

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงต่อหลอดเลือดเอออร์ตาที่แยกจากหนูขาวที่
มีภาวะความดันโลหิตสูงและหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติ

**Effects of crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn.
on isolated aorta derived from hypertensive and
normotensive rats**

ผู้ดำเนินการวิจัย

ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข

ผศ.ดร.เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์

4 พ.ย. 2552
26 12 19

AQ 0060840
๕๔๒๖๘๘

เริ่มบริการ

20 พ.ย. 2552

โครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2548

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2548

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ: ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงต่อหลอดเลือดเอออร์ตาที่แยกจากหนู
ขาวที่มีภาวะความดันโลหิตสูงและหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติ

Effects of crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. on isolated
aorta derived from hypertensive and normotensive rats

ผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ นางสาวจันทวรรณ แสงแซ

วุฒิการศึกษา Ph.D (Biological and Medical Science), University of Paris 13, France

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โทรศัพท์ 038-745900-3166

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ นางเพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์

วุฒิการศึกษา Ph.D (Physiology), University of Melbourne, Australia

ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โทรศัพท์ 038-745900-3166

ชื่อโครงการ ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงต่อหลอดเลือดเอออร์ตาที่แยกจากหนูขาวที่มีความดันโลหิตสูงและหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติ

Effects of crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. on isolated aorta derived from hypertensive and normotensive rats

ชื่อผู้วิจัย ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข

ผศ.ดร.เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์

หน่วยงาน ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

ตามการแพทย์ทางตะวันออกได้ใช้ใบบัวหลวง *Nelumbo nucifera* Gertn. (*N. nucifera*) เพื่อเป็นยาบำรุงสุขภาพ ลดความดันโลหิต แต่ยังคงขาดหลักฐานการตรวจสอบกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลอดเลือด วัตถุประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ขยายหลอดเลือดและกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดใบบัวหลวง *N. nucifera* (NN) ต่อหลอดเลือดเอออร์ตาที่แยกจากหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติและหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง โดยการตีบหลอดเลือดที่ไตข้างซ้าย วิธีการทดลอง นำหลอดเลือดจากหนูทั้งสองกลุ่มมาแขวนไว้ในหลอดเลือดแก้วเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดหดตัวด้วย phenylephrine (α_1 -adrenergic receptor agonist) ขนาด sub-maximal dose จากนั้นให้สารสกัดใบบัวหลวงแบบ cumulative dose (10-100 $\mu\text{g/ml}$) ผลการทดลองพบว่า NN สามารถทำให้หลอดเลือดคลายตัวแบบ dose-dependent ทั้งสองกลุ่ม โดยทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ $85.39 \pm 4.5\%$ และ $83.8 \pm 5.8\%$ ในกลุ่มความดันโลหิตปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูงตามลำดับ นอกจากนี้พบว่า L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor, 100 μM) สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ NN โดยทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ $28.46 \pm 7.25\%$ และ $51.52 \pm 23.29\%$ ในกลุ่มความดันโลหิตปกติและกลุ่มความดันโลหิตสูงตามลำดับ แสดงว่าฤทธิ์ในการทำให้หลอดเลือดคลายตัวของ NN ส่วนหนึ่งเกิดผ่านทาง nitric oxide (NO) โดยประสิทธิภาพของ L-NAME ในกลุ่มความดันโลหิตปกติมากกว่ากลุ่มความดันโลหิตสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าน่าจะมีการเสื่อมของ endothelium ในภาวะความดันโลหิตสูง เมื่อให้ NN ร่วมกับ propranolol (β -adrenergic receptor antagonist, 50 μM) หรือ atropine (muscarinic receptor antagonist, 1 μM) พบว่าไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์คลายหลอดเลือดของ NN ได้ในทั้งสองกลุ่ม ในกลุ่มความดันโลหิตปกติหลอดเลือดที่ปราศจาก endothelium ตอบสนองต่อ NN ได้น้อยกว่าหลอดเลือดที่มี endothelium ($45.33 \pm 11.53\%$ vs $16.45 \pm 3.24\%$, $P < 0.05$) ผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า NN มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ซึ่งน่าจะเป็นกลไกในการออกฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของ NN นั้นมีกลไกเป็นทั้งแบบ endothelium-dependent และ endothelium-independent โดยแบบ endothelium-dependent นั้นส่วนหนึ่งเกิดผ่านทาง NO

ชื่อโครงการ	ผลของสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงต่อหลอดเลือดเอออร์ตาที่แยกจากหนูขาวที่มีภาวะความดันโลหิตสูงและหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติ Effects of crude leaf extract of <i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. on isolated aorta derived from hypertensive and normotensive rats
ชื่อผู้วิจัย	ผศ.ดร.จันทวรรณ แสงแข ผศ.ดร.เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์
หน่วยงาน	ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

The leaf of *Nelumbo nucifera* Gertn. (*N. nucifera*), an oriental herbal medicine, has been shown to improve health well-being and posses antihypertensive effects. Its vascular effect has not yet been studied. The purpose of this study is to investigate the potential vasorelaxant activity and mechanisms of leaf extract of *N. nucifera* (NN) in isolated aortic rings from normotensive and hypertensive rats induced by constriction of left renal artery. Thoracic aortic rings isolated from both groups of rats were placed in organ baths and constricted with a sub-maximal dose of phenylephrine (α_1 -adrenergic receptor agonist). Then, the relaxant responses to cumulative concentration of NN (10-100 $\mu\text{g/ml}$) were examined. NN-induced concentration-dependent relaxation was observed in aortic rings of normotensive and hypertensive rats in a similar degree ($85.39 \pm 4.5\%$ and $83.8 \pm 5.8\%$ respectively). In the presence of L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor, 100 μM), the vasorelaxant effects of NN in normotensive and hypertensive aorta were significantly attenuated to $28.46 \pm 7.25\%$ and to $51.52 \pm 23.29\%$ respectively, suggesting that the relaxation is partially mediated via nitric oxide (NO). The inhibition effect of L-NAME was significantly greater in normotensive rings than in hypertensive ones ($P < 0.05$), thereby indicating an endothelium impairment in hypertensive state. Both propranolol (β -adrenergic receptor antagonist, 50 μM), and atropine (muscarinic receptor antagonist, 1 μM) showed no significant effect on NN-induced relaxation in both groups. In comparison to the intact endothelium ones, the denuded endothelium rings from normotensive rats showed significantly smaller vasorelaxant responses to NN ($16.45 \pm 3.24\%$ vs $45.33 \pm 11.53\%$, $P < 0.05$). In conclusion, these results show that NN can produce vasorelaxation, which may account for its antihypertensive action. The effects of NN are both endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms, and the former may be mediated through NO.

สารบัญ

บทที่ 1	1
บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
สมมุติฐานการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2	4
การทบทวนวรรณกรรม	4
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง	4
สรรพคุณของบัวหลวง.....	4
สารประกอบในใบบัวหลวง	5
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพบบัวหลวง	5
แนวคิดของงานวิจัย.....	7
บทที่ 3	8
วิธีดำเนินงานวิจัย	8
การสกัดสารจากใบบัวหลวง	8
วิธีการทดลอง	8
การเตรียมสารเคมีและ buffer	8
สัตว์ทดลองและการเหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง	9
การวัดความดันโลหิตที่หางหนู	9
การแยกหลอดเลือดเอออร์ตา	10
รายละเอียดการทดลอง.....	11
การวิเคราะห์ข้อมูล	12

บทที่ 4	13
----------------------	-----------

ผลการทดลอง	13
-------------------------	-----------

ตอนที่ 1 การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นความดันโลหิตสูง.....	13
ตอนที่ 3 กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง	16
3.1 ผลของยาด้าน nitric oxide synthase ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบบัวหลวง	16
3.2 ผลของยาด้าน beta adrenergic receptors ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบบัวหลวง.....	18
3.3 ผลของยาด้าน muscarinic receptors ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบบัวหลวง	20
3.4 ประเมินฤทธิ์คลายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงแบบ endothelium-independent.....	22

บทที่ 5	24
----------------------	-----------

อภิปรายผลการทดลอง	24
--------------------------------	-----------

การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นความดันโลหิตสูง.....	24
ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวง.....	24
ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงผ่านทาง NO	25
BETA ADRENERGIC RECEPTOR BLOCKER ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง	26
ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงไม่ผ่านทาง MUSCARINIC RECEPTORS	27
ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงแบบ ENDOTHELIUM-INDEPENDENT	28
ศักยภาพของสารสกัดใบบัวหลวงในการลดความดันโลหิต	28
สรุปผลการทดลอง	29
ข้อเสนอแนะ	29

