ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ภูมิปัญญาชาวบ้าน ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของเซลล์นิวโตรฟิล เซลล์เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด

Effects of folk wisdom boiled Herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and pandanus *amaryllifolius* on neutrophil, red blood cell, and platelet functions

สุภาพร ขำจันทร์[1] ปารียา ใบอุบล[1] หนึ่งฤทัย นิลศรี[2]*

Supaporn Khamchun[1] Pareeya Baiubol[1] Nungruthai Nilsri[2]*

[1]สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา

[1]School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province

[2]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[2]Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok Province

** Corresponding author (Email: nungruthai.ni@gmail.com)*

Received February 2015

Accepted as revised May 2015

Abstract

Introduction: Hematopoietic cells consist of red blood cells, white blood cells and platelets. Blood cells play the major roles in oxygen transportation, immune system, and hemostasis, respectively. An imbalance of cell function may lead to many diseases such as hemolytic anemia, immunodeficiency, and thrombosis. Folk wisdom boiled herbs, the traditional medicine from Ban Tontakean, Maejai District, Phayao Province, Thailand, have been used for nourishment and hypertension treatments to study the effect on the hematologic system for pharmacological properties.

Objectives: To study the effects of folk wisdom boiled herb, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* on neutrophil, red blood cell, and platelet functions.

Materials and methods: Boiled herb extracts of *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* was used at the final concentrations of 100, 200 and 400 µg/mL. The oxidative stress levels in red blood cells, phagocytic function of neutrophils and platelet function were determined using malondialdehyde assay, phagocytic assay, and platelet aggregation assay, respectively.

Results: All concentrations of boiled herb extracts could significantly inhibited collagen-activated platelet aggregation at $p<0.05$ when compared to the control. The boiled herb extract (200 and 400 µg/mL) showed significantly increased phagocytic function ($p<0.05$). However, level of oxidative stress slightly decrease (not significant when compared to the control) after boiled herb extract treatment.

Conclusions: Folk wisdom boiled herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* extract could enhance phagocytic cell function and inhibit platelet aggregation.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2015; 48(2): 144-153. Doi: 10.14456/jams.2015.10

Keywords: Folk wisdom boiled herb, hematopoietic cells, oxidative stress, phagocytosis, platelet aggregation

บทคัดย่อ

บทนำ: เซลล์ในระบบโลหิตวิทยา ประกอบไปด้วย เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือด ซึ่งทำหน้าที่หลักในการขนส่งออกซิเจน เป็นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และทำหน้าที่ในกระบวนการห้ามเลือด ตามลำดับ หากเกิดการเสียสมดุลในกระบวนการทำงานของเซลล์ทั้งสามชนิดนี้ จะส่งผลให้ร่างกายเกิดพยาธิสภาพต่างๆ ได้ เช่น ภาวะโลหิตจางจากเม็ดเลือดแดงถูกทำลาย ภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน ยาหม้อสมุนไพรตำรับบ้านต้นตะเคียน อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา เป็นยาแผนโบราณที่ใช้ในการบำรุงร่างกายและรักษาโรคความดันโลหิตสูง ได้ถูกนำมาศึกษาฤทธิ์ทางระบบโลหิตวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเบื้องต้น

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ของยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโตรฟิล เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด

วัสดุและวิธีการ: ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL ต่อการเกิดอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดง ร้อยละการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล และร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ด้วยวิธีการวิเคราะห์มาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde) ดูการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic function) และ การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ตามลำดับ

ผลการศึกษา: สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพรในทุกๆ ความเข้มข้น สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL นั้น มีฤทธิ์เพิ่มการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโตรฟิลในการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) นอกจากนี้สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ยังส่งผลให้ระดับของอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงลดลง แต่เป็นการลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุปผลการศึกษา: สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพรภูมิปัญญาชาวบ้าน มีฤทธิ์ในการส่งเสริมการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2558; 48(2): 144-153. Doi: 10.14456/jams.2015.10

คำหัส : ยาหม้อสมุนไพร เซลล์ในระบบโลหิตวิทยา อนุมูลอิสระ ฟาโกซัยโทสิส การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

