

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรไทยต่อการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และกระบวนการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลอง

Inhibitory effect of various Thai natural plants ethanolic extracts on platelet aggregation and blood coagulation *in vitro*

■ สุวิทย์ ดวงมะโน^{1*} สุรางคนา วงศ์งาม¹ ปองหทัย ลาดจันทร์ดี¹
Suwit Duangmano^{1*} Surangkana Wonkngam¹ Ponghathai Ladchantha¹
วริศรา ปะละนัน¹ อรกมล วงศ์ทะกัณเฑ²
Warissara Palanan¹ Omkamon Wongtagan²

¹แขนงวิชาจุลทรรศน์ศาสตร์คลินิก ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

¹Division of Clinical Microscopy, Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, Thailand

²หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

²Division of Hematology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai Province, Thailand

* ผู้รับผิดชอบบทความ (Email: suwit.du@cmu.ac.th)

* Corresponding author (Email: suwit.du@cmu.ac.th)

Received September 2015

Accepted as revised November 2015

Abstract

Introduction: Platelets and blood coagulation play critical roles in haemostasis and also mediate pathologic thrombosis, responsible for cardiovascular diseases (CVD). Surgery and anti-platelet drugs has been used for the therapeutic purposes. However, some side effects are concerned such as bleeding, thrombocytopenia, etc. Therefore, natural herbal extracts may be a good candidate to counteract hemostatic disturbs with little or less side effects.

Objective: To investigate antiplatelet and anticoagulant effects of 14 different Thai natural plant ethanolic extracts. They were the extracts from *Phyllanthus amarus*, *Tagetes erecta*, *Tinospora crispa*, *Angelica sinensis*, *Acorus calamus*, *Atractylodes lancea*, *Curcuma latifolia*, *Ligusticum sinense*, *Homalomena noboguine-ensis*, *Butea monosperma*, *Cissus quadrangularis*, *Artemisia annua*, *Pachyrrhizus erosus*, and *Curcuma zedoaria*.

Materials and methods: Platelet aggregation using light transmission platelet aggregometer and platelet viability determined by microculture tetrazolium (MTT) assay were studied. Effect of the extracts on blood coagulation was studied by prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). These assays were monitored before and after treated with the extracts.

Results: *Curcuma zedoaria* extract significantly interfered platelet aggregation with 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 4.8 mg/ml at $p < 0.05$ when compared with control. However, it did not show any toxicity to platelet viability. Moreover, it did not inhibit blood coagulation. Other herbal extracts did not have any effect platelet aggregation or blood coagulation.

Conclusion: *Curcuma zedoaria* has inhibitory effect on platelet aggregation. It was still unclear in its mechanism. So, mechanism of action of *Curcuma zedoaria* extract on platelet aggregation inhibition should be further on studied. This would be a candidate for potential antithrombotic and antiplatelet drug which can be a new approach for management and treatment of patients with cardiovascular diseases.

Bull Chiang Mai Assoc Med Sci 2016; 49(1): 77-89. Doi: 10.14456/jams.2016.9

Keywords: Thai natural plants, antiplatelet drug, blood coagulation, platelet aggregation

บทคัดย่อ

บทนำ: เกล็ดเลือด และการแข็งตัวของเลือด มีบทบาทสำคัญในกระบวนการห้ามเลือด อีกทั้งยังมีส่วนทำให้เกิดการอุดตันของลิ่มเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่งลิ่มเลือดในหลอดเลือดของผู้ป่วยที่มีพยาธิสภาพของหลอดเลือดและหัวใจ ปัจจุบันการผ่าตัดและการใช้ยาต้านการเกิดลิ่มเลือดได้ถูกนำมาใช้ในทางคลินิกอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม วิธีการเหล่านี้อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงในการรักษา เช่น ภาวะเลือดออก เกล็ดเลือดต่ำ ดังนั้นจึงมีความพยายามในการสรรหาทางเลือกใหม่จากสารสกัดสมุนไพรธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดลิ่มเลือดที่ไม่มีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย 14 ชนิด ประกอบด้วย ลูกใต้ใบ ดาวเรือง บอระเพ็ด โกงฐเชียง ว่านน้ำ โกงฐเขมา ว่านมหาทาลัง โกงฐหัวบัว ว่านหน่่านทอง ทองกวาว เพชรสังฆาต โกงฐพาลัมพา มันแกว และขมิ้นอ้อย ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด เมื่อกระตุ้นด้วยสาร ADP และยับยั้งการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลอง รวมถึงการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและเป็นพิษต่อเกล็ดเลือด

วัสดุและวิธีการ: ศึกษาผลของสารสกัดที่มีผลต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregometer) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดต่อเกล็ดเลือดโดยวิธี MTT และศึกษาฤทธิ์ต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือดโดยการทดสอบ prothrombin time (PT) และ activated partial thromboplastin time (aPTT)

ผลการศึกษา: พบว่าสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และไม่เป็นพิษต่อเกล็ดเลือด รวมทั้งไม่มีผลต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลอง ส่วนสมุนไพรอื่นๆ ไม่มีฤทธิ์ทั้งในด้านการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและกระบวนการแข็งตัวของเลือด

สรุปผลการศึกษา: สารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้ แต่การศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นอ้อยในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ดังนั้น เพื่อนำไปสู่การพัฒนาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะลิ่มเลือดอุดตันในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดและหัวใจในอนาคต จึงควรศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการทำงานของสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อย

วารสารเทคนิคการแพทย์เชียงใหม่ 2559; 49(1): 77-89. Doi: 10.14456/jams.2016.9

คำรหัส: พืชสมุนไพรไทย ยาต้านเกล็ดเลือด การแข็งตัวของเลือด การเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

บทนำ

เกล็ดเลือดที่อยู่ในระบบไหลเวียนเลือดของร่างกายมีขนาดเล็ก รูปร่างกลม (discoïd shape) ขนาด 1.5-2.5 ไมโครเมตร เป็นเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส สร้างมาจากไซโตพลาสซึมของเมกะคาริโอไซต์ (megakaryocyte) ในไขกระดูกวันละประมาณ 35×10^9 หน่วย มีอายุประมาณ 9-10 วันในระบบไหลเวียนเลือด คนปกติมีปริมาณเกล็ดเลือด $1.5-4 \times 10^9$ /ไมโครลิตร เกล็ดเลือดมีบทบาทในการช่วยอุดบาดแผลที่เกิดจากการฉีกขาดของ

หลอดเลือด โดยการรวมกลุ่มกันเป็นก้อน (plug) ที่บริเวณหลอดเลือดฉีกขาด อุดบาดแผลเพื่อหยุดการไหลของเลือดออกนอกร่างกาย¹