เอกสารอ้างอิง	30
----------------------------	-----------

สารบัญญภาพ

รูปภาพ 1 แสดงระบบบันทึกแรงดึงของหลอดเลือด.....	11
รูปภาพ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของ SBP ภายหลังจากตัดคิบบหลอดเลือดที่ไตข้างซ้าย 7-8 สัปดาห์ ผลการทดลอง แสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M., * $P < 0.05$ VS NORMOTENSIVE.....	13
รูปภาพ 3 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา ผลการทดลองแสดงโดย ค่า MEAN \pm S.E.M.	15
รูปภาพ 4 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME กับ กลุ่มที่ได้รับ L-NAME ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ VS กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME	17
รูปภาพ 5 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้รับ PROPRANOLOL กับ กลุ่มที่ได้รับ PROPRANOLOL ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M.....	19
รูปภาพ 6 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้รับ ATROPINE กับ กลุ่มที่ได้รับ ATROPINE ผลการทดลองแสดง โดยค่า MEAN \pm S.E.M.	21
รูปภาพ 7 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่าง หลอดเลือดที่มี EC และหลอดเลือดที่ปราศจาก EC ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. * $P < 0.05$ VS หลอดเลือดที่มี EC	23

สารบัญญัตราสาร

ตาราง 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง ผลการทดลองแสดง โดยค่า MEAN \pm S.E.M.	15
ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบ ระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME กับ กลุ่มที่ได้รับ L-NAME ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ VS กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME.....	17
ตาราง 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบ ระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้รับ PROPRANOLOL กับ กลุ่มที่ได้รับ PROPRANOLOL ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M.	19
ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบ ระหว่าง กลุ่มที่ไม่ได้รับ ATROPINE กับ กลุ่มที่ได้รับ ATROPINE ผลการทดลองแสดงโดยค่า MEAN \pm S.E.M.....	21
ตาราง 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบ ระหว่าง หลอดเลือดที่มี EC และหลอดเลือดที่ปราศจาก EC ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ ผลการทดลองแสดง โดยค่า MEAN \pm S.E.M. * $P < 0.05$ VS หลอดเลือดที่มี EC	23

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคความดันโลหิตสูงเป็นโรคเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายได้ และได้ชื่อว่าเป็นฆาตกรเงียบ เนื่องจากโรคนี้ทำลายอวัยวะหลายแห่งโดยไม่มีความเจ็บปวด ผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่มีอาการเตือนจึงละเลยไม่สนใจรักษาทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนและอาการร้ายแรงต่อมาภายหลัง เช่นการเสื่อมสภาพของหลอดเลือดแดงโดยเฉพาะหลอดเลือดที่สมอง ตา หัวใจ ไต เป็นอัมพาตช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ หัวใจล้มเหลว ภาวะไตวายเรื้อรัง (Germann & Standfield, 2002) สำหรับสถิติในประเทศไทยพบว่าจำนวนผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงจากสถานบริการสาธารณสุข กระทรวงสาธารณสุขมีจำนวน 142,873 คน ในปี 2543 และมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็น 265,636 คน ในปี 2547 นอกจากนี้โรคความดันโลหิตสูงยังเป็นสาเหตุการตาย 1 ใน 4 อันดับนำในประชากรไทยในปี 2547 (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2549)

การรักษาโรคความดันโลหิตสูงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนพฤติกรรมเช่น ควบคุมน้ำหนัก ออกกำลังกาย งดเหล้า บุหรี่ และรับประทานยาอย่างสม่ำเสมอ การควบคุมความดันโลหิตให้อยู่ในระดับปกติได้ตลอด 24 ชั่วโมง จะสามารถช่วยลดอัตราการเกิดอัมพาต (stroke) ได้ถึง 35-40% ลดอัตราการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดไปเลี้ยง (myocardial infraction) ได้ถึง 20-25% และลดอัตราการเกิดโรคหัวใจล้มเหลว (heart failure) ได้ >50% (Neal, 2000) ด้วยเหตุนี้ทำให้ผู้ป่วยเหล่านี้ต้องเสียเงินค่ายาเป็นจำนวนมหาศาล การนำเข้ายาที่จำเป็นจากต่างประเทศทำให้ไทยต้องเสียเปรียบดุลการค้ามาตลอด กล่าวคือในปี 2546 ไทยนำเข้ายาแผนปัจจุบันสำหรับโรคหัวใจและหลอดเลือด 2959 ล้านบาท และเพิ่มขึ้นเป็น 3229 ล้านบาทในปี 2547 (กองควบคุมยา, 2549) การพัฒนาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศขึ้นมาทดแทนยาแผนปัจจุบัน จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาการขาดดุลจากการนำเข้ายาจากต่างประเทศ

จากการที่ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตร้อนชื้น เป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายของพันธุ์พืชสมุนไพร และยังรู้จักใช้ประโยชน์ของสมุนไพรในการรักษาโรคภัยไข้เจ็บ ซึ่งความรู้และประสบการณ์ในการรักษาโรค ได้รับการบอกเล่าสืบทอดจากคนรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง จนเกิดเป็นยาสมุนไพรใช้รักษาโรคต่าง ๆ ซึ่งถือว่าเป็นภูมิปัญญาไทย ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์เริ่มสนใจที่จะศึกษาภูมิปัญญาไทย และในปี 2547 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา มีนโยบายที่จะพัฒนามาตรฐานการผลิตยาจากสมุนไพร โดยมุ่งเน้นการผลิตยาให้ถูกสุขลักษณะ เพื่อความปลอดภัยของ

ผู้บริโภคในการใช้ยาที่ผลิตจากสมุนไพร (กองควบคุมยา, 2547) และสนับสนุนให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ดำเนินการเพื่อเพิ่มศักยภาพตนเอง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาองค์ความรู้เกี่ยวกับสมุนไพร โดยมุ่งเน้นการวิจัยและพัฒนา ให้มีมาตรฐานและความปลอดภัยในระดับสากล และต้องมีการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเพื่อการพัฒนาเป็นยาแผนปัจจุบัน ส่วนในระดับผู้บริโภค ส่วนใหญ่ต้องการใช้ผลิตภัณฑ์ในการดูแลสุขภาพจากธรรมชาติ แต่คำนิยมและความเชื่อถือต่อการใช้สินค้าที่ผลิตในประเทศยังไม่สู้ดีนัก ส่วนใหญ่ต้องการความชัดเจนทั้งคุณภาพและประสิทธิภาพ ซึ่งต้องได้คำตอบจากนักวิจัย (พร้อมจิต ศรีลัมพ์, 2548)

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นไม้น้ำที่พบในทุกภาคของประเทศไทย ตามตำราการแพทย์แผนไทยพบว่าบัวหลวงเป็นพืชที่ให้ประโยชน์ได้เกือบทุกส่วนในการรักษาความผิดปกติต่างๆ ได้เช่น เป็นยาบำรุงกำลัง แก้อ่อนใน กระหายน้ำ ลดไข้ แก้อักเสบเป็นต้น (วิสุดา สุวิทยาวัฒน์, 2540) ในทางการแพทย์แผนไทยได้มีหลักฐานเกี่ยวกับสรรพคุณของบัวหลวงในการลดความดันโลหิต (วันดี กฤษณะพันธ์, 2541) ทำให้เส้นเลือดขยายตัว (สุนทรีย์ สิงหนุตตรา, 2535) และขยายหลอดเลือดในหัวใจ (นันทวัน บุญญะประภัสสร และ อรนุช ไชคชัยเจริญพร, 2541) และยังมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์โดย Trongtorsk และคณะ (2004) เป็นการศึกษาฤทธิ์ลดความดันโลหิตแบบระยะยาว และแบบเฉียบพลันของสารสกัดใบบัวหลวง ในหนูขาวที่มีความดันโลหิตสูงและหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติ พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความดันโลหิตได้ทั้งแบบระยะยาวและแบบเฉียบพลัน แต่การศึกษานี้ไม่สามารถบอกถึงกลไกการออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง โดยเฉพาะการออกฤทธิ์โดยตรงที่หลอดเลือด เนื่องจากรัศมีของหลอดเลือดมีผลโดยตรงต่อความดันโลหิต ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษา ผลของสารสกัดจากใบบัวหลวงต่อการทำงานของหลอดเลือดแดงเอออร์ตา ที่แยกออกมาจากหนูขาวที่มีภาวะความดันโลหิตสูงและหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติตามลำดับ เพื่อเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรบัวหลวงมาใช้แทนยาแผนปัจจุบันต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการทำงานของหลอดเลือดเอออร์ตา ที่แยกจากหนูขาวในภาวะปกติ และจากหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูง
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดใบบัวหลวงต่อ receptor ต่างๆ ในหลอดเลือดเอออร์ตา ที่แยกจากหนูขาวในภาวะปกติ และจากหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูง

