

Identification of Key RNA Target from Human Neutrophils Associated with *Salmonella* Infection

Tanakorn Thongsima¹, Aorawee Thammachataree¹ and Donporn Riyapa^{1*}

¹Center for Research Innovation and Biomedical Informatics, Faculty of Medical Technology,
Mahidol University, Nakhon Pathom Province, Thailand

Abstract

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) typically causes food-borne gastroenteritis which has a major impact on global public health. The pathological hallmark of *S. Typhimurium*-induced enterocolitis in humans is associated with a massive neutrophil influx into the intestine. Uncontrolled activation and infiltration of neutrophils lead to dysregulation of inflammatory responses and tissue damage. Studies about transcriptomes have been conducted, leading to a growing database and resources for transcriptomics analyses. The aim of this study was to identify key RNA targets from human neutrophils associated with *Salmonella* infection by using data in public transcriptome databases. The obtained neutrophil gene data were subsequently processed with simple arrangement. The results demonstrated that diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2) gene was chosen among 137 significant neutrophil genes relevant to *Salmonella* infection when compared to healthy controls. Moreover, this target was considered as a novel target in relation to *Salmonella* or neutrophils. Thus, this chosen target gene was suitable to be applied for further study. To investigate a role of neutrophil DGAT2 in bacterial killing *in vitro* study, human neutrophils isolated from healthy subjects were infected with *S. Typhimurium* in the presence or absence of DGAT2 inhibitor and intracellular survival of bacteria was assessed. The results indicated that the numbers of intracellular bacteria were significantly higher in the presence of DGAT2 inhibitor (177.17 ± 46.52 CFU/ml) than in the absence of DGAT2 inhibitor (77.33 ± 23.72 CFU/ml) at 60 minutes of incubation, suggesting that targeted DGAT2 plays an important role in improving efficiency of neutrophil-mediated killing. This research utilized and extracted transcriptome data derived from databases for further *in vitro* studies to create valuable new knowledge related to the pathogenesis of infectious diseases.

Keywords: Neutrophils, *Salmonella*, Diacylglycerol O-acyltransferase 2, DGAT2

*Corresponding author E-mail address: donporn.riy@mahidol.ac.th

Received: 20 January 2025

Revised: 14 May 2025

Accepted: 17 May 2025

การค้นหาอาร์เอ็นเอเป้าหมายสำคัญจากเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Salmonella*

ธนกร ทองลิมา¹ อรวี ธรรมชาตอารี¹ และ ดลพร ริยะปา^{1*}

ศูนย์วิจัยพัฒนานวัตกรรมและชีวการแพทย์สารสนเทศ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม

บทคัดย่อ

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium หรือ *Salmonella* Typhimurium ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารอักเสบที่ยังคงเป็นปัญหาสุขภาพทั่วโลก ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่เด่นชัดเกิดจากการตอบสนองของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลจำนวนมากที่เคลื่อนที่ไปบริเวณลำไส้ที่มีการติดเชื้อเพื่อกำจัดเชื้อโรค ส่งผลให้เนื้อเยื่อเกิดการอักเสบและถูกทำลาย ในปัจจุบันมีงานวิจัยเกี่ยวกับทรานสคริปโตมจำนวนมาก ทำให้เกิดผลผลิตและข้อมูลมากมายที่ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูล ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการค้นหาอาร์เอ็นเอเป้าหมายสำคัญจากนิวโทรฟิลที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Salmonella* ผ่านกระบวนการสืบค้นข้อมูลการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในผู้ป่วยติดเชื้อ *Salmonella* จากฐานข้อมูลสาธารณะ และนำข้อมูลยีนของนิวโทรฟิลที่ได้มาวิเคราะห์และจัดเรียงอย่างง่าย ผลการค้นหาอาร์เอ็นเอเป้าหมายพบว่ายีน diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2) เป็นยีนที่ถูกคัดเลือกจากทั้งหมด 137 ยีนของนิวโทรฟิลที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในผู้ป่วยติดเชื้อ *Salmonella* เทียบกับผู้ที่ไม่มีสุขภาพดี และเป็นยีนที่ไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวข้องกับเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลมาก่อน การค้นพบนี้บ่งชี้ความใหม่จะนำไปใช้ศึกษาต่อยอด เมื่อนำยีน DGAT2 ไปศึกษาต่อเกี่ยวกับบทบาทในการกำจัดเชื้อ *Salmonella* โดยนิวโทรฟิลในหลอดทดลอง โดยนำนิวโทรฟิลที่แยกได้จากอาสาสมัครสุขภาพดีมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *S. Typhimurium* ในสภาวะที่มีหรือไม่มี DGAT2 inhibitor และนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายในเซลล์ ผลการทดลองพบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่มี DGAT2 inhibitor (177.17 ± 46.52 CFU/ml) มากกว่าในสภาวะที่ไม่มี DGAT2 inhibitor (77.33 ± 23.72 CFU/ml) อย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 60 นาที ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของยีนเป้าหมาย DGAT2 ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อของนิวโทรฟิลลดลง ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงเป็นการใช้ประโยชน์จากการสกัดข้อมูลทรานสคริปโตมที่หลากหลายในฐานข้อมูลสำหรับการศึกษาต่อยอดในการทดลองจริงในหลอดทดลอง เพื่อทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ที่มีคุณค่าที่เกี่ยวกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคติดเชื้อ

คำสำคัญ: นิวโทรฟิล, *Salmonella*, diacylglycerol O-acyltransferase 2, DGAT2

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: donporn.riy@mahidol.ac.th

รับบทความ: 20 มกราคม 2568

แก้ไขบทความ: 14 พฤษภาคม 2568

รับตีพิมพ์บทความ: 17 พฤษภาคม 2568

บทนำ

เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลหรือโพลีมอร์โฟนิวเคลียร์นิวโทรฟิล (polymorphonuclear neutrophils) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันที่พบมากที่สุดในเลือด และทำหน้าที่กำจัดเชื้อจุลินทรีย์ผ่านกลไกแบบไม่จำเพาะ โดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) เมื่อเชื้อจุลินทรีย์เข้ามาในร่างกาย นิวโทรฟิลจะเคลื่อนที่ไปจับกินเชื้อจุลินทรีย์เข้ามาอยู่ในถุงฟาโกโซม และเมื่อรวมกับเอนไซม์หรือโปรตีนที่อยู่ในไลโซโซมจะเกิดการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ขึ้น⁽¹⁻²⁾ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไนโคตินาไมด์อะซิไดไนโคตินคลีโอไทด์ฟอสเฟต ออกซิเดส หรือ NADPH oxidase ที่อยู่บริเวณผิวของฟาโกโซม ทำให้เกิดการสังเคราะห์อนุมูลอิสระหรืออนุพันธ์ออกซิเจน (reactive oxygen species หรือ ROS) รวมถึงการปล่อยเอนไซม์และโปรตีน (degranulation) ของนิวโทรฟิล ซึ่งมีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้เช่นกัน⁽³⁾