เกล็ดเลือดยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดลิ่มเลือดอุดตัน โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือดที่มีภาวะ atherosclerosis การเกิดลิ่มเลือดอุดตันเริ่มจากการมีคราบพลัค (plaque) สะสมที่ผนังหลอดเลือด (atherosclerotic) ด้านบนสุดของ plaque ปกคลุมด้วยเยื่อไฟบรัส (fibrous cap) ที่

มีคุณสมบัติเปราะแตกได้ง่าย และเมื่อมีการปริหรือหลุดลอกของ fibrous cap ทำให้คอลลาเจน (collagen) เผยออก กระตุ้นให้เกิดการเกาะติดของเกล็ดเลือด และเกล็ดเลือดเปลี่ยนรูปร่างหลั่งสารที่เก็บอยู่ภายในออกมากกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเพิ่มขึ้น รวมถึงกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือดจนเกิดเป็นลิ่มเลือดอุดตันการไหลของเลือดภายในหลอดเลือดและยังสามารถหลุดลอยไปในกระแสเลือด (thromboembolism) อุดตันในหลอดเลือดขนาดเล็กทั่วร่างกาย ก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจและหลอดเลือดสมอง เช่น acute coronary syndrome, coronary vascular disease, cerebrovascular disease และโรคของหลอดเลือดอื่น ๆ²⁻⁴

เนื่องจากการกระตุ้นเกล็ดเลือดเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของการเกิด thromboembolism งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น เช่น aspirin, clopidogrel, theophyllin, caffeine และ dipyridamole เป็นต้น แต่ยาเหล่านี้มักมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น ทำให้เลือดออกในระบบทางเดินอาหาร การระคายเคืองในกระเพาะอาหาร เกิดแผลในกระเพาะอาหาร และมะเร็งกระเพาะอาหาร อีกทั้งยังมีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงมีการศึกษาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดลิ่มเลือดเพิ่มมากขึ้น^{5,6} เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ มีผลข้างเคียงน้อยกว่าสารเคมีสังเคราะห์ สารสกัดบริสุทธิ์จากพืชหลายชนิดได้มีการนำมาศึกษาแล้ว เช่น สารสกัด curcumin จากขมิ้นชันพบว่ามีฤทธิ์ต้านการทำงานของเกล็ดเลือดโดยยับยั้งการสร้าง thromboxane และยับยั้ง Ca^{2+} signaling^{7,8} สารสกัด magnolol จากเปลือกของต้นแมกโนเลียมีฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเกล็ดเลือด

โดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน PPAR⁹ สารสกัด catechin จากชาเขียวมีฤทธิ์ต้านการทำงานของเกล็ดเลือดโดยยับยั้งการสร้าง thromboxane^{10,11} สารสกัดเคอควิซีน (quercetin) เป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) พบได้ในหัวหอม หอมแดง และพืชตระกูลถั่ว¹² มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดโดยเพิ่ม cAMP และยับยั้งกระบวนการ phosphorylation ของโปรตีน MAPK^{13,14} แสดงให้เห็นว่าการนำสารสกัดจากสมุนไพรมาทดสอบหาฤทธิ์ในการต้านการทำงานของเกล็ดเลือดเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและรักษาภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดในผู้ป่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีความสนใจศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรไทยพื้นบ้านในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและกระบวนการแข็งตัวของเลือด และคัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้มากที่สุดมาศึกษาในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดและเป็นพิษต่อเกล็ดเลือด

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. พืชสมุนไพร

ใช้สมุนไพรไทยพื้นบ้านจำนวน 14 ชนิด ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ คุณสมบัติทางเภสัช และส่วนของพืชที่นำมาสกัดสารออกฤทธิ์ดังแสดงในตารางที่ 1 ทำการสกัดแยกสารด้วยเอทานอล (ethanolic extraction) ณ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นเจือจางสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 14 ชนิดด้วยสารละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich®, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 mg/mL

Table 1 Thai natural plants and their medical properties.

Species	Plant parts extracted	Medical properties
<i>Phyllanthus amarus</i>	Stem & Leaf	- Antimicrobial activity ¹⁵ - Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization ¹⁶ - Anti-oxidant and hepato-protective activity ¹⁷
<i>Targetes erecta</i>	Flower	- Anticancer activity ¹⁸
<i>Tinospora crispa</i>	Stem	- Antidiabetic ¹⁹ - Anticholinesterase inhibitory activity ²⁰ - Antiparasitic activity ²¹

Table 1 Thai natural plants and their medical properties. (continued)

Species	Plant parts extracted	Medical properties
<i>Acorus calamus</i>	Rhizome	- Anticandidal activity ²² - Wound-healing activity ²³ - Anti-inflammatory activity ²⁴ - Inhibit anaphylactic reactions ²⁵
<i>Angelica sinensis</i>	Rhizome	Reduction of oxidative stress ²⁶ - Against <i>Aedes aegypti</i> ²⁷ - Antidiabetic ²⁸ - Nephroprotective effects ²⁹
<i>Curcuma latifolia</i>	Rhizome	-
<i>Ligusticum sinense</i>	Rhizome	- Antioxidant ³⁰
<i>Curcuma zedoaria</i>	Rhizome	Inhibit Proliferation of Human Breast Cancer Cell ³¹ - Treatment diarrhea, cancer, flatulence and dyspepsia ³² - Antimicrobial activity ³³
<i>Atractylodes lancea</i>	Rhizome	- Anticancer ³⁴ - Anti-inflammatory ³⁵ - Stimulated small intestinal motility ³⁶
<i>Butea monosperma</i>	Flower	- Anticancer ³⁷ - Anti-inflammation ³⁸
<i>Artemisia annua</i>	Stem & Leaf	- Antioxidant, Anti-inflammation ³⁰
<i>Pachyrrhizus erosus</i>	Seed	- Antifungal protein ³⁹ - Spasmolytic activity ⁴⁰
<i>Homalomena noboguinensis</i>	Rhizome	-
<i>Cissus quadrangularis</i>	Rhizome	- Fracture healing/ bone setter ⁴¹ - Analgesic activity ⁴²

2. การเตรียม Platelet Rich Plasma (PRP)

คัดเลือกอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-25 ปี ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษานี้อาสาสมัครทุกคนต้องไม่ได้รับยาหรืออาหารที่มีผลต่อการทำงานของเกล็ดเลือด เช่น แอสไพริน หรือ เฮพาริน ไม่มีประวัติพบความผิดปกติของกระบวนการแข็งตัวของเลือด และไม่เคยได้รับการวินิจฉัยว่าพบความผิดปกติของตับโดยการศึกษานี้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะเทคนิคการแพทย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เลขที่รับรอง 799/2014