สมมุติฐานการวิจัย

1. สารสกัดจากใบบัวหลวงน่าจะมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดเออร์ตาคลายตัว
2. สารสกัดจากใบบัวหลวงน่าจะออกฤทธิ์ผ่าน nitric oxide หรือ beta-adrenergic receptors หรือ muscarinic receptors

ขอบเขตของการวิจัย

ใบบัวหลวงถูกนำมาสกัดด้วย 5% ethanol ทำสารสกัดให้เป็นผง แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ต่อการทำงานหลอดเลือดเออร์ตาที่แยกออกมาจากหนูขาว โดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่มคือ หนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะความดันโลหิตสูงด้วยวิธีตีบ renal artery และหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติตามลำดับ จากนั้นแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกทดสอบฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวง ส่วนที่สองศึกษากลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดใบบัวหลวงที่หลอดเลือดเออร์ตา โดยใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ หรือปิดกั้น receptors ชนิดต่างๆ เพื่อดูว่าสารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ผ่านทาง nitric oxide หรือ beta-adrenergic receptors หรือ muscarinic receptors

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการศึกษานี้ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางเภสัชวิทยา และกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดใบบัวหลวงที่หลอดเลือดเออร์ตา ซึ่งเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่สำคัญจากนักวิจัยผู้บริโภค เป็นการสนับสนุนการพัฒนาสมุนไพรไทยให้ได้มาตรฐานสากล และเป็นพื้นฐานในการทำวิจัยขั้นสูงเพื่อพัฒนาสมุนไพรแทนยาแผนปัจจุบันที่ใช้ลดความดันโลหิตสูง

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง

บัวหลวงเป็นพืชน้ำที่พบทั่วไปในประเทศไทยและประเทศในทวีปเอเชีย (Nguyen, 2001) มีชื่อพฤกษศาสตร์ว่า *Nelumbo nucifera* Gaertn. ในวงศ์ Nymphaeaceae (วันดี กฤษณะพันธ์, 2541) บัวหลวงมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่นเช่น ไข่คว่ำ บัว สัตตบุษย์ อุบล และสัตตบงกช เป็นต้น (นันทวัน บุญยประภัศร และคณะ, 2541) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวงนั้นเป็นไม้้ำอายุหลายปี มีเหง้าอยู่ในดินใต้น้ำ ใบเดี่ยวรูปเกือบกลม ขนาดใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30-60 ซม. ขอบใบเรียบและเป็นคลื่น ผิวใบมีนวล ใบอ่อนมีลักษณะม้วนตัว ก้านใบยาวชูขึ้นเหนือน้ำ ก้านใบและก้านดอกแข็งยาวมีตุ่มเล็ก ๆ ทั่วไป เมื่อหักจะมีน้ำยางขาวและเป็นสายใย ดอกเดี่ยวแทงออกจากเหง้า มีสีชมพูอมม่วงและสีขาว ทั้งใบและดอกจะมีก้านชูยาวขึ้นพ้นผิวน้ำ กลีบดอกมีโคนกลีบกว้าง ส่วนปลายเรียวแหลมโค้งงอเข้าด้านใน กลีบดอกจำนวนมากเรียงซ้อนกันหลายชั้น เกสรตัวเมียมีรูปร่างคล้ายกรวยหงายปลายตัด ภายในเป็นช่องของรังไข่เกสรตัวผู้สี่เหลี่ยมและอับเกษรตัวผู้ติดอยู่รอบส่วนฐานของรังไข่ ผลรูปกลมรีจำนวนมากอยู่ในฝักรูปกรวย (วิสุตา สุวิทย์วัฒน์, 2540)

สรรพคุณของบัวหลวง

บัวหลวงสามารถปลูกเป็นพืชเศรษฐกิจ เพราะเกือบทุกส่วนของบัวหลวงใช้ประโยชน์ได้ เช่น เป็นไม้ประดับ เป็นอาหาร ใช้ทางศาสนา ใช้ในชีวิตประจำวัน และเป็นสมุนไพรรักษาโรค มีรายงานทางการแพทย์แผนไทยและภูมิปัญญาไทยยืนยันว่า ทุกส่วนของบัวหลวงมีสรรพคุณใช้รักษาและป้องกันการเกิดโรคได้ ได้แก่ เหง้าบัวใช้เป็นยาบำรุงกำลัง แก้ร้อนใน แก้ท้องร่วง แก้ประจำเดือนผิดปกติ และรักษาโรคจิตเสียดวงทวาร (รัชณี จวีร์ราช , 2532) รากบัวใช้เป็นยาบำรุงกำลัง แก้ร้อนใน ลดไข้ แก้ไอและกระหายน้ำ โดยนำรากบัวมาต้มกับน้ำให้เดือด ต้มครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3-4 ครั้ง (วันดี กฤษณะพันธ์, 2541) เมล็ดบัวใช้เป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงครรภ์ แก้กษัยและลำไส้อักเสบ (รัชณี จวีร์ราช , 2532) ดอกบัวแก้ช้ำใน ใช้ห้ามเลือด และแก้อาการผื่นคันโดยใช้กลีบดอกพอกบริเวณที่คัน (วิจิต วัฒนวิบูลย์, 2529) เกสรตัวผู้เข้าเครื่องยาหอมบำรุงหัวใจและใช้เป็นยาชูกำลัง ในตำรับยาไทยที่ประกอบด้วยเกสรทั้ง 5 ได้แก่ เกสรมะลิ พิกุล สารภี บุนนาค และบัวหลวง ใช้เป็นตำหรับเฉพาะสำหรับบำรุงหัวใจและบำรุงกำลัง (กัญจนา ติวีเศษ และคณะ, 2542; วิสุตา สุวิทย์วัฒน์, 2540; รัชณี จวีร์ราช , 2532) ดีบัวแห้งชงกับน้ำร้อนรับประทาน ช่วยขยายหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจ นอกจากนี้ยังใช้แก้ร้อนในและกระหายน้ำ (ชยันตร์ พิเชียรสุนทร และคณะ, 2541) ใบบัวมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต โดยนำใบบัวสด

หรือแห้งมาต้มกับน้ำให้เดือดแล้วดื่มครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3-4 ครั้ง ติดต่อกันอย่างน้อย 20 วัน จะช่วยให้ความดันโลหิตลดลงได้ (วันดี กฤษณะพันธ์, 2541) จากข้อมูลเบื้องต้นจะเห็นว่าบัวหลวงเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยา และมีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์ต่อไป

สารประกอบในใบบัวหลวง

สารประกอบที่พบในทุกส่วนของบัวหลวงส่วนมากอยู่ในกลุ่ม alkaloids ซึ่งได้รับการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และมีสูตรโครงสร้างแตกต่างกันมาก (Li et al., 1989; Li et al., 1990; Wang et al., 1993) นอกจากนี้ปริมาณ alkaloids ในพืชยังขึ้นกับสภาวะต่างๆดังนี้ อายุของพืช อุณหภูมิ แสงสว่าง ฤดูกาล ความชื้นในอากาศ ลม ปริมาณน้ำในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุกรรมของพืช (genetic factors) จะเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ alkaloids ในพืช (วันดี กฤษณะพันธ์, 2544) ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากบัวหลวงได้มีการศึกษากันมากในประเทศอินเดีย จีน ไต้หวัน และญี่ปุ่น (Mukherjee et al., 1997; Li et al., 1989; Li et al., 1990; Shoji et al., 1998) ดังนั้นบัวหลวงที่ปลูกในแต่ละประเทศอาจจะมีสารสำคัญที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากบัวหลวงที่ปลูกในประเทศไทยเพื่อพิสูจน์ความเป็นเอกลักษณ์ของสมุนไพรไทย

จากการศึกษาหาสารประกอบในใบบัวหลวง พบว่าสารประกอบส่วนใหญ่เป็น isoquinoline alkaloid ชนิดต่างๆ alkaloids กลุ่มแรกที่สามารถแยกได้จากใบบัวหลวงคือ nuciferine, remerine และ normuciferine โดยจากใบแห้ง 33 kg สามารถแยกได้ 0.2 g nuciferine, 8 g remerine และ 11 g normuciferine (Tang & Eisenbrand, 1992) ต่อมาสามารถแยก alkaloids อื่นๆมากมายจากใบบัวหลวงได้แก่ arnepavine, anonaine, dehydroanonaine, pronuciferine, N-nornuciferine, dehydronuciferine, liriodenine, dehydroremerine, methylcoclaurine, N-methylcoclaurine, asimilobine, N-methyl asimilobine, lirinidine, liensinine, isoqueritrine และ roemerine (วิสุตา สุวิทยาวัฒน์, 2540; Tang & Eisenbrand, 1992) นอกจากนี้ในใบบัวยังประกอบด้วยสาร steroid คือ ginnol และ β -sitosterol ในใบบัวยังมีน้ำมันระเหยเป็นสาร alkanes (C_{12} - C_{27}) และสาร phytol ด้วย (วิสุตา สุวิทยาวัฒน์, 2540)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรบัวหลวง