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของสาธารณสุขทั่วโลก โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium หรือ *Salmonella* Typhimurium เป็นหนึ่งในเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis)⁽⁴⁻⁵⁾ เมื่อร่างกายได้รับเชื้อ *Salmonella* จะปรากฏลักษณะทางพยาธิสภาพสำคัญที่เกิดจากกลไกการเคลื่อนที่ของนิวโทรฟิลจำนวนมากไปบริเวณช่องภายในลำไส้เล็กเพื่อทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคผ่านกระบวนการฟาโกไซโทซิส การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่านิวโทรฟิลสามารถลดการยึดเกาะของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium บริเวณผนังลำไส้ (colonization) และทำให้ปริมาณเชื้อในลำไส้ลดลง⁽⁶⁻⁷⁾ ในหนูทดลองที่อยู่ในสภาวะนิวโทรฟิลต่ำหรือ neutropenia

จะเกิดการติดเชื้อทั่วร่างกาย (systemic infection) ส่งผลให้หนูตายภายในเวลาอันสั้น⁽⁷⁾ อย่างไรก็ตามผลจากการตอบสนองของนิวโทรฟิลระหว่างการติดเชื้อ *Salmonella* จะเกิดการหลั่งสารอนุมูลอิสระ ROS และสารก่อการอักเสบไซโตไคน์ ส่งผลให้เนื้อเยื่อบริเวณลำไส้อักเสบและถูกทำลาย สูญเสียโครงสร้างและการเรียงตัวของเนื้อเยื่อ (epithelial barrier) ทำให้การดูดซึมของเหลวจากลำไส้เข้าสู่ร่างกายน้อยลง จึงก่อให้เกิดอาการท้องเสีย อีกทั้งผู้ป่วยที่มีการติดเชื้ออาจเกิดอาการอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ปวดบิดในท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และมีอาการไข้⁽⁸⁻⁹⁾ ผู้ป่วยที่มีสุขภาพดีจะสามารถฟื้นตัวจากอาการต่าง ๆ ได้เองภายใน 4-7 วัน โดยไม่ต้องรับการรักษา อย่างไรก็ตามในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติหรือภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunocompromised host) พบว่าการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม non-typhoidal *Salmonella* จะทำให้การติดเชื้อรุนแรงขึ้นและเชื้อแพร่กระจายผ่านทางระบบน้ำเหลือง เข้าสู่ปอด ตับ และกระแสเลือด (sepsis) ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้⁽¹⁰⁻¹²⁾

ในปัจจุบันมีการศึกษาการแสดงออกของยีนหรือโปรตีนที่สำคัญในนิวโทรฟิลต่อการตอบสนองต่อเชื้อ *Salmonella* จำนวนมาก เช่น การศึกษาบทบาทของเอนไซม์ myeloperoxidase⁽¹³⁻¹⁴⁾ เอนไซม์ neutrophil elastase⁽¹⁵⁾ และโปรตีน S100⁽¹⁶⁾ เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ยังเป็น underlying mechanism หรือที่ไม่เคยมีการศึกษาในบริบทของการตอบสนองของนิวโทรฟิลระหว่างการติดเชื้อ *Salmonella* มาก่อน จึงนำไปสู่วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้ โดยคณะผู้วิจัยมีแนวคิดในการค้นหาวาร์เอ็นเอเป้าหมายสำคัญจากเซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลที่สัมพันธ์กับการติดเชื้อ *Salmonella* ผ่านกระบวนการสืบค้นจากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมในฐานข้อมูลสาธารณะ^(17, 18) จากนั้น

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์และจัดเรียงข้อมูลอย่างง่าย เพื่อคัดเลือกรายการที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญในผู้ที่ติดเชื้อ *Salmonella* และยีนดังกล่าวต้องไม่เคยมีการศึกษาทางด้านเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลมาก่อน ซึ่งจะบ่งชี้ได้ถึงความใหม่ของยีนที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อยอดในหลอดทดลอง (*in vitro*) ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดองค์ความรู้จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมที่ถูกเก็บไว้มาทำให้เกิดข้อมูลที่มีคุณค่าและประโยชน์สูงสุด และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อยอดได้จริงในหลอดทดลอง เพื่อให้ทราบถึงกลไกและบทบาทสำคัญของยีนดังกล่าวในระหว่างที่มีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและพยาธิสภาพในการติดเชื้อ

วัสดุและวิธีการ

1. การค้นหาอาร์เอ็นเอเป้าหมาย

ค้นหาฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Salmonella* จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมสาธารณะของสถาบัน SIDRA Medicine ประเทศกาตาร์ ซึ่งมีการเก็บรวบรวมข้อมูลทั้งหมด 74 ฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอจากการศึกษาทรานสคริปโตมในโรคติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) ด้วยวิธีการ microarray ดังปรากฏในเว็บไซต์ <http://sepsis.gxbsidra.org/dm3/geneBrowser/list> แล้วทำการคัดเลือกเฉพาะยีนของนิวโทรฟิล (neutrophil-rich genes) ทั้งหมด 374 ยีนที่อ้างอิงมาจากเว็บไซต์ Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>) ในฐานข้อมูลทรานสคริปโตมที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อ *Salmonella* ที่ได้จากการค้นหา หลังจากนั้น คัดเลือกเฉพาะยีนของนิวโทรฟิลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อ *Salmonella* เทียบกับกลุ่มสุขภาพดี จากการใช้สถิติ unpaired t-test โดยการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($p < 0.05$) และนำยีนที่ได้จากการคัดเลือก ไปค้นหาจำนวนบทความในฐานข้อมูล PubMed ผ่านเว็บไซต์ <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> ซึ่งคำค้นหาประกอบด้วยชื่อยีน สัญลักษณ์หรือคำย่อของยีนปีที่ตีพิมพ์อยู่ในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1990 ถึง 2024 และค้นหาเพิ่มเติมว่ายีนดังกล่าวเคยมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลมาก่อนหรือไม่ ดังแสดงในตัวอย่าง

- “gene name” OR gene symbol AND 1990:2024 [dp] [ti]

- “gene name” OR gene symbol AND *Salmonella* AND 1990:2024 [dp] [ti]

- “gene name” OR gene symbol AND *Salmonella* AND Neutrophil AND 1990:2024 [dp] [ti]

