บทความวิจัย

การศึกษาเบื้องต้นผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดในหลอดทดลอง

อนัญญา นาวินประเสริฐ* อรพิณ วงศ์สวัสดิ์กุล และ ศรีอัมพร หนูกลับ

บทคัดย่อ

บอระเพ็ดพุงช้างเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง เบาหวาน วัณโรค โลหิตจาง หอบหืด แต่ไม่มีการศึกษาทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวกับระบบไหลเวียนโลหิต จึงทำการทดลองโดยใช้สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง 1, 50, 150, 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาการทำงานของเกล็ดเลือดที่ได้จากพลาสมาของคนปกติ โดยใช้ ADP (adenosine 5′ diphosphate) 20 ไมโครโมลาร์ เป็นสารกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือด ซึ่งจะวัดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดเป็นเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุด อัตราการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดเป็นเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วต่อนาที และใช้ luciferase เป็นสารวัดการหลั่งของ ATP จากการศึกษาผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการทำงานของเกล็ดเลือด พบว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ความเข้มข้น 50, 150, 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุด อัตราการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วต่อนาที และการหลั่งของ ATP ลดลง แสดงว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะยับยั้งการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด อัตราการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดช้าลง และการหลั่งของ ATP ลดลง สำหรับสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะลดอัตราการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วต่อนาที แต่ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุด และการหลั่ง ATP ดังนั้น สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้อัตราการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดช้าลง ฉะนั้น สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างอาจจะนำมาใช้เป็นแนวทางในการศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด และการนำสมุนไพรชนิดนี้มาใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวกับระบบไหลเวียนโลหิตต่อไป

คำสำคัญ: บอระเพ็ดพุงช้าง การทำงานของเกล็ดเลือด

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: rung-aru@swu.ac.th

Preliminary Study of the Effects of *Stephania venosa* Extract on Platelet Functions *in vitro*

Anunya Nawinprasert*, Orapin Wongsawatkul and Sriamporn Hnuklab

ABSTRACT

***Stephania venosa* is Thai plant medicine that has been used for treatment of cancer, diabetes mellitus, tuberculosis, anemia and asthma. However, there is no evidence in pharmacological study about cardiovascular system. In this study, the effects of *S. venosa* extract at 1, 50, 150, 300 and 600 μg/mL were examined in platelet function induced by ADP 20 μM from normal volunteer. Data were shown as platelet aggregation, the rate of platelet aggregation by measuring percentage of maximal changes in light transmission (LTmax), the rate of changes in light transmission (LTrate) and ATP release by using luciferase. The extract of *S. venosa* at 50, 150, 300 and 600 μg/mL caused the decreases in LTmax, LTrate and ATP release. It indicated that *S. venosa* extract inhibited platelet aggregation, decreased the rate of platelet aggregation and ATP release. However, 1 μg/mL of *S. venosa* extract decreased LTrate but not LTmax and ATP release. This was shown that 1 μg/mL of *S. venosa* extract reduced only the rate of platelet aggregation. Our findings suggested that *S. venosa* extract can be used to further investigate about mechanisms of these inhibitory effects and may be used for treatment of cardiovascular diseases.**

Keywords: ***Stephania venosa*, platelet function**

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University
*Corresponding author, e-mail: rung-aru@swu.ac.th

บทนำ

ในปัจจุบันพบว่าโรคที่อาจทำให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิต เช่น โรคหัวใจ ความดันโลหิตสูง เบาหวาน มะเร็ง การติดเชื้อของระบบต่างๆ ในร่างกาย อาจทำให้ผู้ป่วยถึงแก่ชีวิตได้ โรคหรือภาวะที่เกิดจากการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น ได้แก่ โรคหลอดเลือดโคโรนารี่ (coronary artery disease) เบาหวาน ภาวะไขมันในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง และการสูบบุหรี่ [1] จำเป็นจะต้องได้รับยาในการรักษาเป็นเวลานาน ทำให้เกิดฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา และยาบางชนิดมีราคาแพง ดังนั้น จึงพิจารณาที่จะนำพืชสมุนไพรซึ่งเพาะปลูกได้ในประเทศไทยมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เหล่านี้