ได้มีการนำส่วนประกอบต่างๆของต้นบัวหลวงมาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ทำให้เกิดหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันสรรพคุณของบัวหลวง ดังนี้ การศึกษาสรรพคุณลดน้ำตาลในเลือด มีรายงานการวิจัยในประเทศอินเดีย โดยนำส่วนดอกและรากมาทดสอบในสัตว์ทดลอง พบว่าผงดอกบัวหลวงที่สกัดด้วยน้ำและสกัดด้วยแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในกระต่ายปกติ และกระต่ายที่เหนียวทำให้เกิดโรคเบาหวานจากการฉีด adrenaline hydrochloride 0.5 mg/kg และเมื่อ

ศึกษาผลกระทบที่พบว่าความทนต่อน้ำตาลกลูโคสดีขึ้น เนื่องจากไปเร่งการใช้กลูโคสในเนื้อเยื่อ และกระตุ้นการทำงานของอินซูลิน (Huralikuppi et al., 1991a; Huralikuppi et al., 1991b) การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดส่วนเหง้าบัวหลวงที่สกัดด้วย methanol ขนาด 300, 600 mg/kg ทางปากแก่หนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานด้วย streptozotocin พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองได้ 53% และ 55% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน chlorpropamide (Mukherjee et al., 1995a) ส่วนเหง้าบัวหลวงที่สกัดด้วย ethanol มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวปกติ หนูขาวที่ได้รับการบ่อนกลูโคส และหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานด้วย streptozotocin ทำให้ความทนต่อกลูโคสของสัตว์ทดลองเพิ่มขึ้น (Mukherjee et al., 1997)

การศึกษาโดยกลุ่มนักวิจัยในประเทศอินเดียพบว่า สารสกัดด้วย methanol จากเหง้าบัวหลวง นั้นมีสรรพคุณต่างๆดังนี้ ลดอาการท้องเสียในหนูที่เหนี่ยวนำให้ท้องเสียด้วยน้ำมันระหุ่ง โดยลดการเคลื่อนไหวของลำไส้ และยับยั้งการหลั่ง prostaglandins E (Mukherjee, 1995b) มีฤทธิ์ขับปัสสาวะในหนูขาว โดยเพิ่มการขับ Na^+ , Cl^- และ K^+ ออกในปัสสาวะ (Mukherjee, 1996a) และมีผลเพิ่มฤทธิ์ของ pentobarbitone ในการเพิ่มระยะเวลาการนอนหลับ (Mukherjee, 1996b) ส่วนสารสกัดด้วย ethanol จากก้านบัวมีฤทธิ์ลดไข้ในหนูที่มีอุณหภูมิปกติ และหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นไข้ด้วยยีสต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ลดไข้ได้เหมือนกับยา paracetamol (Sinha et al., 2000)

รายงานการวิจัยในประเทศจีนได้ศึกษาสาร neferine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม alkaloids ที่สกัดได้จากตีบัว โดยทำการศึกษาใน papillary muscle ของหนูตะเภา พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเต้นผิดจังหวะของหัวใจ (anti-arrhythmia) และลดความดันโลหิต โดยสารดังกล่าวมีผลเพิ่มระยะเวลาของศักยทำงาน (action potential duration) ลดขนาดของศักยทำงาน (action potential amplitude) และยับยั้ง Na^+ , K^+ , Ca^{2+} current ที่กล้ามเนื้อหัวใจ และให้ผลเหมือนกับ quinidine (Li et al., 1989; Li et al., 1990) นอกจากนี้ สาร neferine ยังมีผลยับยั้ง platelet aggregation ที่ถูกเหนี่ยวนำจาก collagen, arachidonic acid (AA) และ platelet-activating factor (PAF) ในกระต่าย โดยน่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลระหว่าง thromboxane A_2 /prostaglandin I_2 และ cAMP/cGMP (Yu & Hu, 1997) ส่วนสาร liensinine ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม alkaloids ที่สกัดได้จากตีบัวเช่นกัน ได้ทำการศึกษาในหัวใจห้องบนที่แยกออกมาจากร่างกายของกระต่าย พบว่ามีฤทธิ์ต้านการเต้นผิดจังหวะของหัวใจ โดยน่าจะมีผลยับยั้ง Ca^{2+} ion channel และ Na^+ ion channel และผลของสารดังกล่าวต่อการไหลเวียนโลหิต (haemodynamics) นั้นเหมือนกับยา verapamil ซึ่งออกฤทธิ์ยับยั้ง Ca^{2+} ion channel (Wang et al., 1992) ต่อมานักวิจัยกลุ่มนี้ได้ใช้เทคนิค two-microelectrodes voltage clamp พบว่าสาร liensinine ทำให้ศักยทำงานในกล้ามเนื้อหัวใจช้าลงจากผลของการยับยั้ง Ca^{2+} ion channel (Wang et al., 1993)

ส่วนของใบบัวหลวงนั้นมีการนำมาสกัดด้วย methanol และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ Caco2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H₂O₂ พบว่ามีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจึงลดการตายของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wu et al., 2003) สาร nuciferine จากใบบัว (ไม่ได้ระบุพันธุ์บัว) มีฤทธิ์ลดอาการเกร็ง ทำให้หลอดเลือดขยายโดยตรงและลดความดันโลหิตในสัตว์ทดลอง (Sinoherbking, 2004) สาร asimilobine และ lirinidine เป็นกลุ่ม alkaloids ที่สกัดได้จากใบบัวหลวง โดยนักวิจัยจากประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดเออร์ตาที่แยกออกจากร่างกายของกระต่าย และสารทั้งสองนี้มีกลไกการออกฤทธิ์เป็น serotonin receptor antagonist (Shoji et al., 1998) จากการศึกษาของ สมฤดี อรรถชาติ (2547) ได้ศึกษาสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงด้วย 5% ethanol ต่อการทำงานของหัวใจหนูขาวที่แยกออกจากร่างกาย โดยใช้ isolated heart perfusion เป็นรูปแบบการทดลอง พบว่าสารสกัดหยาบจากใบบัวหลวงมีฤทธิ์เพิ่มแรงบีบตัว และอัตราการเต้นของหัวใจ โดยออกฤทธิ์ผ่าน β 1-adrenergic receptors และสารสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์ลดความดันโลหิตได้ทั้งแบบระยะยาวและระยะเฉียบพลัน โดยได้เสนอแนะว่าสารสกัดใบบัวน่าจะมียกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน β -adrenergic receptor ที่หลอดเลือดแล้วทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Trongtorsak et al., 2004)

แนวคิดของงานวิจัย

จากการศึกษาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น พบว่าสารสกัดจากใบบัวหลวงออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตในสัตว์ทดลอง แต่ไม่สามารถอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอนในการลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวได้ โดยเฉพาะการออกฤทธิ์โดยตรงที่หลอดเลือด จากหลักฐานต่างๆทำให้คณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า สารประกอบในใบบัวน่าจะออกฤทธิ์ลดความดันโลหิตที่หลอดเลือด โดยทำให้หลอดเลือดขยายตัว ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบกลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้นของสารสกัดใบบัวในหลอดเลือดที่แยกจากหนูขาวที่มีความดันโลหิตสูงและหนูขาวที่มีความดันโลหิตปกติ

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การสกัดสารจากใบบัวหลวง

ใบบัวหลวงที่ใช้ในการศึกษานี้ ซื้อมาจากบ่อบัวแห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรีช่วงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2545 ถึง มกราคม พ.ศ. 2546 โดยเก็บจากบ่อบัวในช่วงเช้า 6.00-10.00 น และได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์ว่าเป็นใบบัวหลวงโดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา ต้นวัฒนกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

นำใบบัวหลวงสดมาล้าง แล้วตากให้แห้งประมาณ 3 วัน จากนั้นนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 นิ้ว แล้วนำไปอบด้วยเครื่อง hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเก็บใบบัวหลวงในถุงพลาสติกสะอาด ผูกปากถุงให้แน่น จนกว่าจะนำไปใช้สกัดสาร

การสกัดสารจากใบบัวหลวงเริ่มจาก นำใบบัวหลวงที่อบแห้ง 50 กรัม มาต้มกับ 5% ethanol ปริมาตร 2000 มิลลิลิตร จนกระทั่งเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำสารละลายไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนสารละลายลดเหลือประมาณครึ่งหนึ่ง นำสารสกัดที่ได้เทใส่ขวดปากกว้าง ปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่แช่แข็งนี้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer ซึ่งจะได้สารสกัดเป็นผงสีน้ำตาล จากนั้นนำสารสกัดมาเก็บไว้ในตู้ดูดความชื้น จนกว่าจะใช้งาน การสกัดโดยวิธีนี้ได้สารสกัดใบบัวหลวงประมาณ 19.87% ของน้ำหนักใบบัวแห้ง (เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์ และ ญัฐิณี ใจจิตร, 2546)