หลังจากนั้น บันทึกจำนวนบทความที่ปรากฏบน PubMed ของยีนทั้งหมดที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มผู้ที่ติดเชื้อ *Salmonella* เทียบกับกลุ่มสุขภาพดีจากการคัดเลือกและจัดลำดับยีนโดยพิจารณาจากจำนวนบทความ โดยเรียงจากจำนวนบทความที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลน้อยไปถึงมาก ซึ่งจำนวนบทความน้อยหรือไม่จะจัดเป็น high priority แสดงถึงความใหม่ (novelty) ที่จะทำการศึกษาต่อไป

2. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

เจาะเก็บเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 3 ราย ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2567 ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2567 สำหรับเกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครสุขภาพดี มีช่วงอายุ 18-35 ปี ไม่มีประวัติโรคประจำตัว ไม่มีภาวะการอักเสบหรือเป็นไข้ และไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ สำหรับเกณฑ์การคัดออกของอาสาสมัคร เป็นผู้ที่รับประทานยาโรค เช่น ยาโรคเบาหวาน ยาต้านเชื้อไวรัส ยาคุมกำเนิด

รวมถึงการมีปัญหาสภาพเรื้อรัง การศึกษานี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหิดล รหัสโครงการ MU-MOU 2023/147.0205

3. การแยกเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลโดยวิธีปั่นเหวี่ยงที่ความถ่วงจำเพาะ 1.077

แยกเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วยหลักการ density gradient centrifugation⁽¹⁷⁾ โดยเจาะหลอดเลือดดำเพื่อเก็บเลือด และใช้เฮพารินเป็นสารกันเลือดแข็ง นำเลือดมาผสมกับสารละลาย 3% Dextran (Pharmacosmos, Denmark) เพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงตก จากนั้นเก็บส่วนใสด้านบนซึ่งจะประกอบไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด เรียกว่า leukocyte-rich plasma เพื่อมาทำการแยกชั้นของ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) และนิวโทรฟิล โดยใช้ยา Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, USA) ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.077 และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บชั้นของนิวโทรฟิลที่อยู่ติดกับชั้นเม็ดเลือดแดงบริเวณส่วนปลายของหลอดทดลอง และกำจัดเม็ดเลือดแดงที่ปนเปื้อนด้วยน้ำโดยใช้หลักการ hypotonic lysis นำเซลล์ที่ได้มาปั่นล้างด้วย Hank's balanced salt solution (Gibco, USA) ที่ความเร็ว 1,800 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นิวโทรฟิลที่แยกได้จะนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 (Gibco, USA) ที่มี 10% fetal bovine serum (Invitrogen, USA) ในการทดลองต้องใช้นิวโทรฟิลที่เตรียมใหม่ทุกครั้งและทำการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (viability) ด้วยวิธี trypan blue exclusion และความบริสุทธิ์ (purity) ด้วยวิธี Wright's stain ผลการทดสอบการมีชีวิตและความบริสุทธิ์ของนิวโทรฟิลให้ผลมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ หลังจากนั้นปรับปริมาณนิวโทรฟิลให้มีจำนวน 3×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

4. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Typhimurium ใน LB broth (TM Media, India) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาปั่นล้างเชื้อด้วย phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 3 ครั้ง ตะกอนเชื้อจะถูกผสมกับ PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และปรับความเข้มข้นเชื้อเป็น 10^8 CFU/ml จากนั้นใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% fetal bovine serum ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้เป็น multiplicity of infection (MOI) หรือสัดส่วนของจำนวนเชื้อแบคทีเรียต่อจำนวนนิวโทรฟิลที่ 1 และ 3

5. การทดสอบความเป็นพิษของ DGAT2 inhibitor ต่อนิวโทรฟิล ด้วยวิธี MTS assay

DGAT2 inhibitor (PF-06424439, Cayman, USA) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จะถูกทำลายด้วยน้ำ และนำไปเจือจางด้วย RPMI media ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับการทดสอบ ได้แก่ 1, 5, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ นำนิวโทรฟิลที่แยกโดยวิธีปั่นเหวี่ยง มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะมีและไม่มี DGAT2 inhibitor ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ข้างต้น เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เติมน้ำยา MTS (MTS, Promega, USA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (Multiskan SkyHigh, Thermo Scientific, USA)

6. การทดสอบการกำจัดเชื้อของนิวโทรฟิลด้วยวิธี bacterial colony count assay

เพาะเลี้ยงนิวโทรฟิลในสภาวะไม่มีและมี DGAT2 inhibitor ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติมเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่ MOI 1 และ 3 เพาะเลี้ยงนาน 30 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เติมยาปฏิชีวนะ Gentamycin (HiMedia, USA) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และเพาะเลี้ยง 30 นาทีต่อ เพื่อกำจัดเชื้อแบคทีเรียภายนอกเซลล์ เมื่อครบเวลานับล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง และทำการแตกเซลล์ (cell lysis) โดยเติม 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำ colony count โดยนำตัวอย่างในแต่ละสภาวะไปกระจายลงใน LB agar plate บ่มในตู้เพาะเลี้ยงเชื้อ ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง⁽¹⁹⁾ ซึ่งการทดลองชุดนี้จะเรียกเป็นเวลาเริ่มต้น หรือ T0 สำหรับการทดลองอีกชุดนิวโทรฟิลจะถูกเพาะเลี้ยงต่อเนื่องนาน 60 นาทีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี Gentamycin ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ซึ่งเรียกเป็นเวลา 60 นาที หรือ T60 จากนั้นนับจำนวนโคโลนีเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออยู่ในเซลล์โดยเปรียบเทียบสภาวะที่มีและไม่มี DGAT2 inhibitor ในแต่ละช่วงเวลา

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

งานวิจัยนี้ได้ออกแบบการทดลองเป็นการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่อิสระต่อกัน ใช้สถิติวิเคราะห์ unpaired t-test เปรียบเทียบผลการทดลองใน

สภาวะที่ต่างกัน โดยใช้ซอฟต์แวร์คอมพิวเตอร์ คือ GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA) และกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ p -value น้อยกว่า 0.05