3. การเตรียมเกล็ดเลือดสำหรับทดสอบ

เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำของอาสาสมัคร 10 mL ผสมกับ 3.2% sodium citrate ในอัตราส่วน เลือด: 3.2% sodium citrate 9:1 บันเบาที่ความเร็ว 140 g (Kokusan model H-103RS, Japan) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 22 °C จากนั้นแยกส่วน platelet rich plasma (PRP) ออกมาส่วนหนึ่ง ใส่หลอดพลาสติกไว้ นำเลือดส่วนที่เหลือไปปั่นหนักที่ความเร็ว 1500 g นาน 10 นาที แยก platelet poor plasma (PPP) ใส่หลอดพลาสติก และนับจำนวนเกล็ดเลือดใน PRP ที่ได้ โดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดอัตโนมัติ (NIHON KOHDEN Celltac F, Japan) ปรับความเข้มข้นเกล็ดเลือดให้ได้จำนวน $3.0\text{--}3.5 \times 10^5$ / μL ด้วย PPP โดยเก็บเกล็ดเลือดที่เตรียมได้ไว้ในอุณหภูมิห้อง และทำการทดลองภายใน 2 ชั่วโมง

4. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

หลังจากปรับความเข้มข้นของเกล็ดเลือดใน PRP แล้วดูด PRP ปริมาตร 400 μL ใส่ลงใน cuvette พร้อมแท่งแม่เหล็ก เติมสารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดปริมาณ 50 μL ลงใน cuvette นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำ cuvette ใส่ในช่องวัดของเครื่องวัดเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Chrono-Log aggregometer, USA) เติมสารกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (adenosine diphosphate, Sigma-alrich) ความเข้มข้น 10 μM ปริมาตร 50 μL ลงไปใน cuvette เครื่องทำการวิเคราะห์โดยอาศัยหลักการวัดการเปลี่ยนแปลงความทึบแสงที่ผ่านกลุ่มเกล็ดเลือด แสดงผลเป็นกราฟ และคำนวณร้อยละของการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (% platelet aggregation) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ Platelet aggregation} = \frac{\% \text{ Platelet aggregation}_{\text{สารสกัด}}}{\% \text{ Platelet aggregation}_{\text{control}}} \times 100$$

5. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรกระบวนการแข็งตัวของเลือด

ผสมสารสกัดสมุนไพร ปริมาตร 10 μL กับ PPP ปริมาตร 90 μL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 นาที

จากนั้นเตรียมน้ำยาสำหรับทดสอบ PT (NEOPLASTINE® CI PLUS, Diagnostica stago S.A.S., France) และ aPTT (C.K. PREST®, Diagnostica stago S.A.S., France) ตามคู่มือ เมื่อครบเวลาผสมน้ำยา PT 200 μL อ่านผลการทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือด Diagnostica Stago Start® 4 Hemostasis analyzer (Diagnostica stago S.A.S., France) บันทึกค่า PT สำหรับการทดสอบ aPTT เมื่อครบเวลาเติมน้ำยา aPTT 100 μL จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 นาที เมื่อครบเวลา เติมสารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 0.025 μM ปริมาตร 100 μL อ่านผลการทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดและบันทึกค่า aPTT จากนั้นทำ PT และ aPTT สำหรับตัวอย่างควบคุม โดยดูดพลาสมา 100 μL จาก PPP ที่ไม่ได้ผสมกับสารสกัดมาทำการทดสอบ PT และ aPTT ด้วยวิธีเดียวกัน

6. การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรต่อเกล็ดเลือดโดยวิธี MTT assay

ใช้ microplate ขนาด 96 หลุม ใส่เกล็ดเลือดจำนวน 1×10^5 /well จากนั้นเติมสารสกัดหยาบความเข้มข้นที่ต้องการ ปริมาตร 10 μL นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติมน้ำยา MTT ปริมาตร 10 μL ลงทุกหลุม นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม DMSO 100 μL วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader (M965+ Microplate Reader Metertech, Taiwan) ที่ความยาวคลื่น 570 nm หักลบค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm นำไปคำนวณหาค่าร้อยละการมีชีวิตรอด (% cell viability) ดังนี้

$$\% \text{ platelet viability} = \frac{(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{630})_{\text{สารสกัด}}}{(\text{OD}_{570} - \text{OD}_{630})_{\text{control}}} \times 100$$

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์และนำเสนอข้อมูลที่ได้จากการคำนวณในรูปแบบ mean $\pm$ SD และเนื่องจากข้อมูลมีค่าการแจกแจงแบบไม่ปกติ (nonparametric) จึงเลือกใช้สถิติ Mann-Whitney U method test เพื่อเปรียบเทียบค่า mean ของสองกลุ่มที่เป็นอิสระต่อกัน

ผลการศึกษา

1.ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรต่อกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด

การทดสอบใช้ platelet rich plasma (PRP) ผสมกับ สารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร ทั้ง 14 ชนิดที่ความเข้มข้น 2 mg/mL เพื่อคัดเลือกรสสมุนไพรที่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบ

จากขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้มากที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 1 ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เลือกศึกษา สารสกัดจากขมิ้นอ้อยต่อการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และความเป็นพิษต่อเกล็ดเลือดที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 mg/mL เปรียบเทียบกับการใช้ยาแอสไพรินเข้มข้น 5 mg/mL และใช้ DMSO เป็นชุดควบคุม