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารเคมีและ buffer

Krebs solution เป็นสารละลายเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประกอบด้วย NaCl 118 mM, KCl 4.6 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM และ glucose 11 mM ปรับ pH = 7.4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สารสกัดใบบัวหลวง เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดลอง โดยละลายใน Krebs' s solution แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง สารเคมีต่างๆ เช่น propanolol, atropine, phenylephrine (PE), N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-Name) ซื้อมาจากบริษัท Sigma chemical (St. Louis, USA) สารเคมีเหล่านี้ละลายในน้ำกลั่น และทำเป็น aliquot เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อทำการทดลอง

นำไปเจือจางด้วย Krebs solution ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง แสดงเป็นความเข้มข้น
ขั้นสุดท้ายใน organ bath

สัตว์ทดลองและการเหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง

การทดลองนี้ใช้หนูขาว (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague Dawley อายุ 7-8 สัปดาห์ จำนวน 20
ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา โดยพักสัตว์ทดลองไว้ที่ห้อง
เลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ อุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้น้ำและอาหาร
อย่างอิสระ หลังจากที่สัตว์ทดลองปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จึงนำมาทำการ
ทดลอง แบ่งสัตว์ทดลองเป็น 2 กลุ่มๆละ 10 ตัว คือกลุ่มความดันโลหิตสูง และกลุ่มความดันโลหิตปกติ

ทำการวัด systolic blood pressure ของหนูทั้ง 2 กลุ่มทางหางหนู 2 วันติดต่อกัน จากนั้น
เหนี่ยวนำหนูในกลุ่มความดันโลหิตสูงให้มีภาวะความดันโลหิตสูงด้วยวิธีผ่าตัด ผูกหลอดเลือด renal
artery ข้างซ้าย การผ่าตัดเริ่มด้วยการทำให้หนูสลบโดยการฉีด pentobarbital sodium (Nembutal®)
ขนาด 45 mg/kg เข้าทางช่องท้อง เมื่อหนูสลบจึงทำการผ่าตัดเปิดไตข้างซ้าย และเนื้อเยื่อเพื่อแยก
renal artery นำลวดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 mm วางทาบตามแนวของหลอดเลือด ใช้ไหมผ่าตัด
(size 2/0; Aesculap AG & CO.) ผูกหลอดเลือดแล้วดึงลวดออก จากนั้นเย็บปิดแผล ทำความสะอาด
ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ betadine เมื่อฟื้นจากยาสลบหนูทดลองได้รับอาหารและน้ำอย่างอิสระ หลังผ่าตัด
7-8 สัปดาห์ ทำการวัด systolic blood pressure ที่หางหนู 2 วันติดต่อกัน (เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์ และ
ณัฐริณี ใจจิตร, 2546)

การวัดความดันโลหิตที่หางหนู

เทคนิคนี้เป็นการวัด systolic blood pressure (SBP) ที่หางหนูแบบ non invasive ในภาวะ
conscious เริ่มจากให้ความร้อนแก่หนูด้วยคอมไฟขนาด 100 วัตต์ เป็นเวลา 3-5 นาที เพื่อให้หลอดเลือด
ที่หางหนูขยาย ซึ่งจะทำให้ตรวจ pulse wave ได้ง่าย จากนั้นใช้ผ้าห่อตัวหนูเพื่อให้หนูอยู่ในท่า
สบาย ผ่อนคลาย ไม่ตื่นเต้น นำหางหนูสอดเข้าไปใน tail cuff plethysmograph ให้อยู่ในตำแหน่ง
proximal ต่อหางหนู โดยเครื่องดังกล่าวต่อเข้ากับ IITC Model 229 Pulse Amplifier/Pump
photoelectric tail cuff system (IITC Life Sciences; Woodland Hills, CA) ซึ่งทำหน้าที่ inflate
และ deflate ลมเข้าสู่ tail cuff แบบอัตโนมัติ และเครื่องดังกล่าวยังต่อเข้ากับระบบบันทึก Biopac
MP100 Acquisition system (BIOPAC Inc.) ซึ่งจะบันทึกคลื่นชีพจร (pulse waves) และ SBP โดย
แสดงผลการวัดความดันโลหิตผ่านทางหน้าจอคอมพิวเตอร์ (เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์ และ ณัฐริณี ใจ
จิตร, 2546)

หลังจากที่หลอดเลือดที่หางหนูตีบ จะไม่สามารถบันทึกคลื่นชีพจรได้ ต่อมาเมื่อเครื่องปล่อย
ลมออกจาก cuff ทำให้เริ่มมีการไหลของเลือด ค่า SBP เป็นค่าที่บันทึกได้จากการเริ่มปรากฏ pulse

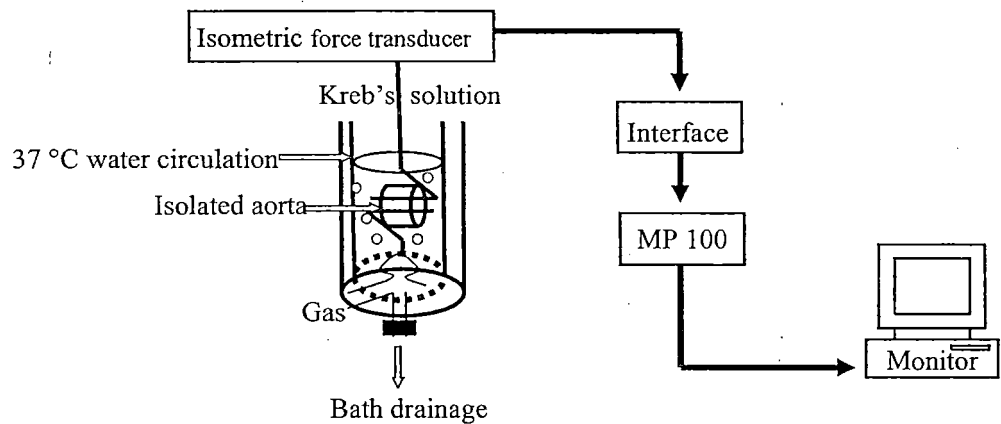
wave ลำดับแรก หลังจากทีหลอดเลือดที่ทางหนูตีบ หนูแต่ละตัวจะได้รับการวัดความดันโลหิต 3-4 ครั้ง และได้รับการตรวจสอบความดันโลหิต 2 วันติดต่อกัน นำค่าความดันโลหิตทั้ง 2 วันหาค่าเฉลี่ย

การแยกหลอดเลือดเอออร์ตา

สลบหนูด้วย pentobarbital sodium ขนาด 60 mg/kg ฉีดเข้าทางช่องท้อง และทดสอบระดับการหมดสติด้วยการตรวจไม่พบ withdrawal reflex จึงผ่าตัดเปิดช่องอกเพื่อแยกหลอดเลือด thoracic aorta ออกจากร่างกาย จากนั้นนำมาแช่ใน oxygenated-Krebs solution และแยกเนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ออกจากหลอดเลือดด้วยความระมัดระวังไม่ให้ endothelial cell (EC) และ vascular smooth muscle cell (VSMC) ถูกทำลาย นำหลอดเลือดมาตัดตามขวางเป็นวงแหวน จำนวน 4 ส่วน แต่ละส่วนยาว 3 มิลลิเมตร จากนั้นสอดลวด stainless 2 เส้นเข้าที่ปลายหลอดเลือดแต่ละด้าน ลวดเส้นหนึ่งยึดกับแท่งแก้วที่ organ bath ลวดอีกเส้นหนึ่งต่อกับ isometric force transducer (รูปภาพ 1) ซึ่งจะส่งสัญญาณเข้า Biopac MP 100 Acquisitoin System เพื่อบันทึกแรงดึงตัวของหลอดเลือดจำนวน 4 ช่อง ขณะทำการทดลองหลอดเลือดจะอยู่ใน organ bath ที่มี Krebs solution pH 7.4 ส่วน organ bath ชั้นนอกเป็นน้ำที่ไหลเวียนโดยมี thermocirculator ป้อนน้ำให้ไหลเวียน เพื่อควบคุมอุณหภูมิของ Krebs solution ให้คงที่ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับ 95%O₂ และ 5%CO₂ ตลอดการทดลอง