บอระเพ็ดพุงช้างเป็นสมุนไพรไทยอยู่ในวงศ์ Menispermaceae [2] ตำราไทยแผนโบราณจะใช้เป็นยารักษาบาดแผลสดและเรื้อรัง อาการปวดเมื่อย หอบหืด อาหารไม่ย่อย ลดระดับไขมันในเลือด โรคเบาหวานหรือโรคมะเร็ง ส่วนลำต้นจะใช้ระบายลมในท้อง ส่วนใบใช้รักษาบาดแผลสดและเรื้อรัง ส่วนของดอกจะใช้รักษาโรคเรื้อนและเป็นยาระบาย ส่วนเถาใช้ขับประจำเดือน ขับพยาธิในลำไส้ ส่วนหัวและก้านแก้ปวดเมื่อย ส่วนรากบำรุงเส้นประสาทและรักษาหอบหืด [3, 4] ผลจากการศึกษาวิจัยพบว่าบอระเพ็ดพุงช้างจะใช้เป็นยาระงับปวด รักษาหอบหืด โรคเรื้อน และวัณโรคได้ [5] ทำลายเซลล์มะเร็งเต้านม [6] และยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Plasmodium falciparum* ในหลอดทดลอง [7] แต่ยังไม่มีข้อมูลทางเภสัชวิทยา ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับระบบไหลเวียนโลหิต คณะผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษาวิจัยผลของสมุนไพรชนิดนี้ต่อการทำงานของเกล็ดเลือดในพลาสม่าของคนปกติ

วิธีการทดลอง

อาสาสมัคร

อาสาสมัครชาย 4 คน หญิง 16 คน อายุระหว่าง 23-46 ปี ไม่มีประวัติมีโรคประจำตัว ไม่เคยสูบบุหรี่ หรือได้รับยาใดๆ มาอย่างน้อย 10 วันก่อนได้รับการเจาะเลือด และอาสาสมัครทุกคนได้ลงชื่อยินยอมที่จะเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้

วัสดุและสารเคมี

สาร sodium citrate, ADP (adenosine 5′ diphosphate) และ Luciferin/Luciferase (Sigma) สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง ได้มาจากการนำส่วนหัวของบอระเพ็ดพุงช้างที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ไปตากแห้ง แล้วนำมา 30 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดเป็นเวลา 8 ชั่วโมง กรองกากออก ทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง นำไป freeze dry ที่อุณหภูมิ -55 องศาเซลเซียส ความดัน 0.1-0.04 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การทำงานของเกล็ดเลือด

อาสาสมัครจะได้รับการเจาะเลือดที่ข้อพับแขน และใช้ 3.2% sodium citrate เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ผสมในอัตราส่วนเลือด: 3.2% sodium citrate เท่ากับ 9: 1 นำตัวอย่างเลือด 100 ไมโครลิตร ไปวัดจำนวนเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน ฮีมาโทคริต และเกล็ดเลือดโดยใช้เครื่อง Automatic Cell Counter เลือดที่เหลือนำไปปั่นที่ 400 xg เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง Mistral 2000 จะได้เป็น Platelet Rich Plasma (PRP) นำไปใส่ในหลอดแก้วที่เคลือบด้วย silicone ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำ PRP ที่เหลือไปปั่นที่ 2,900 xg เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนของพลาสมาซึ่งเป็น Platelet Poor Plasma (PPP) จำนวน 280 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้วที่เคลือบ silicone เติมสาร luciferin/luciferase (ใช้สำหรับวัด ATP) 0.5 มิลลิ-

กรัมต่อน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน 20 ไมโครลิตร 0.9% โซเดียมคลอไรด์ จำนวน 5 ไมโครลิตร หรือสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง 1, 50, 150, 300, 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน PRP แล้วนำ PRP นี้และ PPP อุ่นในเครื่อง Chrono-Log Aggregometer Model 550 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นปั่นในอัตรา 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ในเครื่อง Chrono-Log Aggregometer แล้วเติม 20 ไมโครโมลาร์ ADP จำนวน 5 ไมโครลิตร ลงใน PRP บันทึกเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุด อัตราการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้ว และการหลั่งของ ATP เป็นเวลา 4 นาที

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการทำงานของเกล็ดเลือดจะคำนวณเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Student paired t-test

ผลการทดลอง

อาสาสมัครมีจำนวนเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน ฮีมาโทคริต และเกล็ดเลือดปกติ (ตารางที่ 1) เมื่อศึกษาผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการทำงานของเกล็ดเลือดของคนปกติในหลอดทดลองที่กระตุ้นให้มีการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดโดยใช้ ADP 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง 50, 150, 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะทำให้เปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุดลดลง (รูปที่ 1)

