ได้มี การใช้เครื่องมือทางชีวสถิติในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ ของแบคทีเรียกับการเกิดภาวะเมตาบอลิกซินโดรม อีกทั้ง การศึกษาในครั้งนี้นี้ยังมีข้อจำกัดในการตรวจวิเคราะห์ ตัวอย่าง เนื่องจากผู้วิจัยได้สกัดและนำตัวอย่างดีเอ็นเอ จากหนูทุกตัว แต่ได้นำดีเอ็นเอจากหนูแต่ละตัวมารวมกัน ในแต่ละกลุ่มทดลอง แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี next-generation sequencing เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม ดังนั้นจึงไม่มีค่าสถิติจากการวิเคราะห์ ซึ่งอาจจะมีการแก้ไข หรือพัฒนาต่อไปในการศึกษาในอนาคต

โดยสรุป การศึกษานี้เป็นการสำรวจการ เปลี่ยนของแบคทีเรียในลำไส้หนูแฮมสเตอร์หลังจากได้รับ ผงชูรสเป็นเวลา 4 เดือน ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การบริโภคผงชูรสเป็นเวลานาน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด การเปลี่ยนของแบคทีเรียในลำไส้และลดความหลากหลาย ของแบคทีเรียในลำไส้ นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้น ของแบคทีเรียกลุ่มที่มีความเกี่ยวข้องกับภาวะเมตาบอลิก ซินโดรม ซึ่งการศึกษานี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญ ที่จะทำให้ประชาชนตระหนักถึงผลของการบริโภคผงชูรส ในปริมาณสูงซึ่งอาจเสี่ยงต่อการเกิดโรคความผิดปกติของ

สุขภาพได้ นอกจากนี้การเปลี่ยนของแบคทีเรียในลำไส้ อาจนำไปใช้เป็น microbiome-based biomarker เพื่อใช้ประเมินความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอ้วนและภาวะ เมตาบอลิกซินโดรมโดยเฉพาะในประชากรที่มีอัตราการ บริโภคผงชูรสสูงได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนศูนย์วิจัยและพัฒนาการ ตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ (ศวป.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาแก่นายทัศนพงษ์ พงษ์กิ่ง ขอขอบคุณกลุ่มวิจัย CKDNET ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.สมชาย ปิ่นละออ ในการให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้ รวมถึงสมาชิกในห้องปฏิบัติการและ ผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010; 90(3): 859-904.
2. Muegge BD, Kuczynski J, Knights D, Clemente JC, Gonzalez A, Fontana L, et al. Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science.* 2011; 332(6032): 970-4.
3. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JL. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr.* 2002; 22: 283-307.
4. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(29): 8787-803.
5. Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, Backhed F, Nyren P, Engstrand L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS One.* 2008; 3(7): e2836.

6. Hu J, Luo H, Wang J, Tang W, Lu J, Wu S, et al. Enteric dysbiosis-linked gut barrier disruption triggers early renal injury induced by chronic high salt feeding in mice. *Exp Mol Med*. 2017; 49(8): e370.
7. Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004; 53(1): 1-4.
8. Insawang T, Selmi C, Cha'on U, Pethlert S, Yongvanit P, Areejitranusorn P, et al. Monosodium glutamate (MSG) intake is associated with the prevalence of metabolic syndrome in a rural Thai population. *Nutr Metab (Lond)*. 2012; 9(1): 50.
9. Sharma A. Monosodium glutamate-induced oxidative kidney damage and possible mechanisms: a mini-review. *J Biomed Sci*. 2015; 22: 93.
10. Feng ZM, Li TJ, Wu L, Xiao DF, Blachier F, Yin YL. Monosodium L-Glutamate and Dietary Fat Differently Modify the Composition of the Intestinal Microbiota in Growing Pigs. *Obes Facts*. 2015;8(2):87-100.
11. Peng QN, Huo DX, Ma CC, Jiang SM, Wang LS, Zhang JC. Monosodium glutamate induces limited modulation in gut microbiota. *J Funct Foods*. 2018; 49: 493-500.
12. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2015; 26: 26191.
13. Yu L, Zhang W, Liu L, Yang J. Determining Microeukaryotic Plankton Community around Xiamen Island, Southeast China, Using Illumina MiSeq and PCR-DGGE Techniques. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0127721.
14. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011; 27(21): 2957-63.
15. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat Methods*. 2013; 10(1): 57-9.
16. Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward DV, Giannoukos G, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res*. 2011; 21(3): 494-504.
17. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011; 27(16): 2194-200.
18. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73 (16): 5261-7.
19. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(Database issue): D590-6.
20. Mbakwa CA, Penders J, Savelkoul PH, Thijs C, Dagnelie PC, Mommers M, et al. Gut colonization with *Methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development. *Obesity (Silver Spring)*. 2015; 23(12): 2508-16.
21. Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(26): 10011-6.

22. Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, et al. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(25): 10643-8.
23. Zhang-Sun W, Augusto LA, Zhao L, Caroff M. *Desulfovibrio desulfuricans* isolates from the gut of a single individual: structural and biological lipid A characterization. *FEBS Lett*. 2015; 589(1): 165-71.
24. Visconti A, Le Roy CI, Rosa F, Rossi N, Martin TC, Mohny RP, et al. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *bioRxiv*. 2019: 561787.
25. Nataatmadja M, Cho Y, Campbell K, Johnson D. The Roles of Indoxyl Sulphate and p-Cresyl Sulphate in Patients with Chronic Kidney Disease: A Review of Therapeutic Options. 2018.
26. Jiang S, Xie S, Lv D, Wang P, He H, Zhang T, et al. Alteration of the gut microbiota in Chinese population with chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 2870.
27. Buckel W, Barker HA. Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J Bacteriol*. 1974; 117(3): 1248-60.
28. Huang Y, Gao S, Chen J, Albrecht E, Zhao R, Yang X. Maternal butyrate supplementation induces insulin resistance associated with enhanced intramuscular fat deposition in the offspring. *Oncotarget*. 2017; 8(8): 13073-84.
29. Olguin M, Marta Delia P, Revelant G, Marinozzi D, Labourdette V, María Rosa V. Monosodium Glutamate Affects Metabolic Syndrome Risk Factors on Obese Adult Rats: A Preliminary Study. *Journal of Obesity and Weight-loss Medication*. 2018; 4.
30. Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC, et al. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. *Nutrition*. 2005; 21(6): 749-55.