บทนำ

ภูมิปัญญาชาวบ้าน เป็นความรู้อันเกิดจากประสบการณ์ในการประดิษฐ์ คิดค้น จนกระทั่งกลายเป็นผลผลิตที่เป็นวัตถุและเป็นเรื่องของจิตใจที่มีประโยชน์ต่อการดำรงชีวิต มีการถ่ายทอดสืบต่อกันมาจากบรรพบุรุษ จนถึงรุ่นปัจจุบัน ภูมิปัญญาชาวบ้านเกี่ยวกับตำรับยาพื้นบ้านซึ่งเป็นการแพทย์ทางเลือกที่พบได้โดยทั่วไป คือ การทำน้ำต้มจากพืชสมุนไพรเพื่อใช้ในการบำบัดรักษาโรคต่างๆ หรือที่เรียกกันว่า ยาหม้อ มีมากมายหลายขนานตามแต่ละพื้นที่ที่มีการสืบทอดกันมาจากรุ่นสู่รุ่นมาเป็นเวลานาน ชุมชนบ้านต้นตะเคียน ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา มีการนำภูมิปัญญาพื้นบ้านแบบยาหม้อมาใช้ในชุมชน โดยการนำส่วนผสมของสมุนไพรหลายชนิดประกอบด้วย ใบและก้านของมะยม รากและต้นของลูกใต้ใบ รากและต้นของเตยหอม ต้มรวมกัน มีความเชื่อว่ายาต้มสมุนไพรนี้ช่วยในการบำรุงร่างกาย และรักษาโรคความดันโลหิตสูง มีการศึกษาที่ทราบในเบื้องต้นว่า มะยม (*Phyllanthus acidus* (L.) *Skeels*) มีสรรพคุณในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพ และลดการอักเสบได้[1] ส่วนลูกใต้ใบ (*Phyllanthus amarus* Schum&Thorn) ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ ชะลอการเกิดนิ่ว และช่วยลดไข้[2,3] นอกจากนี้ เตยหอม (*Pandanus amaryllifolius*) มีฤทธิ์ป้องกันการติดเชื้อไวรัส และต้านการเกิดอนุมูลอิสระได้[4,5] แต่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันทางวิทยาศาสตร์ว่าสมุนไพรดังกล่าวส่งผลอย่างไรต่อเซลล์ที่ทำงานในระบบไหลเวียนโลหิต ผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาผลของน้ำต้มยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ภูมิปัญญาชาวบ้านต่อการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโตรฟิล เม็ดเลือดแดง และเกล็ดเลือด โดยการศึกษาฤทธิ์ต้านการเกิดสารอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดง ผลของยาหม้อต่อการกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมของเซลล์นิวโตรฟิล และศึกษาฤทธิ์ต้านการทำงานของเกล็ดเลือด เพื่อยับยั้งการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจและสมองได้ หากยาหม้อสมุนไพรมีฤทธิ์ดังกล่าวข้างต้น

จะเป็นการช่วยยืนยันสรรพคุณทางยาเบื้องต้นของยาหม้อที่มีอยู่ในชุมชน ช่วยเพิ่มคุณค่ารวมทั้งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ของสมุนไพร รวมถึงทำให้เกิดความตระหนักในชุมชนถึงการอนุรักษ์ภูมิปัญญาท้องถิ่นที่มีอยู่ และร่วมกันเผยแพร่ภูมิปัญญาดังกล่าวสู่ชุมชนอื่น อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมการนำภูมิปัญญาที่ชุมชนมาใช้เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและบำบัดรักษาโรค นอกจากนี้หากยาหม้อสมุนไพรมีสรรพคุณทางยาจริง จะทำให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำต้มยาหม้อสมุนไพรให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถรับประทานได้ง่ายและสะดวกมากขึ้น ส่งเสริมให้เป็นสินค้าประจำชุมชนศรีถ้อย ทำให้เกิดรายได้ของชุมชนอีกทางหนึ่ง และอาจมีการพัฒนาจนถึงขั้นจดทะเบียนสิทธิบัตรภูมิปัญญาสมุนไพรพื้นบ้านของชุมชนศรีถ้อยในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. การคัดเลือกอาสาสมัคร

คัดเลือกอาสาสมัครจำนวน 10 ราย ที่มีสุขภาพแข็งแรง มีปริมาณของเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดอยู่ในช่วงปกติ ไม่อยู่ในระหว่างการเป็นไข้ และไม่รับประทานยาหรืออาหารที่ส่งผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด เช่น ยาแอสไพริน เป็นต้น โดยงานวิจัยผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่รับรอง 51/2013 และมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่รับรอง 5602010002 และ 5602010014

2. การเตรียมสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม

เตรียมสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพรตำรับบ้านต้นตะเคียน ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา ซึ่งประกอบไปด้วย รากและต้นของลูกใต้ใบ ใบและก้านของมะยม และรากและต้นของเตยหอม ในสัดส่วน 1:1:1 (โดยน้ำหนักส่วนละ 50 gm) โดยนำพืชทั้งหมดมาผึ่งให้แห้งในที่ร่ม สกัดสารด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของสมุนไพร 1 ส่วนต่อน้ำ 10 ส่วน (น้ำหนักต่อปริมาตร) ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลากรองด้วยผ้าขาวบางและปั่นตกตะกอนที่ 1,500xg นาน 10 นาที จากนั้นทำให้เป็นผงโดยเครื่อง Lyophilizer เก็บสารสกัดที่อยู่ในรูปผงไว้ในขวดสีชาปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาทดสอบ สารสกัดที่ใช้ทดสอบเตรียมโดยละลายสารสกัดด้วย phosphate buffer saline (PBS) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเริ่มต้น (stock) เท่ากับ 1 mg/mL