ทำการปรับค่ามาตรฐานของเครื่อง (calibration) เพื่อวัดแรงดึงในช่วง 0-5 กรัม จากนั้นให้แรงดึงในขณะพัก (resting tension) กับหลอดเลือดทุกเส้น ขนาด 1 กรัม แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที โดยเปลี่ยน Krebs solution ทุกๆ 15 นาที ก่อนการทดลองจริง เพื่อกำจัดของเสียที่เกิดจากกระบวนการ เมตาโบลิซึม

มีบางการทดลองที่ทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงที่ VSMC(endothelium-independent relaxation) ดังนั้นจึงต้องมีการขูด EC ออกด้วยปลาย forcep หลังจากนั้นทำการทดสอบความสมบูรณ์ในการเอา EC ออกด้วย acetylcholine เฉพาะหลอดเลือดที่ไม่ตอบสนองต่อ acetylcholine เท่านั้น จึงนำมาใช้ในการทดลองนี้



รูปภาพ 1 แสดงระบบบันทึกแรงดึงของหลอดเลือด

รายละเอียดการทดลอง

ทำการทดสอบการทำงานของหลอดเลือดทั้ง 4 organ baths ด้วยการให้ PE แบบ cumulative dose ในขนาด 5×10^{-9} M, 1×10^{-8} M, 5×10^{-8} M, 1×10^{-7} M, 5×10^{-7} M และ 1×10^{-6} M รอจนกระทั่งการหดตัวของหลอดเลือดไม่เพิ่มขึ้นอีก แรงดึงของการหดสูงสุดที่เกิดจาก PE นี้คิดเป็น 100% แล้วคำนวณหาขนาดความเข้มข้นของ PE ที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% จากนั้นล้างด้วย Kerb's solution และรอให้แรงดึงของหลอดเลือดเข้าสู่ baseline

ส่วนที่ 1 ศึกษาผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการทำงานของหลอดเลือดเออร์ตา

เมื่อแรงดึงของหลอดเลือดอยู่ที่ baseline จึงกระตุ้นให้หลอดเลือดหดตัวด้วย PE ในขนาดที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% รอจนกระทั่งแรงดึงของหลอดเลือดมากที่สุด (maximum tension) จึงให้สารสกัดใบบัวหลวงแบบ cumulative dose ขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ และบันทึกแรงดึงของหลอดเลือดอย่างต่อเนื่อง เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาดต่างๆ

ส่วนที่ 2 ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง

1. การออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงผ่าน receptor ต่างๆ และ NO

เมื่อแรงดึงของหลอดเลือดอยู่ที่ baseline จึงเริ่มทำการทดลองโดยบ่มหลอดเลือดด้วย blocker ต่างๆ 3 ชนิด ได้แก่ L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) 100 μM , propranolol (beta-adrenergic receptor antagonist) 50 μM และ atropine (muscarinic receptor antagonist) 1 μM ในแต่ละ organ bath เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดหดตัวด้วย PE ในขนาดที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% รอจนกระทั่งแรงดึงของหลอดเลือดมากที่สุด (maximum tension) จึงให้สารสกัดใบบัวหลวงแบบ cumulative dose ขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ และบันทึกแรงดึงของหลอดเลือดอย่างต่อเนื่อง เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาดต่างๆ

2. การออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงผ่าน vascular smooth muscle cells

ทำการทดลองเช่นเดียวกับในส่วนที่ 2 ข้อ 1 แต่ใช้หลอดเลือดที่ปราศจาก EC ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองแสดงในรูป mean \pm S.E.M.

ความดันโลหิตแสดงข้อมูลเป็นเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้น (% increase) เมื่อเทียบกับก่อนผ่าตัดตีบหลอดเลือดที่ไตข้างซ้าย การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของ SBP ระหว่างก่อนผ่าตัด กับ หลังผ่าตัด โดยใช้สถิติวิเคราะห์แบบ Student's paired *t*-test เมื่อค่า $P < 0.05$ แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

แรงดึงของหลอดเลือดหลังให้สารสกัดใบบัวหลวง แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์การคลายตัว (% relaxation) เมื่อเทียบกับแรงดึงสูงสุดที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย PE (% of maximum contraction to PE) ดังสมการ

$$\% \text{ relaxation} = 100 - (\% \text{ of maximum contraction to PE})$$

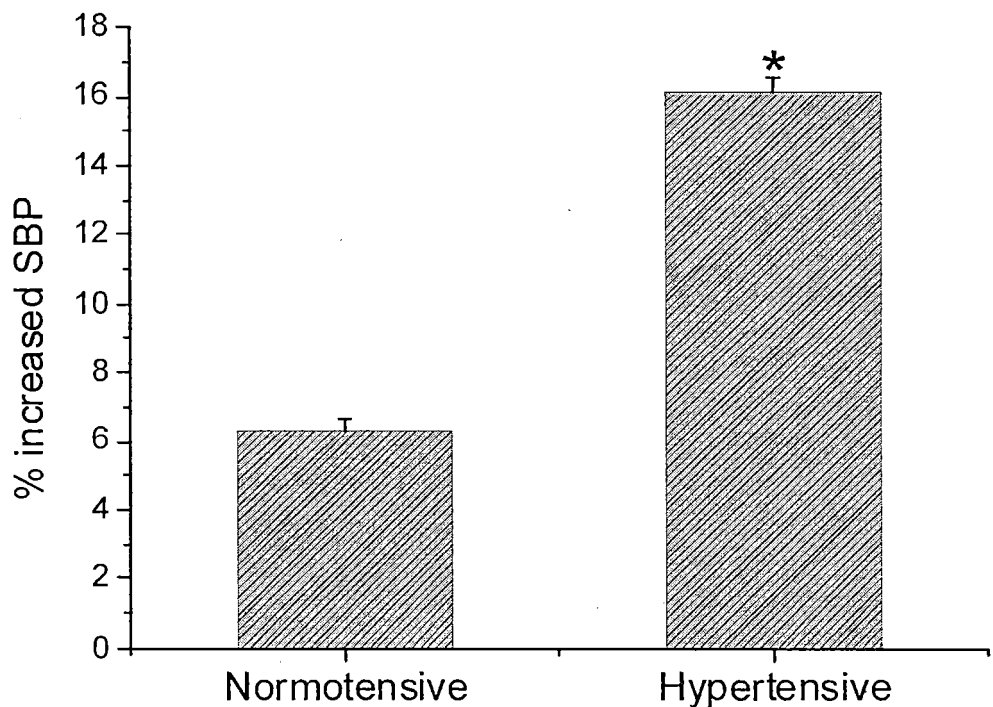
การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยการคลายตัวของหลอดเลือด ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบบัวหลวงร่วมกับ blocker และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดใบบัวหลวงอย่างเดียว ด้วยสถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) เมื่อค่า $P < 0.05$ แสดงว่ามีค่าเฉลี่ยอย่างน้อยหนึ่งคู่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงทำการทดสอบค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยสถิติ unpaired student's *t*-test โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS for windows

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นความดันโลหิตสูง

การศึกษานี้ได้เหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะความดันโลหิตสูง โดยการผ่าตัดตีบหลอดเลือดแดงที่ไตข้างซ้าย และวัดความดันโลหิตที่หางหนูโดยใช้ tail cuff plethysmograph ซึ่งจะวัดก่อนทำการผ่าตัดเปรียบเทียบกับหลังผ่าตัดในสัปดาห์ที่ 7-8 ผลการทดลองพบว่า ก่อนผ่าตัดมีค่าเฉลี่ย SBP เท่ากับ 155 ± 10 mmHg หลังผ่าตัดมีค่าเฉลี่ย SBP เพิ่มขึ้นเป็น 180 ± 8 mmHg เมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้น (% increased) ได้เท่ากับ 16% ส่วนในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติมีค่าเฉลี่ย SBP เท่ากับ 158 ± 11 mmHg และ 168 ± 6 ในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ 8 ตามลำดับ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นได้เท่ากับ 6% เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของ SBP ระหว่างหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติกับหนูกลุ่มความดันโลหิตสูง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปภาพ 2) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการผ่าตัดตีบหลอดเลือดแดงที่ไตข้างซ้าย สามารถเหนี่ยวนำให้หนูเป็นความดันโลหิตสูงได้