ผลการวิจัย

1. การค้นหาอาร์เอ็นเอเป้าหมาย

ผลการค้นหาฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของสถาบัน SIDRA Medicine ที่อยู่ในสาธารณะ พบฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella* จำนวน 1 ฐานข้อมูล หรือ 1 dataset จากฐานข้อมูลทั้งหมด 74 datasets คือ “A Blood Transcriptional Diagnostic Assay for Septicemic Melioidosis” รหัส GSE69528⁽²⁰⁾ ซึ่งได้จากการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในเลือดผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) จำนวน 83 ราย ด้วยวิธี microarray จากฐานข้อมูลดังกล่าวพบข้อมูลผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella* จำนวน 3 ราย ซึ่งจะถูกลำข้อมูลการแสดงออกของอาร์เอ็นเอมาเปรียบเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดีที่ไม่มีการติดเชื้อที่มาจาก dataset เดียวกัน จำนวน 28 ราย โดยจะเลือกเปรียบเทียบข้อมูลเฉพาะยีนของนิวโทรฟิลที่อยู่ในฐานข้อมูล Human Protein Atlas จำนวน 374 ยีน ผลการทดสอบทางสถิติพบว่ามียีนของนิวโทรฟิลทั้งหมด 137 ยีนจากทั้งหมด 374 ยีน ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p น้อยกว่า 0.05) ระหว่างกลุ่มผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella* และกลุ่มผู้มีสุขภาพดี (Fig. 1)

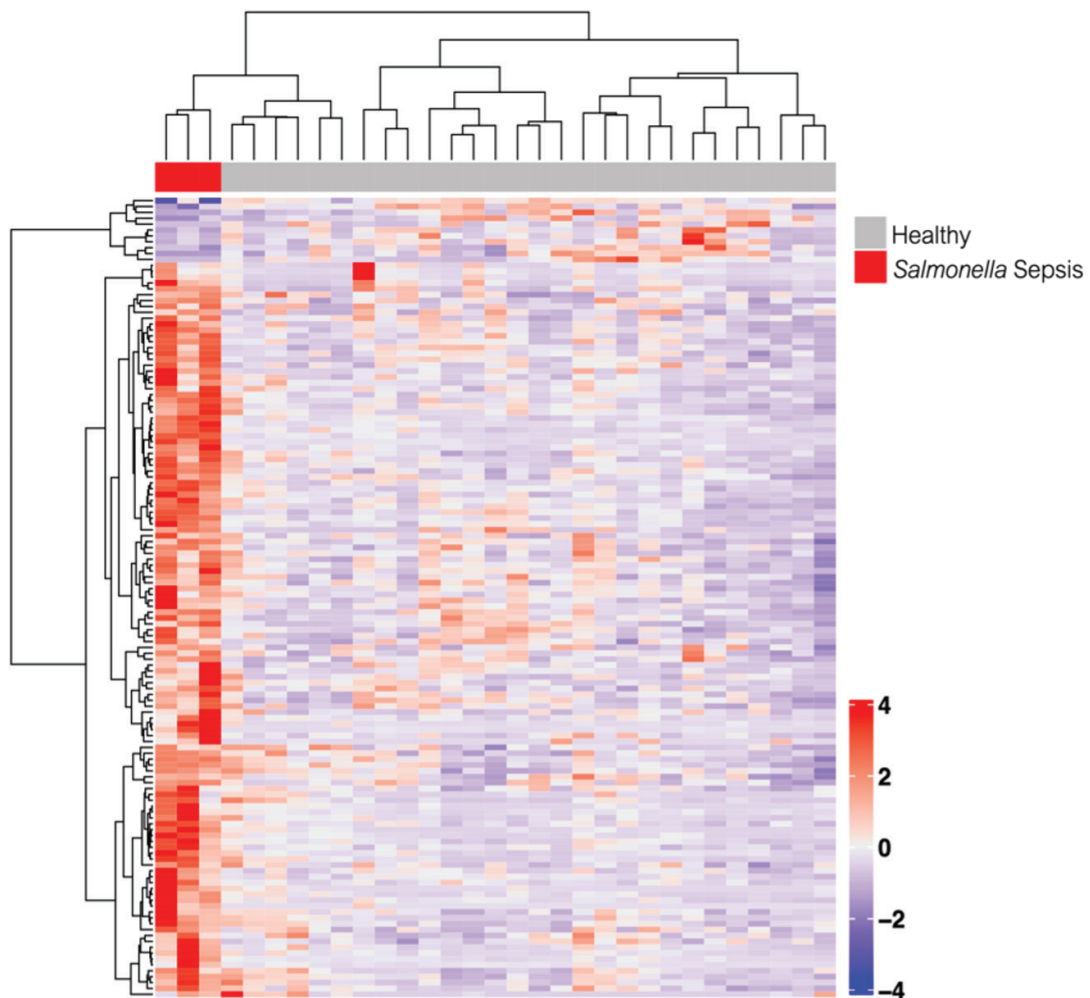


Fig. 1 Heat map representing the relative mRNA expression levels in *Salmonella*-infected and healthy subjects. Analysis of 137 significantly upregulated or downregulated neutrophil genes in patients with sepsis caused by *Salmonella* ($n = 3$) was compared to those in healthy individuals ($n = 28$). The color bar depicts the color contrast levels of the heat map. Red and blue indicate high and low expression levels, respectively.

จากนั้นนำยีนนิวโทรฟิลทั้งหมด 137 ยีน ไปสืบค้นหาจำนวนบทความในฐานข้อมูล PubMed เพื่อค้นหาว่ายีนดังกล่าวเคยมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลมาก่อนหรือไม่ จากตารางด้านล่างแสดงการจัดเรียงยีนในกลุ่ม High priority จำนวน 10 ยีน จากยีนทั้งหมด 137 ยีน โดยพิจารณาเรียงความสำคัญจาก (Table 1)

(1) เลือกจำนวนบทความที่เกี่ยวข้องกับเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลน้อยไปถึงมาก ซึ่งจำนวนบทความน้อยหรือไม่จะจัดเป็น high priority แสดงถึงความใหม่ (novelty) ดังแสดงในตารางแกลวสีฟ้า

(2) จากนั้นเรียงลำดับตามจำนวนบทความทั้งหมดที่ศึกษาเฉพาะยีนนั้นจากมากไปน้อย แสดงถึงในปัจจุบันยีนดังกล่าวยังคงมีความสำคัญและมีการศึกษาอยู่ในบริบทอื่น ๆ ดังแสดงในตารางแกลวสีเหลือง

(3) ทำการยืนยันและจัดเรียงยีนใหม่ในกลุ่ม High priority จำนวน 10 ยีน ซึ่งยีนดังกล่าวต้องมีการแสดงออกเฉพาะในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด

นิวโทรฟิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสืบค้นข้อมูลใน transcriptomic dataset รหัส GSE60424 ที่ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในกลุ่มเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด โดยทำการทดสอบทางสถิติของการแสดงออกของยีนจำนวน 10 ยีนดังกล่าว ระหว่างเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลเปรียบเทียบกับเม็ดเลือดขาวอื่น ๆ ผ่านเว็บไซต์ <http://sepsis.gxbsidra.org/dm3/geneBrowser/show/4000098> ดังแสดงในตารางแกลวสีแดง

สุดท้ายการค้นหอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้พบพบว่า diacylglycerol O-acyltransferase (DGAT2) เป็นยีนที่พบได้เฉพาะในนิวโทรฟิลที่แสดงถึงความใหม่ ไม่เคยศึกษาในเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลมาก่อน จากนั้นจะทำการศึกษายาทาบทและหน้าที่ของยีนดังกล่าวในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน DGAT2 ภายในนิวโทรฟิลจากการใช้ DGAT2 inhibitor หรือ PF-06424439 และทดสอบว่าการยับยั้งยีนดังกล่าวส่งผลต่อหน้าที่ของนิวโทรฟิลในการกำจัดเชื้อหรือไม่

Table 1 Top 10 highest priority RNA ranked from the 137 significant neutrophil-rich genes.