3. การเตรียมเซลล์สำหรับทดสอบ

3.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง

เจาะเลือดจากอาสาสมัคร ใส่ลงในสารกันเลือดแข็งชนิด sodium citrate ที่ความเข้มข้น 3.2% ในอัตราส่วน 9:1 นับและปรับปริมาณของเม็ดเลือดแดงให้อยู่ในช่วง 4.5-5.0x10^6 cells/µL ด้วยเครื่อง automated hematological analyzer (KX-21N, Sysmex, Japan)

3.2 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล

เตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลด้วยวิธี Ficoll-Hypaque gradient centrifugation และวิธี dextran sedimentation ความเข้มข้น 6% โดยเจาะเลือดอาสาสมัครใส่ลงในสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เจือจางด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนดูดใส่ลงในน้ำยา Ficoll-Hypaque นำไปปั่นที่ความเร็ว 400 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที ครบเวลาดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง และเติม dextran ความเข้มข้น 6% ในอัตราส่วน dextran:เลือด เท่ากับ 3:2 เขย่าให้เข้ากัน ตั้งเอียง 45 องศา เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาดูดส่วนใสด้านบนมาปั่นที่ความเร็ว 300xg เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วจึงเติม NH_4Cl ความเข้มข้น 0.83% ปริมาตร 1 mL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่เตรียมได้ไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ trypan blue exclusion ความเข้มข้น 0.2% และคำนวณร้อยละของการมีชีวิต (% cell viability) และปรับจำนวนของเซลล์นิวโตรฟิลให้เท่ากับ 5x10^6 cells/mL

3.3 การเตรียมเกล็ดเลือด

เจาะเลือดจากอาสาสมัคร ใส่ลงในสารกันเลือดแข็งชนิด sodium citrate ที่ความเข้มข้น 3.2% ในอัตราส่วน 9:1 นำเลือดไปปั่นที่ความเร็ว 140xg เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 22 °C เก็บส่วนบนซึ่งเป็น platelet rich plasma (PRP) หลังจากนั้นปรับความเข้มข้นเกล็ดเลือดด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2x10^8 platelets/mL และปั่นเลือดที่ 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บส่วนบนเป็น platelet poor plasma (PPP)

4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อเซลล์นิวโตรฟิล

เพื่อเป็นการทดสอบว่าสารสกัดในแต่ละความเข้มข้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์นิวโตรฟิล ทำการศึกษาโดยนำเซลล์นิวโตรฟิลที่เตรียมได้ 5x10^6 cells/mL ปริมาตร 100 µL ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL เมื่อครบเวลา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการผสมกับ trypan blue ความเข้มข้น 0.2% ในอัตราส่วน 1:1 นับและคำนวณร้อยละของการมีชีวิต (% cell viability) ของเซลล์นิวโตรฟิล

5. การวัดปริมาณแลคเตทดีไฮโดรจีเนส (Lactase dehydrogenase; LDH)

เพื่อเป็นการทดสอบว่าสารสกัดที่นำมาทดสอบในแต่ละความเข้มข้นไม่มีผลในการทำลายเกล็ดเลือด โดยนำเกล็ดเลือด 2x10^8 platelets/mL ปริมาตร 500 µL ทำปฏิกิริยากับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL ปริมาตร 250 µL บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนไปตรวจวัดปริมาณแลคเตทดีไฮโดรจีเนส ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Cobas 6000 โดยใช้สาร triton X-100 ผสมกับเกล็ดเลือดเป็น positive control

6. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธี malondialdehyde[6]

นำเม็ดเลือดแดงที่เตรียมได้ ปริมาตร 2 mL ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL ปริมาตร 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการปั่นแยกพลาสมา ที่ความเร็วรอบ 1,500xg เป็นเวลา 15 นาที นำพลาสมา ปริมาตร 250 µL ผสมกับ butylatedhydroxytoluene ความเข้มข้น 0.2% ปริมาตร 25 µL และ H_3PO_4 ความเข้มข้น 0.44 M ปริมาตร 750 µL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม thiobarbituric acid ความเข้มข้น 0.6% ปริมาตร 250 µL แล้วนำไปแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ก่อนที่จะเติม n-butanol ปริมาตร 2 mL และนำไปปั่นที่ 1,500xg เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกและนำชั้นของ *n*-butanol ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm หาค่าความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล ด้วยวิธี phagocytic function[7]