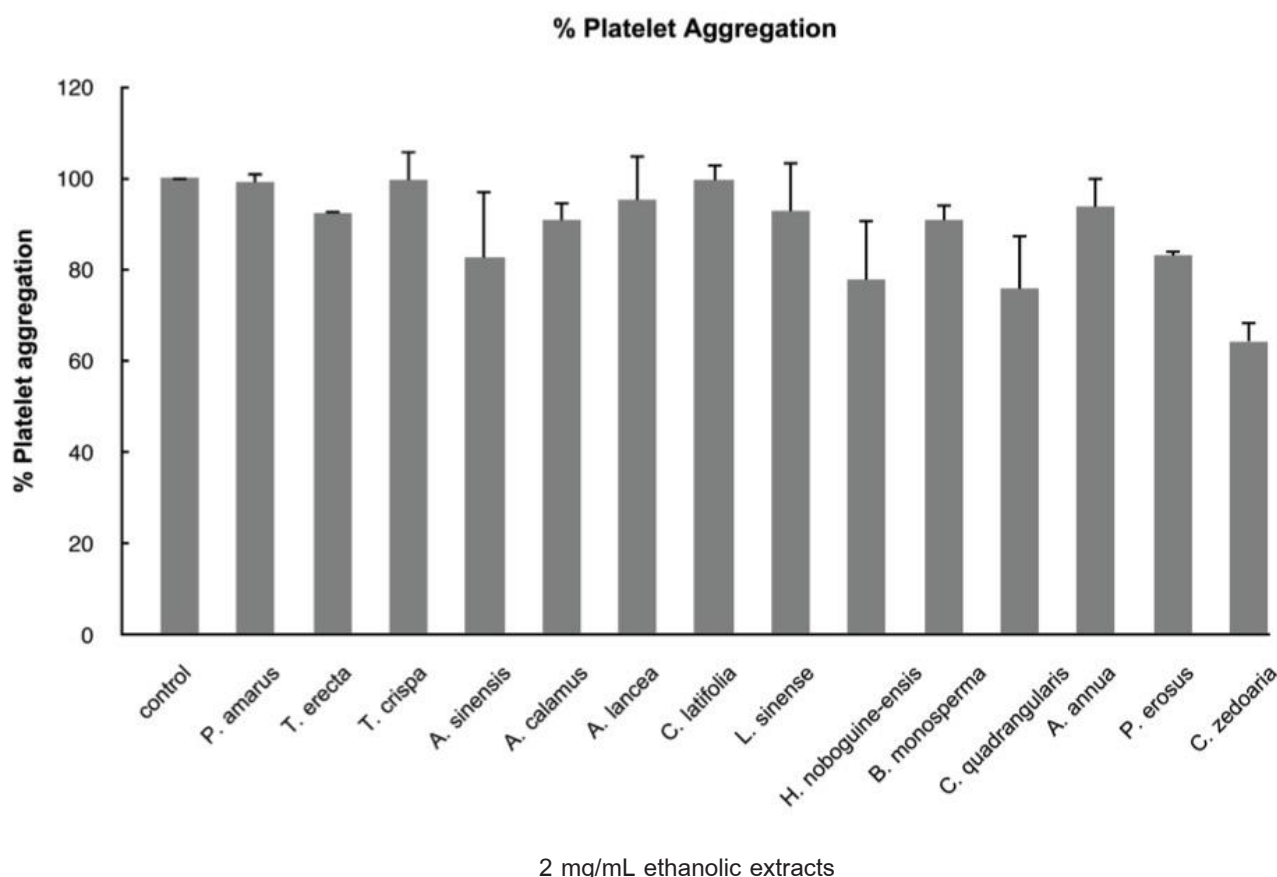


Figure 1 Inhibitory effect of plant ethanolic extracts on platelet aggregation. Platelet rich plasma (PRP) was treated with 2 mg/mL of plant ethanolic extracts, and aggregation of platelet was monitored by a Chrono-Log aggregometer. Results shown are the average of three independent experiments.

ผลการตรวจวัดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดด้วยเครื่อง Chrono-Log aggregometer เมื่อเติมสาร DMSO สารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 mg/mL และยาแอสไพรินเข้มข้น 5 mg/mL ลงใน PRP แล้วเติมสาร ADP เข้มข้น 10 μ M เพื่อกระตุ้นการเกาะกลุ่ม แสดงกราฟเป็นร้อยละของการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในแกนตั้งและเวลาที่ใช้ในการตรวจวัดในแกนนอน ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อเติมสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยเข้มข้น 1, 2, 3, 4, และ 5 mg/mL มีค่าเท่ากับร้อยละ 83.48 $\pm$ 4.4, 64.25 $\pm$ 4.4, 50.33 $\pm$ 4.2, 46.81 $\pm$ 2.7

และ 44.00 $\pm$ 1.0 ตามลำดับ และแตกต่างกับค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อเติมยาแอสไพรินเข้มข้น 5 mg/mL (mean $\pm$ SD) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 3 เห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยที่มีความเข้มข้นสูง (5 mg/mL) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้มากกว่าความเข้มข้นต่ำ (1 mg/mL) และเมื่อคำนวณค่ายับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ร้อยละ 50 (IC₅₀) ของสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยได้เท่ากับ 4.8 mg/mL

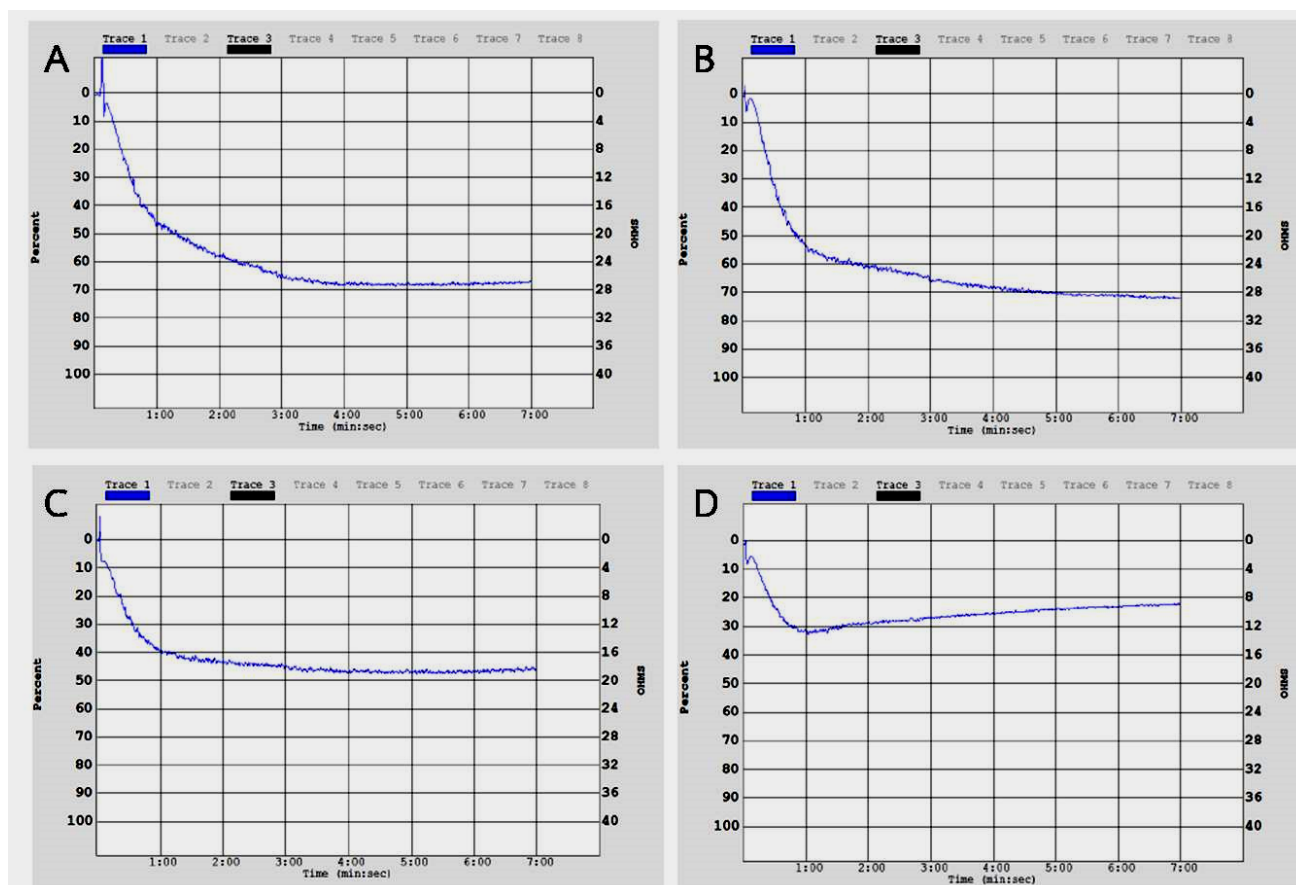


Figure 2 Effect of ethanolic extract from *Curcuma zedoaria* on platelet aggregation. Platelet rich plasma (PRP) was treated with 2 and 4 mg/mL of ethanolic extract from *Curcuma zedoaria*, and aggregation of platelet was monitored by a Chrono-Log aggregometer (A) ADP only (B) DMSO (C) 2 mg/mL ethanolic extract from *Curcuma zedoaria* (D) 4 mg/mL ethanolic extract from *Curcuma zedoaria*.