Rank	Gene symbol	Query	P value*	Expression in leukocyte subsets	No. of total articles in PubMed	No. of articles in PubMed with <i>Salmonella</i>	No. of articles in PubMed with neutrophils
1	DGAT2	DGAT2 OR "diacylglycerol O-acyltransferase 2" AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0093	Only neutrophils	814	0	0
2	BCL2A1	BCL2A1 OR "BCL2 related protein A1" AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0051	Only neutrophils	675	0	0

Table 1 Top 10 highest priority RNA ranked from the 137 significant neutrophil-rich genes. (Cont.)

Rank	Gene symbol	Query	P value*	Expression in leukocyte subsets	No. of total articles in PubMed	No. of articles in PubMed with <i>Salmonella</i>	No. of articles in PubMed with neutrophils
3	ALOX-5AP	ALOX5AP OR “arachidonate 5-lipoxygenase activating protein” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0004	Only neutrophils	539	0	0
4	C9orf72	C9orf72 OR “C9orf72-SMCR8 complex subunit” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0187	Neutrophils and monocytes	2,796	0	0
5	HDAC4	HDAC4 OR “histone deacetylase 4” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0018	Neutrophils and monocytes	1,605	0	0
6	SLC2A3	SLC2A3 OR “solute carrier family 2 member 3” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0004	Neutrophils and monocytes	819	0	0
7	PADI4	PADI4 OR “peptidyl arginine deiminase 4” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0009	Neutrophils and monocytes	716	0	0
8	HHEX	HHEX OR “hematopoietically expressed homeobox” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0004	Neutrophils, Monocytes and B cells	527	0	0
9	LTB4R	LTB4R OR “leukotriene B4 receptor” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0018	Neutrophils and monocytes	482	0	0
10	MAP2K6	MAP2K6 OR “mitogen-activated protein kinase kinase 6” AND 1990:2024 [dp] [ti]	0.0065	Neutrophils and monocytes	463	0	0

* P value of *Salmonella* infection group compared with healthy control group.

2. การทดสอบความเป็นพิษของ DGAT2 inhibitor ต่อนิวโทรฟิลด้วยวิธี MTS assay

ก่อนทำการทดสอบบทบาทของยีนเป้าหมาย DGAT2 ในนิวโทรฟิลระหว่างที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* จะต้องทำการทดสอบว่า DGAT2 inhibitor มีพิษต่อเซลล์หรือไม่ โดยการเพาะเลี้ยงนิวโทรฟิลที่แยกจากเลือดอาสาสมัครสุขภาพดีทั้งหมด 3 ราย ในสภาวะไม่มีและมี DGAT2 inhibitor ที่ความเข้มข้น 1, 5, 10, 50 และ 100 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติมน้ำยา MTS และทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อทำการวัดการมีชีวิตอยู่ของเซลล์และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด

(cell viability) พบว่าการมีชีวิตรอดของเซลล์นิวโทรฟิลที่เพาะเลี้ยงกับ DGAT2 inhibitor ทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับนิวโทรฟิลที่อยู่ในสภาวะที่ไม่มี DGAT2 inhibitor (Fig. 2A) เมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของ DGAT2 inhibitor ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ร้อยละ 50 (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) พบว่าค่า CC_{50} มากกว่า 100 ไมโครโมลาร์ (Fig. 2B) แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ DGAT2 inhibitor ที่นำมาใช้ตั้งแต่ 1-100 ไมโครโมลาร์ ไม่มีความเป็นพิษต่อนิวโทรฟิล

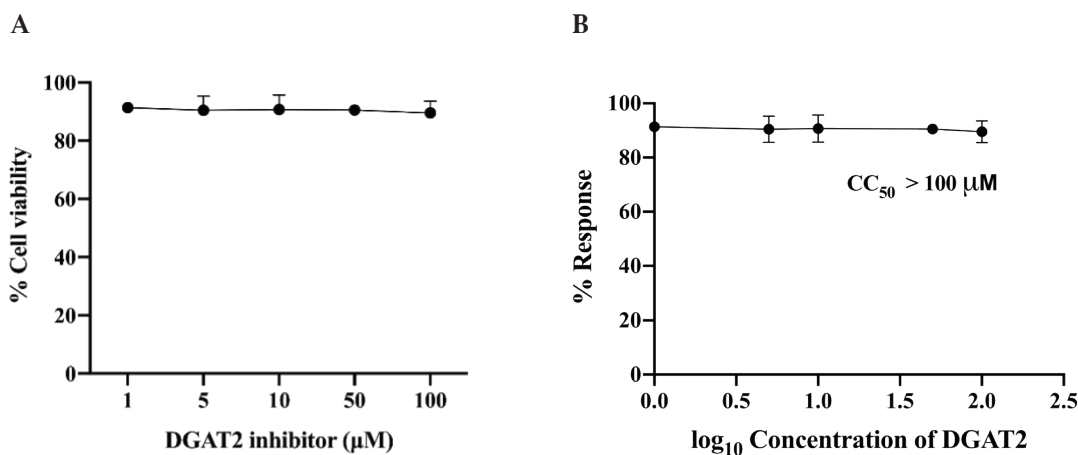


Fig. 2 Cytotoxicity of DGAT2 inhibitor treatment on human neutrophils. (A) Viability of treated neutrophils with different concentrations of DGAT2 inhibitor (1, 5, 10, 50 and 100 μM) for 2 h was assessed by the MTS assay. The percentage of treated-cell viability compared to the untreated-cell control was presented. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of three independent experiments ($n = 3$) using unpaired t-test. (B) The CC_{50} value of DGAT2 inhibitor was calculated using GraphPad Prism by interpolation.