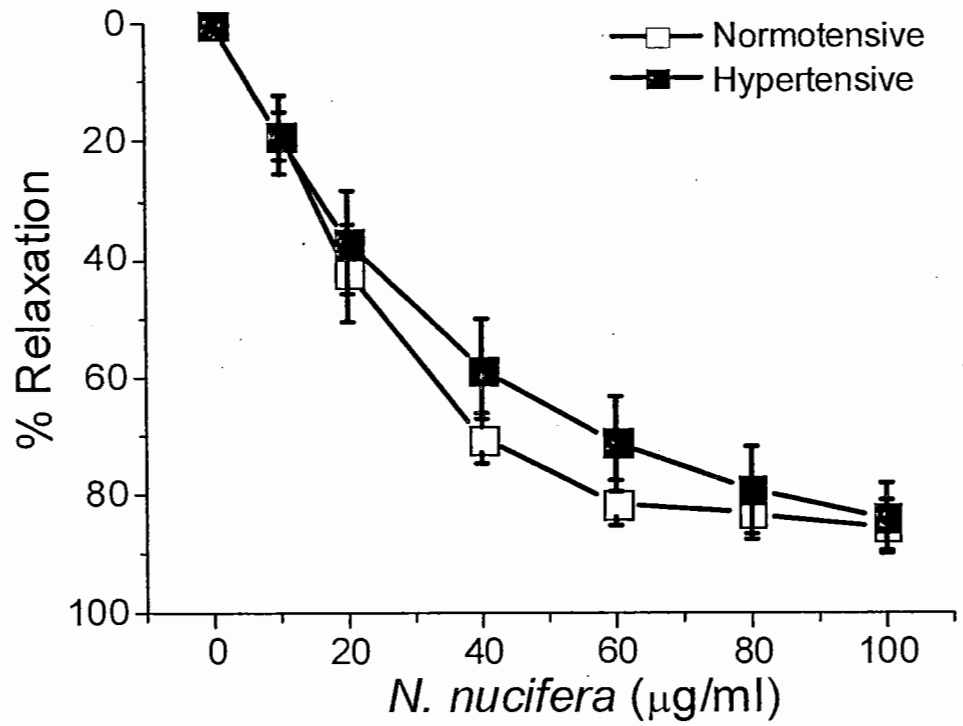


รูปภาพ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของ SBP ภายหลังจากผ่าตัดตีบหลอดเลือดที่ไตข้างซ้าย 7-8 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean \pm S.E.M., * $P < 0.05$ vs normotensive

ตอนที่ 2 ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการทำงานของหลอดเลือดเออร์ตา

การศึกษานี้ได้เหนี่ยวนำให้หลอดเลือดมีแรงตึง (active tone) ด้วย PE ขนาดที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% เมื่อการหดตัวของหลอดเลือดอยู่ในสภาวะคงที่ (steady state) จึงให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ แบบ cumulative dose ผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัว โดยเปอร์เซ็นต์การคลายตัวเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงที่เพิ่มขึ้น (dose dependent; $P < 0.05$) ความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงขนาด 100 $\mu\text{g/ml}$ มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวสูงสุดถึง $85.39 \pm 4.52\%$ และ $83.80 \pm 5.82\%$ ในหลอดเลือดที่แยกจากหนูที่มีความดันโลหิตปกติ และ ที่มีความดันโลหิตสูงตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (รูปภาพ 3) (ตาราง 1) แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีประสิทธิภาพสูงในการทำให้หลอดเลือดคลายตัว ทั้งในหลอดเลือดปกติและในหลอดเลือดที่มีความดันโลหิตสูง

หลังจากทดสอบสารสกัดใบบัวหลวงต่อการทำงานของหลอดเลือดเออร์ตาแล้ว จึงล้างหลอดเลือดด้วย Krebs solution เพื่อให้แรงตึงของหลอดเลือดกลับสู่ baseline จากนั้นทดสอบการทำงานของหลอดเลือดโดยให้ PE พบว่าหลอดเลือดยังสามารถหดตัวได้เหมือนเดิม (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แสดงว่า EC และ VSMC ที่หลอดเลือดยังทำหน้าที่ได้ดี และสารสกัดใบบัวหลวงไม่ได้ทำลาย EC และ VSMC ที่หลอดเลือด



รูปภาพ 3 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean \pm S.E.M.

<i>N. nucifera</i> (µg/ml)	% Relaxation	
	Normotensive	Hypertensive
10	19.15 \pm 4.09	18.90 \pm 6.64
20	42.24 \pm 8.19	37.12 \pm 8.57
40	70.54 \pm 4.42	58.76 \pm 8.55
60	81.40 \pm 3.89	71.36 \pm 8.06
80	83.22 \pm 4.38	79.20 \pm 7.51
100	85.39 \pm 4.52	83.80 \pm 5.82

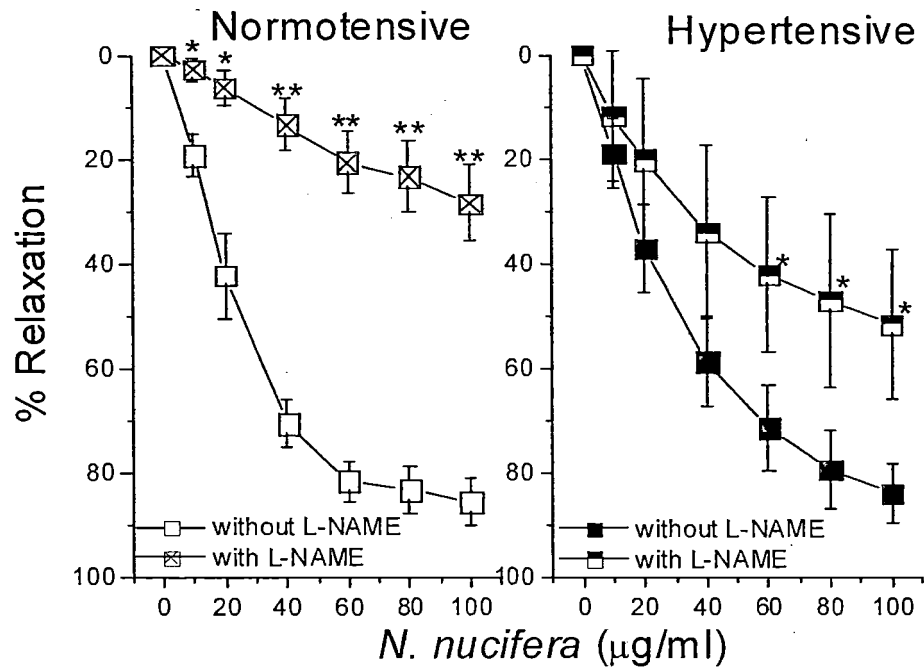
ตาราง 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean \pm S.E.M.

ตอนที่ 3 กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง

3.1 ผลของยาต้าน nitric oxide synthase ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนียวนำด้วยสารสกัดใบบัวหลวง

การศึกษา กลไกการออกฤทธิ์เบื้องต้น ของสารสกัดใบบัวหลวงที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวนั้น ทำการทดลองโดยปมหลอดเลือดด้วย L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) ขนาด 100 μ M เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเหนียวนำให้หลอดเลือดมีแรงตึง (active tone) ด้วย PE ขนาดที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% เมื่อการหดตัวของหลอดเลือดอยู่ในสภาวะคงที่ (steady state) จึงให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 μ g/ml แบบ cumulative dose ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มที่มีความดันโลหิตปกติ เมื่อให้ L-NAME ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในทุกขนาดความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวง เมื่อเทียบกับหลอดเลือดที่ไม่ได้รับ L-NAME โดยความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงขนาด 100 μ g/ml มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ $28.46 \pm 7.25\%$ และ $85.39 \pm 4.52\%$ เมื่อมีและไม่มี L-NAME ตามลำดับ (รูปภาพ 4) (ตาราง 2)

ส่วนในกลุ่มที่มีความดันโลหิตสูง เมื่อให้ L-NAME ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขนาดความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงตั้งแต่ 60-100 μ g/ml เมื่อเทียบกับหลอดเลือดที่ไม่ได้รับ L-NAME โดยความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงขนาด 100 μ g/ml มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ $51.52 \pm 14.29\%$ และ $83.80 \pm 5.82\%$ เมื่อมีและไม่มี L-NAME ตามลำดับ (รูปภาพ 4) (ตาราง 2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า L-NAME สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงในการคลายตัวของหลอดเลือดได้ โดยประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงในหลอดเลือดที่แยกจากหนูที่มีความดันโลหิตสูง