Curcuma Zedoaria

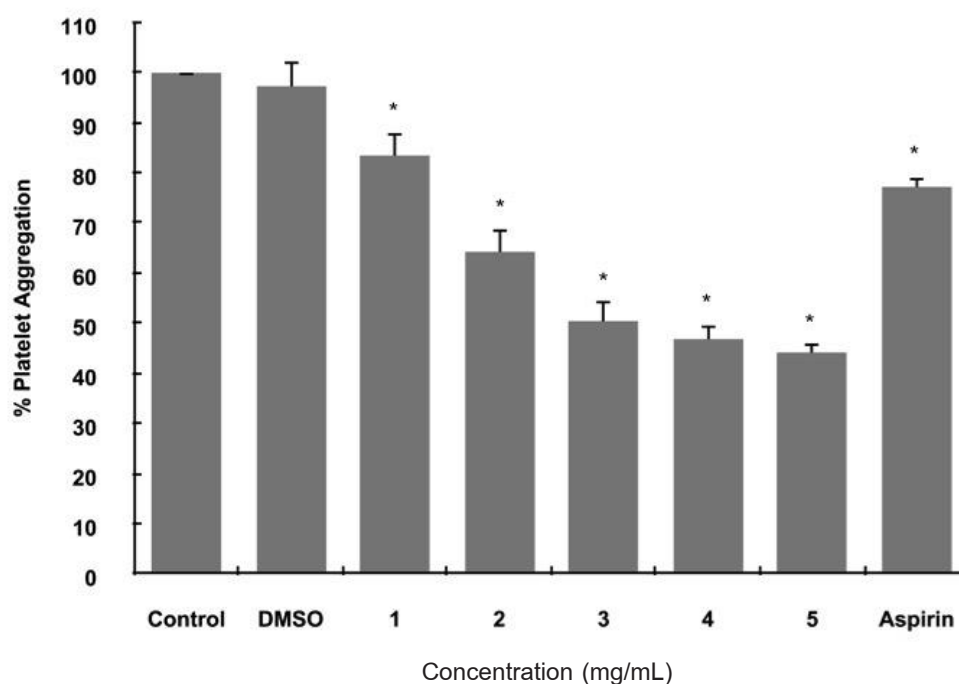


Figure 3 Inhibitory effect of ethanolic extract from *Curcuma zedoaria* on platelet aggregation. Platelet rich plasma (PRP) was treated with 1, 2, 3, 4 and 5 mg/mL of ethanolic extract from *Curcuma zedoaria*, and aggregation of platelet was monitored by a chrono-Log aggregometer. ADP-activated control, DMSO and 5 mg/mL aspirin were used as control. Results shown are the average of three independent experiments. *, $p < 0.05$ (treated vs control)

2.ฤทธิ์ของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือด

เมื่อทดสอบ prothrombin time (PT) และ activated partial thromboplastin time (aPTT) โดยเติมสารสกัดสมุนไพร 14 ชนิด ได้แก่ ลูกใต้ใบ บอระเพ็ด ดาวเรือง ทองกวาว โกฐเชียง โกฐจุฬาลัมพา โกฐเขมา โกฐหัวบัว ว่านมหากำลัง ว่านหน้าทอง ว่านน้ำ ขมิ้นอ้อย เพชรสังฆาต และมันแกว ที่มีความเข้มข้น

2 mg/mL ลงในพลาสมา พบว่าค่า PT และ aPTT มีค่าอยู่ในช่วงค่าปกติและมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองของพลาสมาที่ไม่ได้เติมสารใดๆ ลงไป ดังแสดงในตารางที่ 2 แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 14 ชนิด ที่สกัดด้วยวิธี ethanolic extraction ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด (ตารางที่ 2)

Table 2 Anticoagulant effects of 14 different Thai natural plant ethanolic extracts. Platelet poor plasma (PPP) was treated with 2 mg/mL of plant ethanolic extracts, and then monitored the blood coagulation by PT and aPTT. Heparin and DMSO were used a control. Results shown are the average of three independent experiments. *, $p < 0.05$ (treated vs control)

Samples	Clotting time (sec)	
	PT	aPTT
Control	11.3±0.8	33.0±2.2
<i>Phyllanthus amarus</i>	11.2±0.9	33.4±1.4
<i>Targetes erecta</i>	11.1±0.9	31.8±2.3
<i>Tinospora crispa</i>	11.5±0.8	32.3±2.2
<i>Ligusticum sinensis</i>	11.6±0.8	33.0±2.1
<i>Curcuma latifolia</i>	11.1±0.8	32.5±2.0
<i>Angelica sinensis</i>	11.3±0.8	32.7±2.3
<i>Acorus calamus</i>	11.3±0.9	33.2±1.4
<i>Homalomena noboguine-ensis</i>	11.5±0.9	33.0±1.8
<i>Curcuma zedoaria</i>	11.2±0.6	32.3±2.5
<i>Atractylodes lancea</i>	11.2±0.9	32.3±2.7
<i>Buteamonosperma</i>	11.4±0.8	32.9±2.6
<i>Artemisia annua</i>	11.4±0.5	32.7±1.9
<i>Pachyrhizus erosus</i>	11.4±0.8	31.5±2.4
<i>Cissus quadrangularis</i>	11.5±0.7	31.4±2.1
Heparin 5 µg/mL	180±0	120±0
Heparin 10 µg/mL	180±0	120±0
DMSO	13.3±1.5	41.3±4.0

3. ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยต่อเกล็ดเลือด

เมื่อเติมสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 mg/mL ลงใน PRP วัดค่าร้อยละการมีชีวิตรอด (% cell viability) ได้เท่ากับ 102.16 ± 9.6 , 101.47 ± 6.4 ,

99.28 ± 5.6 , 95.68 ± 8.1 และ 95.63 ± 4.5 ตามลำดับ ดังแสดงใน รูปที่ 4 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าร้อยละการมีชีวิตรอดของเกล็ดเลือดในชุดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