นำเซลล์นิวโตรฟิล 5x10^6 cells/mL ปริมาตร 100 µL มาทดสอบกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mlL ปริมาตร 100 µL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 2 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิด pTriEx-4-GFP (ยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีน GFP) ปริมาณ 10 MOI และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000xg เป็นเวลา 2 นาที และดูดส่วนใสด้านบนทิ้งอีกครั้ง เติม bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 50 µL เตรียมสเมียร์และนำไปตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ คำนวณร้อยละของเซลล์ที่เรืองแสงจากการจับกินเชื้อ *E. coli* (% phagocytosis index) ดังนี้

$$\%\ \text{Phagocytosis index} = \frac{\text{เซลล์นิวโตรฟิลที่เรืองแสงจากการจับกินเชื้อ } \textit{E. coli} \times 100}{\text{เซลล์นิวโตรฟิล 200 เซลล์}}$$

และคำนวณอัตราการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในการจับกินเชื้อ *E. coli* (increasing ratio) ดังนี้

$$\text{Increasing ratio} = \frac{\%\ \text{Phagocytosis index ของตัวอย่างทดสอบ}}{\%\ \text{Phagocytosis index ของ vehicle control}}$$

8. การทดสอบผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ด้วยวิธี microplate assay[8]

นำเกล็ดเลือด 2x10^8 platelets/mL ปริมาตร 200 µL ผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL ปริมาตร 100 µL โดยใช้ยาแอสไพริน (Edwards; England) ความเข้มข้น 81 mg/mL เป็น positive control ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลา ดูดเกล็ดเลือดที่ทำปฏิกิริยาแล้วปริมาตร 75 µL เติมลงในไมโครเพลท เติมสารกระตุ้นเกล็ดเลือดชนิดคอลลาเจน (Helena laboratories; USA) ความเข้มข้น 20 µg/mL ปริมาตร 10 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครไตเตอร์เพลท (PerkinElmer; USA) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ในนาทีที่ 0 และ 20 คำนวณร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ดังนี้

$$\%\ \text{Aggregation} = \frac{\text{OD (plt0)} - \text{OD (plt20)} \times 100}{\text{OD (vehicle0)} - \text{OD (PPP)}}$$

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้การวิเคราะห์ผลการทดลองที่อยู่ในรูปร้อยละรายงานค่าเป็น mean±SD และทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วย Mann-Whitney Test โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์สถิติสำเร็จรูป SPSS version 14.0 เปรียบเทียบข้อมูลกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เติมสารสกัดลงไป ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05)

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อเซลล์นิวโตรฟิล

ผลการทดสอบพบเซลล์นิวโตรฟิลมีค่าการมีชีวิตมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อผสมเซลล์กับสารสกัดในทุกระดับความเข้มข้น (100, 200 และ 400 µg/mL) และพบว่าร้อยละการมีชีวิตของเซลล์นิวโตรฟิลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (ตารางที่ 1)

Table 1. The percentage of neutrophil viability after boiled herb extract treatment

Test	Concentration (µg/mL)	% cell viablity (mean±SD)
Cell control	-	92.87±4.34
Boil herb extract	100	89.75±3.42
	200	88.09±3.12
	400	88.31±6.14

2. ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อเกล็ดเลือด

การทดสอบพบว่าปริมาณแลคเตทดีไฮโดรจีเนสในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบในทุกความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาทดสอบนี้ไม่มีฤทธิ์ทำลายเกล็ดเลือด (ตารางที่ 2)

Table 2. Effects of folk wisdom boiled herb extract on platelets by lactase dehydrogenase release assay

Test	Concentration (µg/mL)	Lactase dehydroqenase (U/L) (mean±SD)
Vehicle control	-	58.0±2.0
Positive control	-	315.0±10.0
Boil herb extract	100	55.5±7.5
	200	55.0±7.0
	400	53.5±5.5

3. ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์เม็ดเลือดแดง

จากผลการศึกษาปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเม็ดเลือดแดงเมื่อผสมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL พบว่ามีระดับมาลอนไดอัลดีไฮด์เท่ากับ 2.03±0.64, 2.11±0.67 และ 2.14±0.62 µM ตามลำดับ ปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ในเลือดมีแนวโน้มที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (2.20±0.64 µM) แต่เป็นการลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (ตารางที่ 3)

Table 3. Effects of folk wisdom boiled herb extract, *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn, *Phyllanthus acidu*s (L.) Skeels, and *Pandanus amaryllifolius* on hematopoietic cells are demonstrated by malondialdehyde level, the percent of phagocytosis index, and platelet aggregation.