3. การทดสอบการกำจัดเชื้อของนิวโทรฟิลด้วยวิธี bacterial colony count assay

นิวโทรฟิลจะถูกเพาะเลี้ยงในสถานะไม่มีและไม่มี DGAT2 inhibitor ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่ MOI 1 และ 3 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงนิวโทรฟิลในสถานะปกติที่ไม่มี DGAT2 inhibitor กับเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่ MOI 1 และ 3 พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ภายในนิวโทรฟิลมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที (T60) เทียบกับที่เวลาเริ่มต้น (T0) แสดงถึงความสามารถของนิวโทรฟิลในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม

เมื่อเพาะเลี้ยงนิวโทรฟิลด้วยเชื้อแบคทีเรีย ที่ MOI 1 และ 3 เป็นเวลา 60 นาที (T60) ในสถานะที่มี DGAT2 inhibitor พบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย (177.17 ± 46.52 CFU/mL) มากกว่าในสถานะที่ไม่มี DGAT2 inhibitor (77.33 ± 23.72 CFU/mL) อย่างมีนัยสำคัญ (Fig. 3A และ 3B) แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการทำงานของยีนเป้าหมาย DGAT2 ส่งผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อของนิวโทรฟิลลดลง จึงพบปริมาณเชื้อที่ยังเหลืออยู่ในเซลล์นิวโทรฟิลมากกว่า ดังนั้นยีน DGAT2 ในนิวโทรฟิลจึงมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Typhimurium

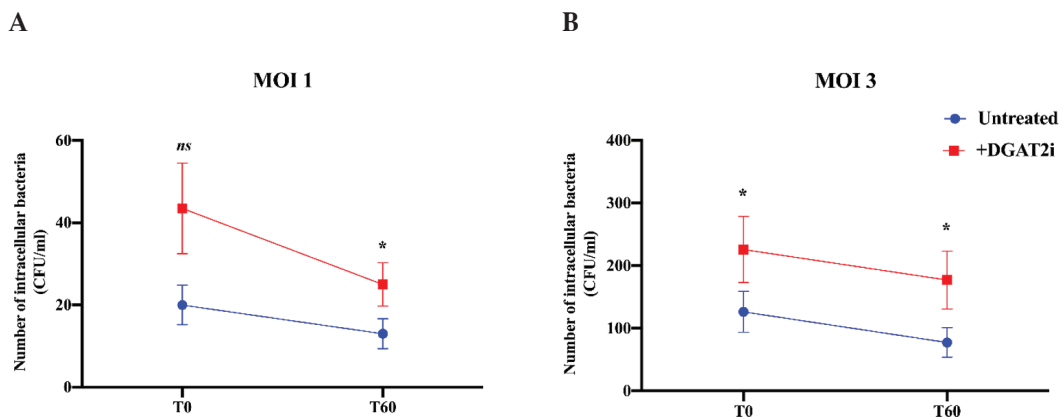


Fig. 3 Effect of DGAT2 inhibition on intracellular survival of *Salmonella* Typhimurium. Human neutrophils were infected with *Salmonella* Typhimurium at MOI of 1 (A) and 3 (B) in the absence or presence of 50 μ M DGAT2 inhibitor. Extracellular organisms were killed by incubation with 100 μ g/mL gentamycin for another 30 min before the cells were lysed for bacterial counting (time zero: T0). Intracellular bacteria were also quantified by colony plating after 60 min incubation (T60). Error bar indicates SEM of three independent experiments ($n = 3$). The single asterisk (*) shows a statistically significant difference ($p < 0.05$) between untreated and treated neutrophils at indicated time points using Two-way ANOVA. ns = non-significant.

วิจารณ์

ในปัจจุบันมีการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับศาสตร์การแสดงออกของอาร์เอ็นเอหรือทรานสคริปโตมหลากหลายประเภท ทำให้เกิดผลผลิตทางวิจัยมากมายที่ถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลสาธารณะ ผู้วิจัยเห็นถึงความสำคัญของการนำข้อมูลที่มีอยู่มาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยใช้กระบวนการวิเคราะห์และจัดเรียงอย่างง่าย ซึ่งเป็นการใช้เครื่องมือในการจัดการและสกัดข้อมูลที่มีอยู่มาช่วยในการค้นหาอาร์เอ็นเอเป้าหมายสำคัญ^(18,21) โดยกระบวนการนี้จะทำการค้นหาอาร์เอ็นเอเป้าหมายจากฐานข้อมูลสาธารณะของสถาบัน SIDRA Medicine ประเทศกาตาร์ ซึ่งมีการรวบรวมข้อมูลการแสดงออกของอาร์เอ็นเอจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือวิทยาศาสตร์ microarray ไว้อย่างหลากหลาย เนื่องด้วยในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาการแสดงออกของอาร์เอ็นเอเป้าหมายสำคัญในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella* ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกเฉพาะฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือด (sepsis) จากการสืบค้นฐานข้อมูลทรานสคริปโตมที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อในกระแสเลือดที่มีทั้งหมด 74 ชุดข้อมูล พบหนึ่งชุดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของอาร์เอ็นเอในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *Salmonella*⁽²⁰⁾ อย่างไรก็ตามการเพิ่มการค้นหาชุดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมแหล่งอื่น ๆ เพื่อนำมาเปรียบเทียบอาร์เอ็นเอเป้าหมายที่ได้มาจากแต่ละแหล่งฐานข้อมูลจะทำให้การคัดเลือกอาร์เอ็นเอเป้าหมายมีความถูกต้องแม่นยำ และมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

เมื่อทำการค้นหาและเรียงลำดับอาร์เอ็นเอเป้าหมายสำคัญที่มีการแสดงออกเฉพาะในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* พบว่ายีน diacylglycerol O-acyltransferase หรือ DGAT2 เป็นยีนที่ไม่เคยมีการศึกษาในขอบเขตของ

การติดเชื้อ *Salmonella* และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในเม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิลมาก่อน จากการเพิ่มคำค้นหา “*Salmonella*” และ “neutrophil” ใน PubMed ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีนดังกล่าวมีความใหม่และเหมาะสมที่จะนำไปศึกษาต่อยอดได้จริงในหลอดทดลอง

จากนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาบทบาทของยีน DGAT2 ในการตอบสนองของนิวโทรฟิลต่อการติดเชื้อ *Salmonella* ผ่านการยับยั้งยีน DGAT2 ที่แสดงออกในนิวโทรฟิล โดยนำนิวโทรฟิลที่แยกได้จากผู้มีสุขภาพดีมาเพาะเลี้ยงกับ DGAT2 inhibitor หรือ PF-06424439^(22, 23) ผลการทดลองพบว่านิวโทรฟิลที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี DGAT2 inhibitor พบจำนวนแบคทีเรียที่เหลือน้อยในเซลล์นิวโทรฟิลมากกว่าสภาวะที่ไม่มี DGAT2 inhibitor อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่ายีน DGAT2 มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อของนิวโทรฟิลที่อยู่บริเวณ site of infection ในระหว่างที่มีการติดเชื้อ *Salmonella*