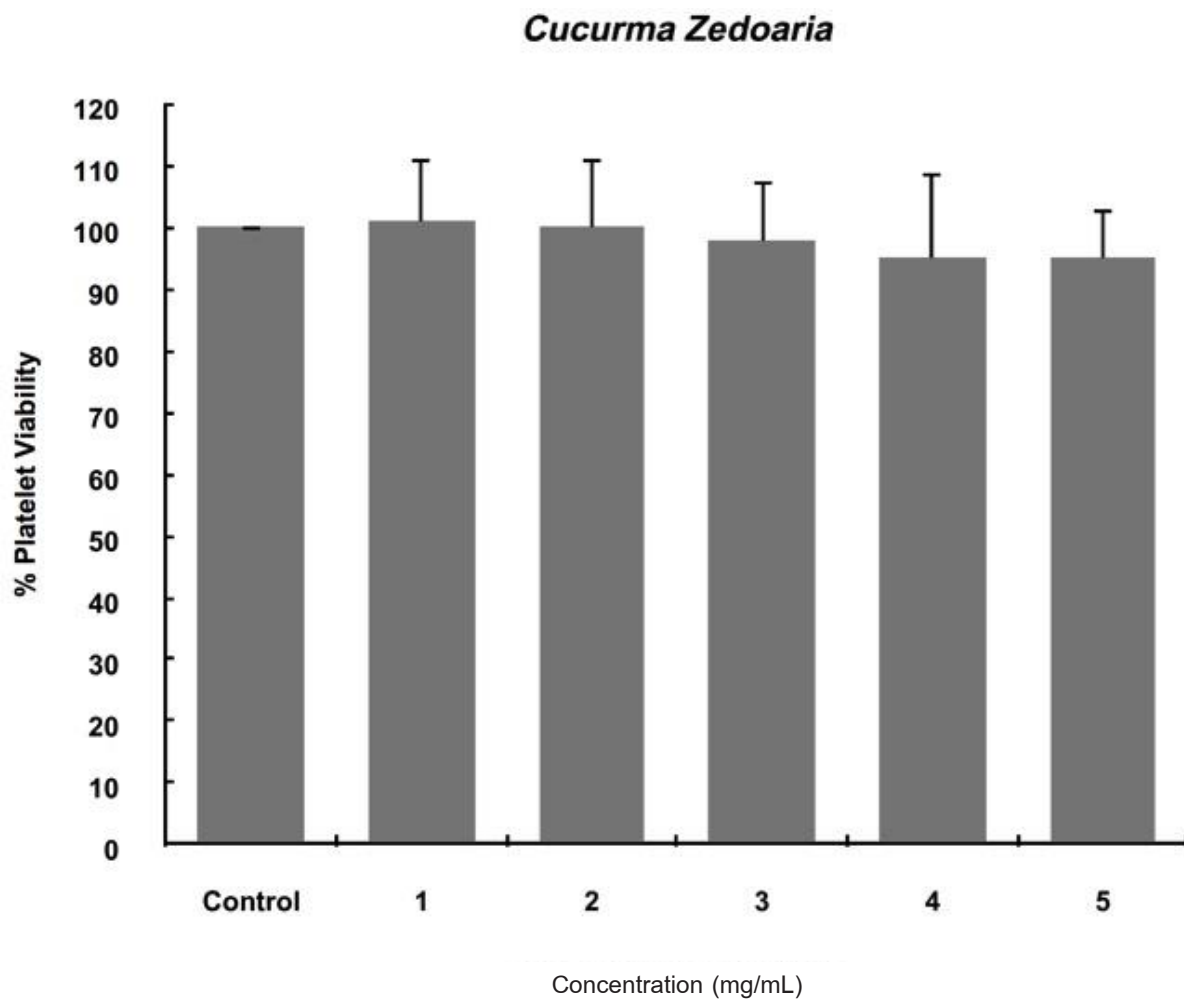


Figure 4 Effect of ethanolic extract from *Curcuma zedoaria* on platelet viability. Platelet rich plasma (PRP) was treated with 1, 2, 3, 4 and 5 mg/mL of ethanolic extract from *Curcuma zedoaria*, and viability of platelet was determined by MTT assay. Results shown are the average of three independent experiments.

วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากสมุนไพรไทย ที่สกัดด้วยวิธี ethanolic extract จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ ลูกใต้ใบ ดาวเรือง บอระเพ็ด โกงฐเชียง ว่านน้ำ โกงฐเขมา มหากำลัง โกงฐหัวบัว นะหน้าทอง ทองกวาว เพชรสังฆาต โกงฐจุฬาลัมพา มันแกว และขมิ้นอ้อย ต่อการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด พบว่า สารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้มาก

ที่สุด โดยที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเกล็ดเลือด จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อย ที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 mg/mL สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย ADP ตามขนาดที่ใช้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.8 mg/mL โดยที่ไม่ได้เป็นผลมาจาก DMSO ที่ใช้ในการละลายสารสกัด โดยที่สมุนไพรอื่นๆ ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วย ADP ซึ่งอาจมีสาเหตุจากสารสกัดหยาบจาก

สมุนไพรทั้ง 13 ชนิด ไม่สามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด หรือ มีสารอื่นที่รบกวนฤทธิ์ด้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ปนอยู่ด้วย หรืออาจมีสาเหตุจากสารสกัดสมุนไพรไม่จำเพาะ ต่อ ADP ที่ใช้ในการกระตุ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า ของ Joon Wan Kang และคณะ ที่พบว่า สาร EATN ที่สกัดได้จากต้นจันทน์เทศ มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่กระตุ้นโดย thrombin และ platelet activating factor แต่ไม่มีผลต่อการกระตุ้นด้วย arachidonic acid⁴³

จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากสมุนไพร ต่อกระบวนการแข็งตัวของเลือด พบว่าค่า PT และ aPTT มีค่าอยู่ในช่วงค่าอ้างอิงและมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม แสดงว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 14 ชนิด ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการแข็งตัวของเลือด อย่างไรก็ตาม ควรทำการทดสอบเพิ่มเติม เช่น เปลี่ยนวิธีสกัดสมุนไพรให้สอดคล้องกับวิธีการที่นำมาใช้ ตามตำรายาพื้นบ้าน เช่น การสกัดด้วยน้ำ การสกัดด้วยเมทานอล (methanolic extract) หรือ การสกัดในรูป essential oil เป็นต้น วิธีการสกัดแต่ละหลักการอาจทำให้ได้สารประกอบในสมุนไพรแตกต่างกัน หรือ ได้สารประกอบแต่ละชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ อาจทำการทดลองในพลาสมาที่เติมเฉพาะสารสกัดสมุนไพรแต่ไม่มี Ca^{2+} หรือ activator เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการเพิ่มความสามารถของกระบวนการแข็งตัวของเลือด เนื่องจากสมุนไพรบางชนิดมีสรรพคุณในการสมานบาดแผล เช่น ว่านน้ำ ซึ่งคล้ายกับฤทธิ์ของสมุนไพรอื่นๆ เช่น กระเทียม⁴⁴ เป็นต้น ทำการทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพลาสมาและสารสกัดสมุนไพรเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น หรือ ทำการทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เนื่องจากสมุนไพรหลายชนิดนำมาใช้โดยการรับประทาน เมื่อสมุนไพรเข้าสู่ร่างกายต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือคุณสมบัติก่อนขับออกจากร่างกาย ทำให้สมุนไพรอาจไม่มีฤทธิ์ใดๆ ต่อร่างกาย การศึกษาเพิ่มเติมนี้จะนำไปสู่ความรู้ทางวิชาการใหม่ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในการป้องกันและรักษาโรคในอนาคต โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากความผิดปกติของกระบวนการแข็งตัวของเลือดและกระบวนการห้ามเลือด