Sample	Concentration (µg/mL)	Malondialdehyde level (µM) (mean±SD)*	The percentage of phagocytosis index (mean±SD)*	The percentage of platelet aggregation (mean±SD)*
Vehicle control	0	2.20±0.64	29.9±7.4	27.13±5.85
Boil herb extract	100	2.03±0.64	36.7±17.5	14.89±8.99
	200	2.20±0.67	42.8±14.2	16.12±9.87
	400	2.14±0.62	42.2±14.7	16.98±9.15

** Samples were tested in triplicate and 3 time-independent experiments.*

4. ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล

หากสารสกัดมีฤทธิ์ในการเพิ่มการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโตรฟิล จะทำให้ร้อยละของเซลล์ที่จับกินสิ่งแปลกปลอมในที่นี้คือเชื้อ *E. coli* มีค่าเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 1) จากผลการทดสอบพบว่า สารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL มีร้อยละของเซลล์ที่จับกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 36.7±17.5, 42.8±14.2 และ 42.2±14.7 ตามลำดับ โดยกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับร้อยละ 29.9±7.4 และเมื่อคำนวณเป็นอัตราการเพิ่มขึ้นของเซลล์ในการจับกินเชื้อ *E. coli* (increasing ratio) พบว่ามีค่าเท่ากับ 1.22±0.58, 1.43±0.47 และ 1.41±0.49 ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL นั้น ออกฤทธิ์เพิ่มการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโตรฟิลในการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 2)

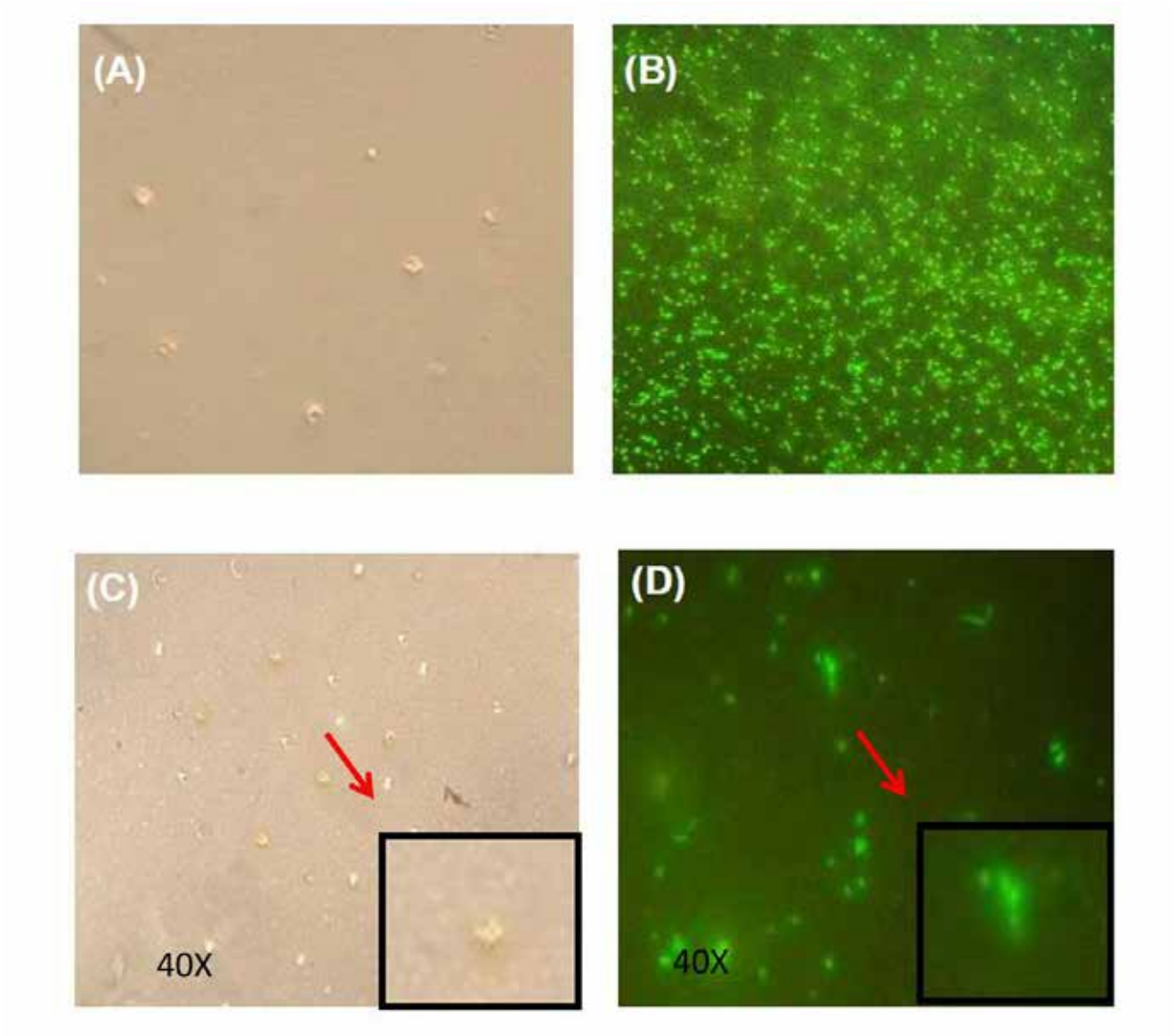


Figure 1 *Determination of phagocytic function of neutrophil using fluorescence microscope (A) Neutrophil in bright field microscope, (B) E.coli in fluorescence microscope, (C) and (D) the phagocytic function of neutrophil in bright field microscope and fluorescence microscope (40X), respectively.*