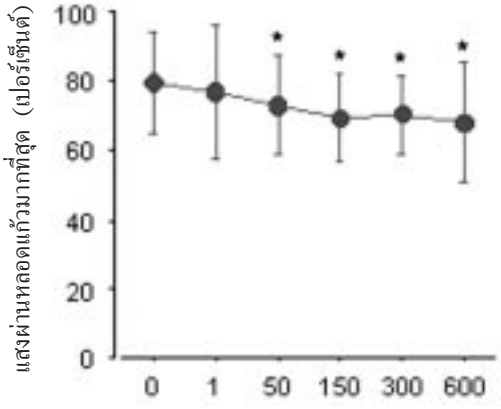
ตารางที่ 1 แสดงจำนวนหรือค่าขององค์ประกอบในเลือดของอาสาสมัคร

จำนวนหรือค่าขององค์ประกอบในเลือด	ชาย (4 คน)	หญิง (16 คน)
เม็ดเลือดขาว (x 10^3 เซลล์/ไมโครลิตร)	6 ± 1	6 ± 1
เม็ดเลือดแดง (x 10^6 เซลล์/ไมโครลิตร)	5 ± 0	4 ± 0
ฮีโมโกลบิน (กรัมต่อเดซิลิตร)	13.075 ± 1.473	12.197 ± 1.54
ฮีมาโทคริต (เปอร์เซ็นต์)	37.55 ± 6.527	34.541 ± 1.888
เกล็ดเลือด (x 10^3 เซลล์/ไมโครลิตร)	248 ± 76	224 ± 35

อัตราการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วลดลง (รูปที่ 2) และการหลั่งของ ATP (รูปที่ 3) จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.9 % NaCl (p value < 0.05) แต่สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะลดเฉพาะอัตราการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.05)

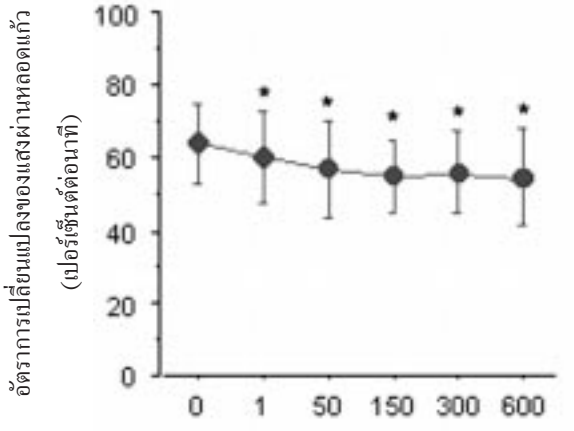
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการทำงานของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองโดยใช้เครื่อง Aggregometer และกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดโดยใช้ ADP 20 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกล็ดเลือดเกาะกลุ่มกันในกระบวนการแข็งตัวของเลือด และการเกิดลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดแดง [8, 9] จากการ



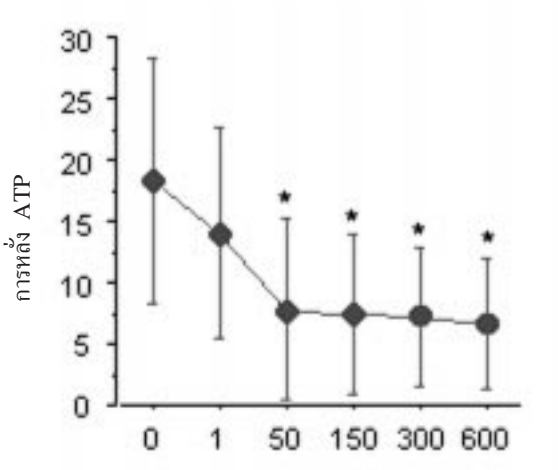
รูปที่ 1 แสดงผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP 20 ไมโครโมลาร์ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุด ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จำนวนตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง ยกเว้นความเข้มข้นที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างมี 19 ตัวอย่าง

*แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.9% NaCl



รูปที่ 2 แสดงผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่ออัตราการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP 20 ไมโครโมลาร์ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของอัตราการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุด ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จำนวนตัวอย่าง 20 ตัวอย่าง ยกเว้นความเข้มข้นที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง มี 19 ตัวอย่าง

* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.9% NaCl



รูปที่ 3 แสดงผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการหลั่ง ATP เมื่อกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดด้วย ADP 20 ไมโครโมลาร์ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการหลั่ง ATP ± ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จำนวนตัวอย่าง 10 ตัวอย่าง ยกเว้นความเข้มข้นที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้าง มี 9 ตัวอย่าง
* แสดงค่า $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.9% NaCl

ศึกษาผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ 50, 150, 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เหล่านี้ จะทำให้เปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้วมากที่สุดและการหลั่ง ATP ลดลง ส่วนสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ 1, 50, 150, 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะลดอัตราการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์แสงผ่านหลอดแก้ว

จากผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ 50, 150, 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด เมื่อกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดโดยใช้ ADP 20 ไมโครโมลาร์ แต่สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะลดเฉพาะอัตราการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด จากผลการทดลอง สารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด อาจจะเกี่ยวข้องกับตัวรับ P2T, P2X หรือ P2Y [10-14] เนื่องจากมีการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดด้วย ADP

สรุปผลการทดลอง

จากการนำเลือดของคนปกติมาปั่นแยกพลาสมาเพื่อศึกษาการทำงานของเกล็ดเลือดและผลของสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างต่อการทำงานของเกล็ดเลือด โดยกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดด้วย ADP 20 ไมโครโมลาร์ พบว่าสารสกัดบอระเพ็ดพุงช้างที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดได้เฉพาะอัตราการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด สำหรับความเข้มข้นที่ 50, 150, 300 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดได้ทั้งการเกาะกลุ่มกัน อัตราการเกาะกลุ่มกัน และการหลั่ง ATP ซึ่งอาจจะมีการยับยั้งการทำงานของตัวรับ P2T, P2X หรือ P2Y จากผลการทดลองนี้จะนำไปสู่การศึกษากลไกการออก

ฤทธิ์และการนำสมุนไพรชนิดนี้ไปใช้ในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบไหลเวียนโลหิตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะกรรมการของ มศว ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินกองทุนพัฒนามหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารอ้างอิง

1. Willoughby, S., Holmes, A. and Loscalzo, J. 2002. Platelets and Cardiovascular Disease. *European Journal of Cardiovascular Nursing* 1: 273-288.
2. เต็ม สมิตินันทน์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. หจก.ฟันนี่พับลิชชิ่ง. หน้า 496-497.
3. Forman, L. L. 1991. Menispermaceae. *Flora of Thailand.* 5(3): 300-365.
4. สุนทรี สิงหบุตรา. 2540. สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์ดอกเบี้ย. หน้า 167.
5. Kozuka, M., Miyaji, K., Sawada, T. and Tomita, M. 1985. A Major Alkaloid of the Leaves and Stems of *Stephania rotunda. J. Nat. Prod.* 48: 341-342.
6. Keawpradub, N., Itharat, A., Tantikarnkul, A., Rugleng, S. and Inruspong, P. 2001. Cytotoxic Alkaloids from the Tuber of *Stephania venosa. Songklanakarin J. Sci. Technol.* 23: 225-234.
7. Likhitwitayawuid, K., Dej-adisai, S., Jongbunprasert, V., Krungkrai, J. 1999. Antimalarials from *Stephania venosa, Prismatomeris sessiliflora, Diospyros montana* and *Murraya siamensis. Planta Med.* 65: 754-756.
8. Hellem, A. J. 1960. The Adhesiveness of Human Blood Platelets *in vitro. Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 12: 1.
9. Gachet, C., Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Leray, C., Ohlmann, P. and Cazenave, J. P. 1997. Activation of ADP Receptors and Platelet Function. *Thromb. Haemost.* 78: 271.
10. Sage, S. O., Yamoah, E. H. and Heemskerk, J. W. 2000. The Roles of P2X (1) and P2T (AC) Receptors in ADP-Evoked Calcium Signalling in Human Platelets. *Cell Calcium* 28: 119-126.
11. Hoylaerts, M. F., Oury, C., Toth-Zsamboki, E. and Vermylen, J. 2000. ADP Receptors in Platelet Activation and Aggregation. *Platelets* 11: 307-309.
12. Hollopeter, G., Jantzen, H. M., Vincent, D., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R. B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., and Conley, P. B. 2001. Identification of the Platelet ADP Receptor Targeted by Antithrombotic Drugs. *Nature* 409: 202-207.
13. Takasaki, J., Kamohara, M., Saito, T., Matsumoto, M., Matsumoto, S., Ohishi, T., Soga, T., Matsushime, H. and Furuichi, K. 2001. Molecular Cloning of the Platelet P2T(AC) ADP Receptor: Pharmacological Comparison with Another ADP Receptor, the P2Y(1) Receptor. *Mol. Pharmacol.* 60: 432-439.
14. Kunapuli, S. P., Dorsam, R. T., Kim, S. and Quinton, T. M. 2003. Platelet Purinergic Receptors. *Curr. Opi. Pharmacol.* 3: 175-180.

ได้รับบทความวันที่ 16 มีนาคม 2549
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 30 เมษายน 2549