จากการศึกษา พบว่าสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดเมื่อกระตุ้นด้วยสาร ADP ในหลอดทดลอง โดยเป็นไปตามขนาดที่ใช้และไม่ได้เกิดจากการพิษของสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยต่อเกล็ดเลือด ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ ที่พบว่าสารสกัดจากขมิ้นสามารถเป็นสารต้านเกล็ดเลือดได้ โดยยับยั้ง arachidonic acid (AA) ซึ่งกระตุ้นกระบวนการทำงานของเกล็ดเลือด⁴⁵ ทั้งนี้ขมิ้นอ้อยจัดอยู่ในพืชวงศ์ขิงเช่นเดียวกัน และสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าสาร curcumin ซึ่ง

เป็นสารที่พบได้ในขมิ้นชันสามารถยับยั้งกระบวนการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดโดยยับยั้ง thromboxane และยับยั้ง calcium เข้าสู่เกล็ดเลือด⁷ และสาร ar-turmerone ที่สกัดได้จากขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วย collagen และ arachidonic acid (AA) ได้⁴⁶ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าสารใดในขมิ้นอ้อยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด เนื่องจากเป็นสารสกัดหยาบ ประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น สารกลุ่ม curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin) Terpenoids, ar-turmerone, curcumenone, curcumenol^{47,48} อีกทั้งรายงานนี้ยังไม่ทราบถึงกลไกของสารสกัดหยาบจากขมิ้นอ้อยในการยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ดังนั้นจึงควรมีการแยกสารใน crude ethanolic extract ให้ได้เป็นสารประกอบบริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทำหน้าที่ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด และศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองต่อไป เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาสารประกอบบริสุทธิ์จากขมิ้นอ้อยเป็นยาต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือดได้ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณคุณ หน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อเครื่อง A Chrono-Log aggregometer และ รศ. ดร. เบญจวรรณ ปิตาสวัสดิ์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสมุนไพร การศึกษาวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

1. Williams W, Beutler E, Erslev A, Lichman M, editors. Hematology. 4th Edition. New York: McGraw-Hill Publishing Company; 1991.
2. Marder VJ, Aird WC, Bennett JS, Schulman S, White GC, editors. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 6th Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins; 2012
3. Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, editors. Haemostasis and thrombosis. 3rd Edition. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.
4. Bick RL. Disorders of thrombosis and hemostasis: clinical and laboratory practice. In: Bick RL, editors. ASCP Press, Chicago; 1992:239 [chapter 12]
5. Collins B, Hollidge C. Anti-thrombotic drug market. Nat Rev Drug Discov 2003; 2(1): 11–2.
6. Raju NC, Eikelboom JW. The aspirin controversy in primary prevention. Curr Opin Cardiol 2012; 27(5): 499-507.
7. Shah BH, Nawaz Z, Pertani SA, Roomi A, Mahmood H, Saeed SA, et al. Inhibitory effect of curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and arachidonic acid mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca²⁺ signaling. Biochem Pharmacol 1999; 58(7): 1167–72.
8. Srivastava KC, Bordia A, Verma SK. Curcumin, a major component of food spice turmeric (*Curcuma longa*) inhibits aggregation and alters eicosanoid metabolism in human blood platelets. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1995; 52(4): 223–7.
9. Shih CY, Chou TC. The antiplatelet activity of magnolol is mediated by PPAR-beta/gamma. Biochem Pharmacol 2012; 84(6): 793–803.
10. Shin DW, Kim SN, Lee SM, Lee W, Song MJ, Park SM, et al. (-)-Catechin promotes adipocyte differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells through PPAR gamma transactivation. Biochem Pharmacol 2009; 77(1): 125–33.
11. Son DJ, Cho MR, Jin YR, Kim SY, Park YH, Lee SH, et al. Antiplatelet effect of green tea catechins: a possible mechanism through arachidonic acid pathway. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2004 Jul; 71(1): 25-31.
12. Hollman PC, van Trijp JM, Mengelers MJ, de Vries JH, Katan MB. Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. Cancer Lett. 1997; 114(1–2): 139-40.
13. Fang XK, Gao J, Zhu DN. Kaempferol and quercetin isolated from *Euonymus alatus* improve glucose uptake of 3T3-L1 cells without adipogenesis activity. Life Sci 2008; 82(11–12): 615–22.
14. Oh WJ, Endale M, Park SC, Cho JY, Rhee MH. Dual Roles of Quercetin in Platelets: Phosphoinositide-3-Kinase and MAP Kinases Inhibition, and cAMP-Dependent Vasodilator Stimulated Phosphoprotein Stimulation. Evid Based Complement Alternat Med. 2012; 2012: 485262. doi: 10.1155/2012/485262. Epub 2012 Dec 17.
15. Ibrahim D, Hong LS, Kuppan N. Antimicrobial activity of crude methanolic extract from *Phyllanthus niruri*. Nat Prod Commun. 2013; 8(4): 493-6.
16. Freitas AM, Schor N, Boim MA. The effect of *Phyllanthus niruri* on urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and other factors associated with renal stone formation. BJU Int. 2002; 89(9): 829-34.
17. Manjrekar AP, Jisha V, Bag PP, Adhikary B, Pai MM, Hegde A, et al. Effect of *Phyllanthus niruri* Linn. treatment on liver, kidney and testes in CCl₄ induced hepatotoxic rats. Indian J Exp Biol. 2008; 46(7): 514-20.