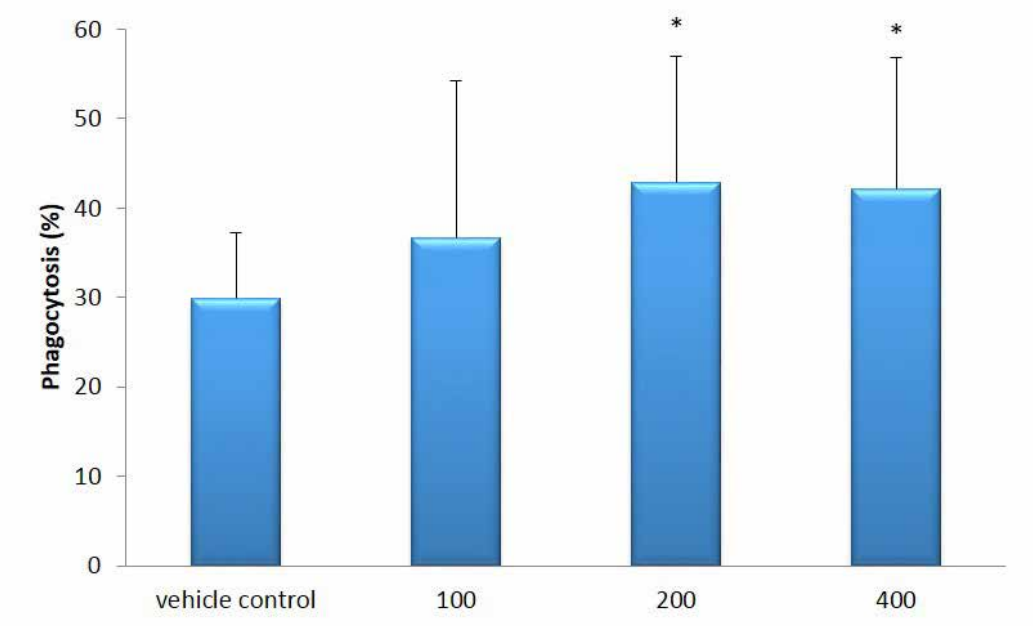


Figure 2 *Effects of folk wisdom boiled herb extract, Phyllanthus amarus Schum&Thorn, Phyllanthus acidus (L.) Skeels, and Pandanus amaryllifolius on phagocytic function of neutrophil. Data are shown as mean±SD (n=10). Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control (p<0.05).*

5. ผลของสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

เมื่อทำการผสมเกล็ดเลือดกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL พบว่าร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดมีค่าเท่ากับ 14.89±8.99, 16.12±9.87 และ 16.98±9.15 ตามลำดับ สารสกัดทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีร้อยละการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเท่ากับ 27.13±5.85 และพบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้น มีค่าการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่มากกว่าแอสไพริน ซึ่งเป็น positive control (ร้อยละ 19.88±6.70) (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 3)