ในปี ค.ศ. 2014 Youzhi Jin และคณะ รายงานว่าเอนไซม์ DGAT2 อยู่บริเวณชั้นผิวของ endoplasmic reticulum ในเนื้อเยื่อและเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ triacylglycerol และเป็นโครงสร้างหลักของการสังเคราะห์โมเลกุลที่เรียกว่า lipid droplets⁽²⁴⁾ เมื่อเซลล์มีการถูกกระตุ้นด้วยเชื้อจุลชีพ จะส่งผลให้มีการสร้างโมเลกุล lipid droplets และสะสมไว้ในเซลล์ ซึ่ง lipid droplets สามารถกระตุ้นการทำงานของ innate immunity ผ่านทาง Toll-like receptor (TLR) 7 และ TLR9 ส่งผลให้เพิ่มการแสดงออกของ type I และ type III interferon⁽²⁵⁾ ในปี ค.ศ. 2020 Ebony Monson และคณะ พบว่าการติดเชื้อไวรัสซิกาและไวรัสเฮอริส ซิมเพล็กซ์ ชนิดที่ 1 ทำให้เกิดการสะสมโมเลกุล lipid droplets ส่งผลให้การเพิ่มจำนวนของไวรัสลดลงในเซลล์ชนิด

แอสโตรไซต์ที่พบได้ในระบบประสาทส่วนกลาง⁽²⁶⁾ ในปี ค.ศ. 2020 Angela Castoldi และคณะ พบว่าการกระตุ้นแมโครฟาจผ่าน TLR2 TLR3 และ TLR4 จะเพิ่มการสังเคราะห์ triacylglycerol และสะสมเป็นโมเลกุล lipid droplets ภายในเซลล์แมโครฟาจ ส่งผลทำให้มีการหลั่งสารก่อการอักเสบ IL-1 β , IL-6 และ prostaglandin E2 (PGE2) ไปกระตุ้นแมโครฟาจ (inflammatory หรือ activated macrophage) ทำให้ตอบสนองระหว่างที่เกิดกระบวนการอักเสบ และมี phagocytic capacity เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลดีต่อโฮสต์ในการป้องกันเชื้อโรค อย่างไรก็ตามเมื่อยับยั้งการทำงานของยีน DGAT ในแมโครฟาจ พบว่าจะทำให้แมโครฟาจเข้าสู่สภาวะปกติ (resting macrophage) ส่งผลต่อการตอบสนองในกระบวนการอักเสบได้น้อยลง^(27, 28) ในปี ค.ศ. 2020 Isabelle Reichert และคณะ พบว่าการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ DGAT2 จะทำให้เกิดการสะสมของ lipid droplets ที่บริเวณ membrane vesicles ของ endoplasmic reticulum ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสตับอักเสบซี⁽²⁹⁾ นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2020 Marta Bosch และคณะ พบว่าโมเลกุล lipid droplet มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นระหว่างถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) ของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบหรือในภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด โดย lipid droplet จะไปกระตุ้นการสะสมของ cathelicidin ซึ่งเป็น antimicrobial peptide ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity)⁽³⁰⁾ และเมื่อโมเลกุล lipid droplet รวมกับโปรตีน histone จะช่วยในการกำจัดเชื้อ intracellular bacteria ได้ดีขึ้น⁽³¹⁾ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยนี้เกี่ยวกับบทบาทของยีน DGAT2 ที่มีผลต่อการกำจัดเชื้อ *Salmonella* ของนิวโทรฟิล อย่างไรก็ตามผลจากการยับยั้ง DGAT2 ที่ส่งผลต่อการกำจัดเชื้อ

Salmonella อาจเกิดจากกลไกการกำจัดเชื้อภายในเซลล์นิวโทรฟิลอื่นที่ประกอบไปด้วยหลายกลไกร่วมกัน อาทิ การยับยั้ง DGAT2 อาจส่งผลต่อการยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระ ROS ซึ่งเป็นกลไกหลักของนิวโทรฟิลในการกำจัดเชื้อ การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ myeloperoxidase ที่ส่งผลต่อการสร้างสารอนุมูลอิสระไฮโปคลอไรต์ การยับยั้งการรวมตัวกันของฟาโกโซมและไลโซโซม เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาทดลองเพิ่มเติมต่อไปเพื่อให้ทราบถึงกลไกแท้จริง นอกจากนี้เพื่อให้ทราบถึงบทบาทของยีน DGAT2 ในนิวโทรฟิลมากขึ้น ควรมีการศึกษาในบทบาทด้านอื่นของยีน DGAT2 อาทิ บทบาทของยีน DGAT2 ในระหว่างการกำจัดเชื้อภายนอกเซลล์ของนิวโทรฟิล หรือ neutrophil extracellular traps (NETs) การสร้างสารอักเสบหรือไซโตไคน์ เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวของยีนเป้าหมายใหม่ที่ไม่เคยมีการศึกษาในหลอดทดลองมาก่อน อาจจะมีข้อจำกัดในการใช้ระยะเวลาในการค้นหาหรือสังเคราะห์ inhibitor ขึ้นมาใหม่ หรือในกรณีที่ไม่สามารถสังเคราะห์ inhibitor ขึ้นมาใหม่ได้ การใช้เทคโนโลยีปรับแต่งจีโนม gene depletion หรือ gene knockdown⁽³²⁾ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่สนใจได้

สรุป

การค้นหายีนใหม่สำหรับงานวิจัยมุ่งเป้าที่สนใจผ่านการจัดการและสกัดองค์ความรู้ที่มีอยู่มาทำให้เกิดคุณค่าทางวิชาการมากขึ้น นอกจากนั้นการนำข้อมูลหรือความรู้ที่ได้มาไปต่อยอดในการทดลองจริงในหลอดทดลอง ทำให้เกิดการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีนใหม่ที่ไม่เคยมีการศึกษามาก่อนภายใต้ขอบเขตของงานวิจัยที่สนใจ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่ายีน

DGAT2 เป็นยีนที่แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในกลุ่มนิวโทรฟิล โดยผ่านการวิเคราะห์และคัดเลือกว่าไม่เคยมีการศึกษาในเชื้อ *Salmonella* หรือนิวโทรฟิลมาก่อน และเมื่อนำยีนนี้ไปศึกษาต่อยอดในหลอดทดลอง พบว่ายีน DGAT2 ที่แสดงออกในนิวโทรฟิลมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อ *Salmonella* จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำยีนนี้ไปศึกษาต่อยอดเกี่ยวกับกลไกการกำจัดเชื้อและพยาธิสภาพในการติดเชื้อในอนาคตได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณอาสาสมัครสุขภาพดีในการบริจาคเลือดเพื่อใช้ทำการศึกษาวิจัย การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

1. Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity* 2021; 54: 1377-91.
2. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 159-75.
3. Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Crit Care* 2016; 20: 73.
4. Eng SK, Pusparajah P, Ab Mutalib NS, Ser HL, Chan KG, Lee LH. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci* 2015; 8: 284-93.
5. Menard S, Lacroix-Lamande S, Ehrhardt K, Yan J, Grassl GA, Wiedemann A. Cross-talk between the intestinal epithelium and *Salmonella* Typhimurium. *Front Microbiol* 2022; 13: 906238.
6. Gül E, Enz U, Maurer L, Abi Younes A, Fattinger SA, Nguyen BD, *et al.* Intraluminal neutrophils limit epithelium damage by reducing pathogen assault on intestinal epithelial cells during *Salmonella* gut infection. *PLoS Pathog* 2023; 19: e1011235.
7. Broz P, Ohlson MB, Monack DM. Innate immune response to *Salmonella typhimurium*, a model enteric pathogen. *Gut Microbes* 2012; 3: 62-70.
8. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 263-9.
9. Aviello G, Knaus UG. ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue or Sabotage? *Br J Pharmacol* 2017; 174: 1704-18.
10. Ramalho J, Correia J. Non-typhoidal *Salmonella* severe sepsis in an immunocompetent young woman. *BMJ Case Rep* 2013; bcr2012008773.
11. Kudo K, Ohara J, Sano C, Ohta R. *Salmonella* bacteremia in an older patient with no specific Entry: A case report. *Cureus* 2023; 15: e49194.
12. Worley MJ. *Salmonella* Bloodstream Infections. *Trop Med Infect Dis* 2023; 8: 487.

13. Schürmann N, Forrer P, Casse O, Li J, Felmy B, Burgener AV, *et al.* Myeloperoxidase targets oxidative host attacks to *Salmonella* and prevents collateral tissue damage. *Nat Microbiol* 2017; 2: 16268.
14. Burton NA, Schürmann N, Casse O, Steeb AK, Claudi B, Zankl J, *et al.* Disparate impact of oxidative host defenses determines the fate of *Salmonella* during systemic infection in mice. *Cell Host Microbe* 2014; 15: 72-83.
15. Gill N, Ferreira RB, Antunes LC, Willing BP, Sekirov I, Al-Zahrani F, *et al.* Neutrophil elastase alters the murine gut microbiota resulting in enhanced *Salmonella* colonization. *PLoS One* 2012; 7: e49646.
16. Kozlyuk N, Monteith AJ, Garcia V, Damo SM, Skaar EP, Chazin WJ. S100 Proteins in the innate immune response to pathogens. *Methods Mol Biol* 2019; 1929: 275-90.
17. Riyapa D, Rinchai D, Muangsombut V, Wuttinontananchai C, Toufiq M, Chaussabel D, *et al.* Transketolase and vitamin B1 influence on ROS-dependent neutrophil extracellular traps (NETs) formation. *PLoS One* 2019; 14: e0221016.
18. Chaussabel D, Rinchai D. Using 'collective omics data' for biomedical research training. *Immunol* 2018; 155: 18-23.
19. Chiu HC, Kulp SK, Soni S, Wang D, Gunn JS, Schlesinger LS, *et al.* Eradication of intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with a small-molecule, host cell-directed agent. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5236-44.
20. Pankla R, Buddhisa S, Berry M, Blankenship DM, Bancroft GJ, Banchereau J, *et al.* Genomic transcriptional profiling identifies a candidate blood biomarker signature for the diagnosis of septicemic melioidosis. *Genome Biol* 2009; 10: R127.
21. Rinchai D, Kewcharoenwong C, Kessler B, Lertmemongkolkhai G, Chaussabel D. Increased abundance of ADAM9 transcripts in the blood is associated with tissue damage. *F1000Res* 2015; 4: 89.
22. Futatsugi K, Kung DW, Orr ST, Cabral S, Hepworth D, Aspnes G, *et al.* Discovery and optimization of imidazopyridine-based inhibitors of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2). *J Med Chem* 2015; 58: 7173-85.
23. Pabst B, Futatsugi K, Li Q, Ahn K. Mechanistic characterization of long residence time inhibitors of diacylglycerol acyltransferase 2 (DGAT2). *Biochem* 2018; 57: 6997-7010.
24. Jin Y, McFie PJ, Banman SL, Brandt C, Stone SJ. Diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) and monoacylglycerol acyltransferase-2 (MGAT2) interact to promote triacylglycerol synthesis. *J Biol Chem* 2014; 289: 28237-48.
25. Monson EA, Trenerry AM, Laws JL, Mackenzie JM, Helbig KJ. Lipid droplets and lipid mediators in viral infection and immunity. *FEMS Microbiol Rev* 2021; 45: fuaa066.

26. Monson EA, Crosse KM, Duan M, Chen W, O'Shea RD, Wakim LM, *et al.* Intracellular lipid droplet accumulation occurs early following viral infection and is required for an efficient interferon response. *Nat Commun* 2021; 12: 4303.
27. Feingold KR, Shigenaga JK, Kazemi MR, McDonald CM, Patzek SM, Cross AS, *et al.* Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *J Leukoc Biol* 2012; 92: 829-39.
28. Castoldi A, Monteiro LB, van Teijlingen Bakker N, Sanin DE, Rana N, Corrado M, *et al.* Triacylglycerol synthesis enhances macrophage inflammatory function. *Nat Commun* 2020; 11: 4107.
29. Bosch M, Sánchez-Álvarez M, Fajardo A, Kapetanovic R, Steiner B, Dutra F, *et al.* Mammalian lipid droplets are innate immune hubs integrating cell metabolism and host defense. *Science* 2020; 370: eaay8085.
30. Reichert I, Lee JY, Weber L, Fuh MM, Schlaeger L, Rößler S, *et al.* The triglyceride-synthesizing enzyme diacylglycerol acyltransferase 2 modulates the formation of the hepatitis C virus replication organelle. *PLoS Pathog* 2024; 20: e1012509.
31. Anand P, Cermelli S, Li Z, Kassan A, Bosch M, Sigua R, *et al.* A novel role for lipid droplets in the organismal antibacterial response. *Elife* 2012; 1: e00003.
32. Zimmer AM, Pan YK, Chandrapalan T, Kwong RWM, Perry SF. Loss of function approaches in comparative physiology: is there a future for knockdown experiments in the era of genome editing? *J Exp Biol* 2019; 222: jeb175737.