18. Matic IZ, Juranic Z, Savikin K, Zdunic G, Nadvinski N, Godevac D. Chamomile and Marigold Tea: Chemical Characterization and Evaluation of Anticancer Activity. *Phytother Res.* 2013; 27(6): 852-8.
19. Lokman FE, Gu HF, Wan Mohamud WN, Yusoff MM, Chia KL, Ostenson CG. Antidiabetic Effect of Oral Borapetol B Compound, Isolated from the Plant *Tinospora crispa*, by Stimulating Insulin Release. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 727602. doi: 10.1155/2013/727602. Epub 2013 Nov 10.
20. Yusoff M, Hamid H, Houghton P. Anticholinesterase Inhibitory Activity of Quaternary Alkaloids from *Tinospora crispa*. *Molecules.* 2014; 19(1): 1201-11.
21. Rungruang T, Boonmars T. In vivo antiparasitic activity of the Thai traditional medicine plant, *Tinospora crispa* against *Plasmodium yoelii*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2009; 40(5): 898-900.
22. Kumar SN, Aravind SR, Sreelekha TT, Jacob J, Kumar BS. Asarones from *Acorus calamus* in Combination with Azoles and Amphotericin B: A Novel Synergistic Combination to Compete Against Human Pathogenic *Candida* Species In Vitro. *Appl Bioc Biotechnol.* 2015; 175(8): 3683-95.
23. Ponrasu T, Madhukumar KN, Ganeshkumar M, Iyappan K, Sangeethapriya V, Gayathri VS, et al. Efficacy of *Acorus calamus* on collagen maturation on full thickness cutaneous wounds in rats. *Pharmacog Mag.* 2014; 10(Suppl 2): S299-305.
24. Shi GB, Wang B, Wu Q, Wang TC, Wang CL, Sun XH, et al. Evaluation of the wound-healing activity and anti-inflammatory activity of aqueous extracts from *Acorus calamus* L. *Pak J Pharm Sci.* 2014; 27(1): 91-5.
25. Kim D-Y, Lee S-H, Kim W-J, Jiang J, Kim M-K, Shin Y-K, et al. Inhibitory effects of *Acorus calamus* extracts on mast cell-dependent anaphylactic reactions using mast cell and mouse model. *J Ethnopharmacol.* 2012; 141(1): 526-9.
26. Lai P, Liu Y. *Angelica sinensis* polysaccharides inhibit endothelial progenitor cell senescence through the reduction of oxidative stress and activation of the Akt/hTERT pathway. *Pharm Biol.* 2015; 53(12): 1842-9. 1-8.
27. Champakaew D, Junkum A, Chaithong U, Jitpakdi A, Riyong D, Sanghong R, et al. *Angelica sinensis* (Umbelliferae) with proven repellent properties against *Aedes aegypti*, the primary dengue fever vector in Thailand. *Parasitol Res.* 2015; 114(6): 2187-98.
28. Jing Q, Wu GT, Du LD, Liu WZ, Li YD, Ren Y. Therapeutic effects of ethanol extracts of *Angelica sinensis* and *Astragalus mongholicus* in diabetic gastroparesis rats. *Zhong Yao Cai.* 2014; 37(8): 1415-20.
29. Bunel V, Antoine M-H, Nortier J, Duez P, Stévigny C. Nephroprotective effects of ferulic acid, Z-ligustilide and E-ligustilide isolated from *Angelica sinensis* against cisplatin toxicity in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2015; 29(3): 458-67.
30. Makchuchit S, Itharat A, Tewtrakul S. Antioxidant and Nitric Oxide Inhibition Activities of Thai Medicinal Plants. *J Med Assoc Thai.* 2010; 93. Suppl 7: S227-35.
31. Gao XF, Li QL, Li HL, Zhang HY, Su JY, Wang B, et al. Extracts from *Curcuma zedoaria* Inhibit Proliferation of Human Breast Cancer Cell MDA-MB-231 In Vitro. *Evid based Complement Alternat Med.* 2014; 2014: 730678. doi: 10.1155/2014/730678. Epub 2014 May 5
32. Lobo R, Prabhu KS, Shirwaikar A, Shirwaikar A. *Curcuma zedoaria* Rosc. (white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *J Pharm Pharmacol.* 2009; 61(1): 13-21.
33. Wilson B, Abraham G, Manju VS, Mathew M, Vimala B, Sundaresan S, et al. Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers. *J Ethnopharmacol.* 2005; 99(1): 147-51.
34. Koonrungsesomboon N, Na-Bangchang K, Karbwang J. Therapeutic potential and pharmacological activities of *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7(6): 421-8.

35. Wang XM, Yang B, Ren CG, Wang HW, Wang JY, Dai CC. Involvement of abscisic acid and salicylic acid in signal cascade regulating bacterial endophyte-induced volatile oil biosynthesis in plantlets of *Atractylodes lancea*. *Physiol Plant*. 2015; 153(1): 30-42.
36. Kimura Y, Sumiyoshi M. Effects of an *Atractylodes lancea* rhizome extract and a volatile component β -eudesmol on gastrointestinal motility in mice. *J Ethnopharmacol*. 2012; 141(1): 530-6.
37. Muthuswamy R, Senthamarai R. Anatomical investigation of flower of *Butea monosperma* Lam. *Anc Sci Life*. 2014; 34(2): 73-9.
38. Krolukiewicz-Renimel I, Michel T, Destandau E, Reddy M, Andre P, Elfakir C, et al. Protective effect of a *Butea monosperma* (Lam.) Taub. flowers extract against skin inflammation: antioxidant, anti-inflammatory and matrix metalloproteinases inhibitory activities. *J Ethnopharmacol*. 2013; 148(2): 537-43.
39. Song X, Wang J, Wu F, Li X, Teng M, Gong W. cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. *Plant Mol Biol*. 2005; 57(1): 13-20.
40. Abid M, Hrishikeshavan HJ, Asad M. Pharmacological evaluation of *Pachyrrhizus erosus* (L) seeds for central nervous system depressant activity. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2006; 50(2): 143-51.
41. Singh N, Singh V, Singh RK, Pant AB, Pal US, Malkunje LR, et al. Osteogenic potential of *Cissus quadrangularis* assessed with osteopontin expression. *Natl J Maxillofac Surg*. 2013; 4(1): 52-6.
42. Nie TW, Shukkoor MS, Nair RS, Amiruddin FK, Ramasamy S. Involvement of opioidergic and serotonergic systems in the analgesic activity of *Cissus quadrangularis* L. stem extract in mice. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2015; 26(1): 35-41.
43. Kang JW, Min BS, Lee JH. Anti-platelet activity of erythro-(7S,8R)-7-acetoxy-3,4,3',5'-tetramethoxy-8-O-4'-neolignan from *Myristica fragrans*. *Phytother Res*. 2013; 27(11): 1694-9.
44. Samuels N. Herbal remedies and anticoagulant therapy. *Thromb haemost*. 2005; 93(1): 3-7.
45. Nurtjahja-Tjendraputra E, Ammit AJ, Roufogalis BD, Tran VH, Duke CC. Effective anti-platelet and COX-1 enzyme inhibitors from pungent constituents of ginger. *Thromb Res*. 2003; 111(4-5): 259-65.
46. Lee SH. Antiplatelet property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived α -turmerone. *Bioresour Technol*. 2006; 97(12): 1372-6.
47. Paramapojn S, Gritsanapan W. Free radical scavenging activity determination and quantitative analysis of curcuminoids in *Curcuma zedoaria* rhizome extracts by HPLC method. *Current science*. 2009; 97(7): 1069-73.
48. Azam G, Noman S, Al-Amin M. Phytochemical Screening and Antipyretic Effect of *Curcuma zedoaria* Rosc. (Zingiberaceae) Rhizome. *British Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 4(5): 569-75.