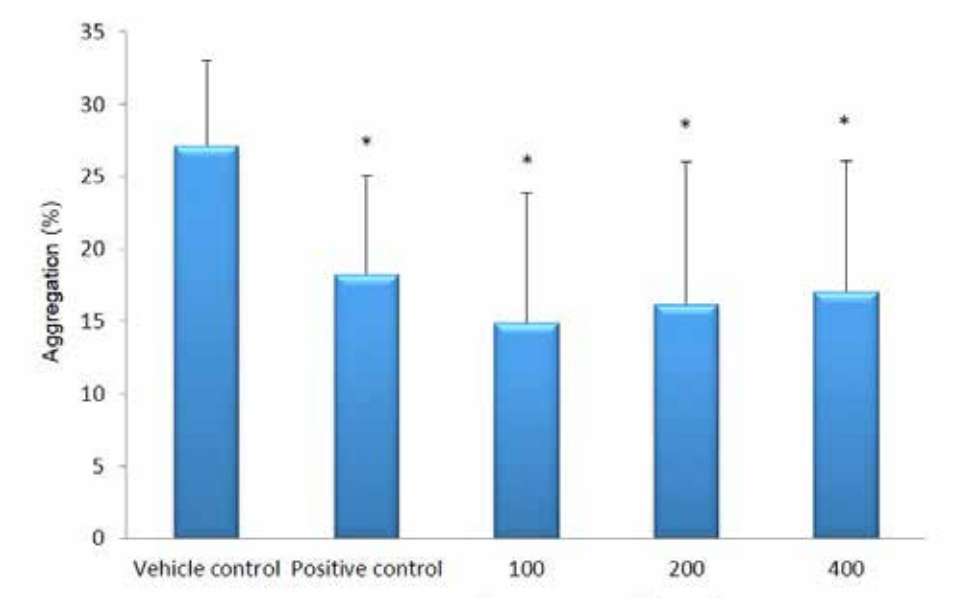


Figure 3 *Effects of folk wisdom boiled herb extract, Phyllanthus amarus Schum&Thorn, Phyllanthus acidus (L.) Skeels, and Pandanus amaryllifolius on platelet aggregation. Data are shown as mean±SD (n=10). Asterisks (*) denote value that were significantly different from the vehicle control (p<0.05).*

วิจารณ์ผลการศึกษา

สารสกัดจากน้ำต้มยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม เป็นยาแผนโบราณที่ยังมีการนำมาใช้เพื่อบำรุงร่างกายในชุมชนบ้านต้นตะเคียน ตำบลศรีถ้อย อำเภอแม่ใจ จังหวัดพะเยา พบว่ามีผลยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในเม็ดเลือดแดงที่มีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของเม็ดเลือดแดงในการกำจัดอนุมูลอิสระ (ไดอัลดีไฮด์) เพียงเล็กน้อยเท่านั้น อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในสารสกัดน้ำต้มยาหม้อสมุนไพรมีปริมาณน้อย หรืออาจเกิดจากกระบวนการเตรียมสารสกัดจากการต้มสมุนไพรด้วยความร้อนทำให้มีการสูญเสียสารสำคัญ การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลและสลายตัวได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 70 °C ขึ้นไป[9] และเตยหอมที่นำมาใช้เตรียมยาหม้อสมุนไพรในครั้งนี้มีสารแอนโทไซยานินเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอยู่ด้วยเช่นกัน[10] ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ลดลงน่าจะเป็นผลจากความร้อนที่ใช้ในการต้มน้ำสมุนไพร อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารสกัดมีแนวโน้มช่วยลดสารอนุมูลอิสระชนิดไดอัลดีไฮด์นี้ จึงนับเป็นข้อดีของสารสกัดโดยเฉพาะหากบริโภคอย่างต่อเนื่องน่าจะมีผลต่อการลดอนุมูลอิสระได้เพิ่มมากขึ้น

ผลการทดสอบสารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ต่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 µg/mL สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยคอลลาเจนได้ และเนื่องจาก ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม มีสารควอร์ซิติน (quercetin) เป็นองค์ประกอบร่วมอยู่ด้วย[11-13] และงานวิจัยของ Kobzar และคณะ[14] ได้ศึกษาฤทธิ์ของสารควอร์ซิตินที่ได้จากการสกัดจากพืชยืนยันว่ามีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) ของเกล็ดเลือด ส่งผลให้กรดอะราชิโนอิค (arachidonic acid) ไม่ถูกเปลี่ยนเป็นสารทรอมบ๊อกเซน เอทู (Thromboxane A_2) เกล็ดเลือดจึงไม่เกิดการเกาะกลุ่มกัน ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดจากสารสกัดยาหม้อสมุนไพรที่นำมาทดสอบนี้ น่าจะเป็นผลมาจากสารควอร์ซิตินที่พบในลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม

ในภาวะปกติของร่างกาย หากไม่เกิดพยาธิสภาพบริเวณหลอดเลือด เกล็ดเลือดที่ล่องลอยอยู่ในกระแสเลือดจะอยู่ในระยะพัก (resting platelet) และไม่เกิดการทำงานในกระบวนการห้ามเลือด แต่จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ในผู้ป่วยโรคมะเร็ง[15] โรคธาลัสซีเมีย[16] โรคเบาหวาน[17] และภาวะเมตาบอลิกซินโดรม[18] มีการกระตุ้นการทำงานของเกล็ดเลือดมากผิดปกติในร่างกาย เกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้น (activated platelet) นี้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (thrombosis) ในบริเวณหลอดเลือดที่สำคัญ เช่น หลอดเลือดสมองและหลอดเลือดหัวใจ ส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้[19] ดังนั้นการที่สารสกัดจากยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้นั้น น่าจะเป็นประโยชน์ในการป้องกันการเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันได้

จากการศึกษาสารที่มีอยู่ในลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม พบว่ามีสารฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย[20-22] สารฟลาโวนอยด์มีผลต่อการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน การหลั่งสารซัยโตคัยน์ (cytokine) ที่เกิดขึ้นจากการตอบสองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน[23] แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น ยังไม่ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อการทำหน้าที่ของเซลล์นิวโตรฟิล ผลการศึกษาการทำงานของเซลล์นิวโตรฟิลในครั้งนี้เป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากสารสกัดที่ความเข้มข้น 200 และ 400 µg/mL ช่วยเพิ่มการความสามารถของเซลล์นิวโตรฟิลในการจับกินสิ่งแปลกปลอมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ดังนั้นจึงควรแยกสารสกัดหยาบนี้ให้เป็นสารบริสุทธิ์ ด้วยวิธี liquid chromatography และศึกษากลไกการทำหน้าที่ของเซลล์ต่อไป จากผลการศึกษาในครั้งนี้จะสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นและเป็นประโยชน์ในการนำยาหม้อสมุนไพร ลูกใต้ใบ มะยม และเตยหอม ภูมิปัญญาชาวบ้านไปประยุกต์ใช้และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ของชุมชนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และน้ำยาสำหรับตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้ และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Nilesh KJ, Santram L, Avijeet J, Alok N, Abhay KS. Effect of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels fruit on carbon tetrachloride-induced acute oxidative damage in livers of rats and mice. J Chin Integr Med. 2011; 9: 49-56.
2. Johnson M, Alias A. Somoclonal variation studies on *Phyllanthus amarus* schum & Thonn. Int J Biochem. 2007; 5(4): 240-5.
3. Dhar ML, Dhar MM, Dhawan BN, Mehrotra BN, Ray C. Screening of Indian plants for biological activity: part I. Indain J Exp Biol .1968; 6: 232-47.
4. Ooi LS, Sun SS, Ooi VE. Purification and characterization of a new antiviral protein from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandanaceae). Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(8): 1440-6.
5. Nor FM, Mohamed S, Idris NA, Ismail R. Antioxidative properties of *Pandanus amaryllifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. Food Chem. 2008; 110(2): 319-27.
6. Chirico S. High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. Methods Enzymol. 1994; 233: 314-8.
7. Wardle EN. Assessment of neutrophil function-II. Laboratory tests of neutrophil function. Postgrad Med J. 1986; 62(734): 1089-92.
8. Bednar B, Condra C, Gould RJ, Connolly TM. Platelet aggregation monitored in a 96 well microplate reader is useful for evaluation of platelet agonists and antagonists. Thromb Res. 1995; 77(5): 453-63.
9. Amic D, Davidovic D, Beslo D and Trinajstic N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. Croat Chem Acta. 2003; 76: 55-61.
10. Jimtaisong A, Krisdaphong P. Antioxidant activity of *Pandanus amaryllifolius* leaf and root extract and its application in topical emulsion. Trop J Pharm Res. 2013; 12(3): 425-31.
11. Jain NK, Singhai AK. Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats. Asian Pac J Trop Med. 2011; 4(6): 470-4.
12. Nor FM, Mohamed S, Idris NA, Ismail R. Antioxidative properties of *Pandanus amaryllifolius* leaf extracts in accelerated oxidation and deep frying studies. Food Chem. 2008; 110(2): 319-27.
13. Harikumar K, Kuttan R. An extract of *Phyllanthus amarus* protects mouse chromosomes and intestine from radiation induced damages. J Radiat Res. 2007; 48: 469-76.
14. Kobzar G, Mardla V, Samel N. Effects of α-tocopherol, l-arginine, and quercetin on aggregation of human platelets. Nutr Res. 2005; 25(6): 569-75.
15. Furie B, Furie BC. Cancer-associated thrombosis. Blood Cell Mol Dis. 2006; 36(2): 177-81.
16. Setiabudy R, Wahidiyat PA, Setiawan L. Platelet aggregation and activation in thalassemia major patients in Indonesia. Clin Appl Thromb Hemost. 2008; 14(3): 346-51.
17. Lopez E, Berna-Erro A, Hernandez-Cruz JM, Salido GM, Redondo PC, Rosado JA. Immunophilins are Involved in the Altered Platelet Aggregation Observed in patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Curr Med Chem. 2013; 20(14): 1912-21.
18. Franchini M, Targher G, Montagnana M, Lippi G. The metabolic syndrome and the risk of arterial and venous thrombosis. Thromb Res. 2008; 122(6): 727-35.

19. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. N Engl J Med. 2007; 357: 2482-94.
20. Antara S, Amla B. The study of in vitro and in vivo antioxidant activity and total phenolic content of *Phyllanthus amarus* Schum&Thorn: A medicinally important plant. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5(3): 942-7.
21. Tapas, AR, Sakarkar, DM, Kakde, RB. Flavonoids as nutraceuticals: A Review. Trop J Pharm Res. 2008; 7: 1089-99.
22. Jain NK, Singhai AK. Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats. Asian Pac J Trop Med. 2011; 4: 470-4.
23. Middleton E Jr. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. Biochem Pharmacol. 1992; 43(6): 1167-79.