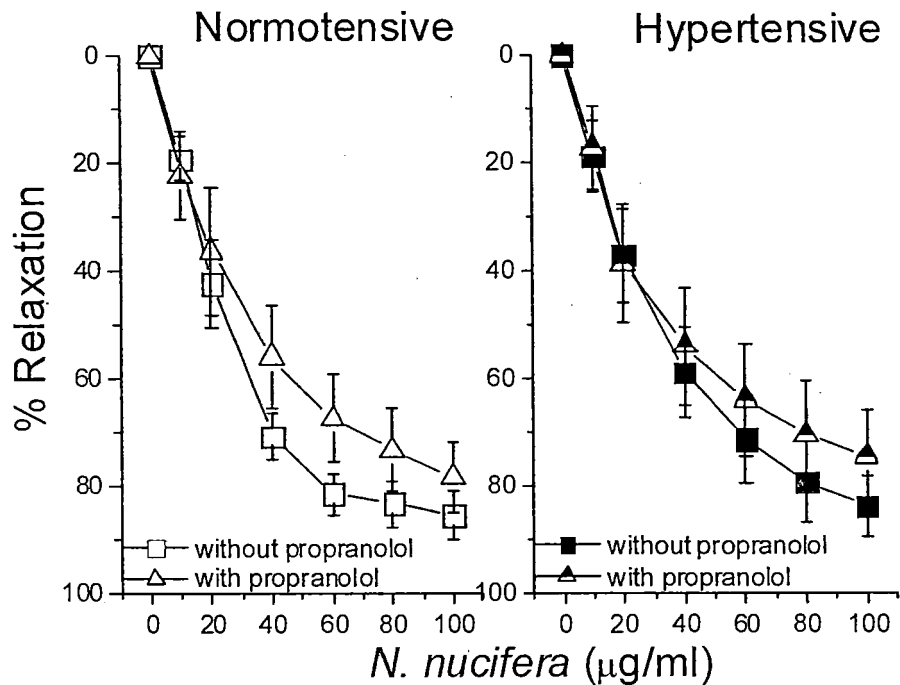
รูปภาพ 4 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ได้รับ L-NAME กับ กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean ± S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME

<i>N. nucifera</i> (µg/ml)	% Relaxation			
	Normotensive		Hypertensive	
	Without L-NAME	With L-NAME	Without L-NAME	With L-NAME
10	19.15 ± 4.09	2.69 ± 2.26*	18.90 ± 6.64	11.72 ± 12.56
20	42.24 ± 8.19	6.27 ± 3.57 *	37.12 ± 8.57	20.21 ± 15.58
40	70.54 ± 4.42	13.37 ± 4.99**	58.76 ± 8.55	34.07 ± 16.58
60	81.40 ± 3.89	20.65 ± 6.02**	71.36 ± 8.06	42.19 ± 14.72*
80	83.22 ± 4.38	23.26 ± 6.67**	79.20 ± 7.51	47.06 ± 16.59*
100	85.39 ± 4.52	28.46 ± 7.25**	83.80 ± 5.82	51.52 ± 14.29*

ตาราง 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ได้รับ L-NAME กับ กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean ± S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs กลุ่มที่ไม่ได้รับ L-NAME

3.2 ผลของยาต้าน *beta adrenergic receptors* ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนียวนำด้วยสารสกัดใบบัวหลวง

การศึกษานี้ ทำการทดลองโดยป่มหลอดเลือดด้วย propranolol (*beta adrenergic receptor antagonist*) ขนาด 50 μM เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเหนียวนำให้หลอดเลือดมีแรงตึง (*active tone*) ด้วย PE ขนาดที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% เมื่อการหดตัวของหลอดเลือดอยู่ในสภาวะคงที่ (*steady state*) จึงให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ แบบ *cumulative dose* ผลการทดลองพบว่า ทั้งในหลอดเลือดที่แยกจากหนูที่มีความดันโลหิตปกติและที่มีความดันโลหิตสูง เมื่อให้ propranolol ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวง 100 $\mu\text{g/ml}$ มีผลให้หลอดเลือดของหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติคลายตัวได้ $78.43 \pm 6.44\%$ และ $85.39 \pm 4.52\%$ เมื่อมีและไม่มี propranolol ตามลำดับ ซึ่งการคลายตัวนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปภาพ 5) (ตาราง 3) ส่วนหลอดเลือดของหนูกลุ่มความดันโลหิตสูงนั้นคลายตัวได้ $74.57 \pm 8.9\%$ และ $83.8 \pm 5.82\%$ เมื่อมีและไม่มี propranolol ตามลำดับ ซึ่งการคลายตัวนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (รูปภาพ 5) (ตาราง 3) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า propranolol ไม่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงได้ ทั้งในกลุ่มปกติและในกลุ่มที่เป็นความดันโลหิตสูง



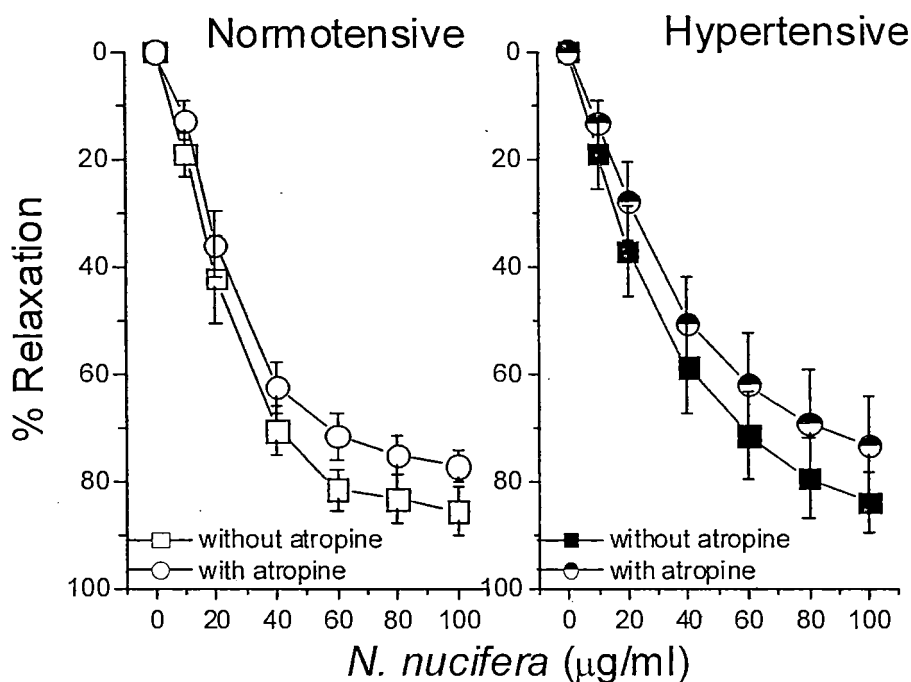
รูปภาพ 5 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ได้รับ propranolol กับ กลุ่มที่ไม่ได้รับ propranolol ผลการทดลองแสดง โดยค่า mean \pm S.E.M.

<i>N. nucifera</i> (µg/ml)	% Relaxation			
	Normotensive		Hypertensive	
	Without propranolol	With propranolol	Without propranolol	With propranolol
10	19.15 \pm 4.09	22.27 \pm 8.00	18.90 \pm 6.64	17.23 \pm 7.58
20	42.24 \pm 8.19	36.25 \pm 11.77	37.12 \pm 8.57	38.58 \pm 10.87
40	70.54 \pm 4.42	55.88 \pm 9.58	58.76 \pm 8.55	53.84 \pm 10.89
60	81.40 \pm 3.89	67.29 \pm 8.23	71.36 \pm 8.06	64.00 \pm 10.27
80	83.22 \pm 4.38	73.16 \pm 7.71	79.20 \pm 7.51	70.44 \pm 9.83
100	85.39 \pm 4.52	78.43 \pm 6.44	83.80 \pm 5.82	74.57 \pm 8.9

ตาราง 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ได้รับ propranolol กับ กลุ่มที่ไม่ได้รับ propranolol ผลการทดลองแสดง โดยค่า mean \pm S.E.M.

3.3 ผลของยาด้าน muscarinic receptors ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนียวนำด้วยสารสกัดใบบัวหลวง

การศึกษานี้ ทำการทดลองโดยบ่มหลอดเลือดด้วย atropine (muscarinic receptor antagonist) ขนาด 1 μ M เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงเหนียวนำให้หลอดเลือดมีแรงตึง (active tone) ด้วย PE ขนาดที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% เมื่อการหดตัวของหลอดเลือดอยู่ในสภาวะคงที่ (steady state) จึงให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 μ g/ml แบบ cumulative dose ผลการทดลองพบว่า ทั้งในหลอดเลือดที่แยกจากหนูที่มีความดันโลหิตปกติและที่มีความดันโลหิตสูง เมื่อให้ atropine ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว ที่ความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวง 100 μ g/ml มีผลให้หลอดเลือดของหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติคลายตัวได้ $77.11 \pm 3.07\%$ และ $85.39 \pm 4.52\%$ เมื่อมีและไม่มี atropine ตามลำดับ ซึ่งการคลายตัวนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปภาพ 6) (ตาราง 4) ส่วนหลอดเลือดของหนูกลุ่มความดันโลหิตสูงนั้นคลายตัวได้ 73.22 ± 8.9 และ $83.8 \pm 5.82\%$ เมื่อมีและไม่มี atropine ตามลำดับ ซึ่งการคลายตัวนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน (รูปภาพ 6) (ตาราง 4) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า atropine ไม่สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงได้ ทั้งในกลุ่มปกติและในกลุ่มที่เป็นความดันโลหิตสูง



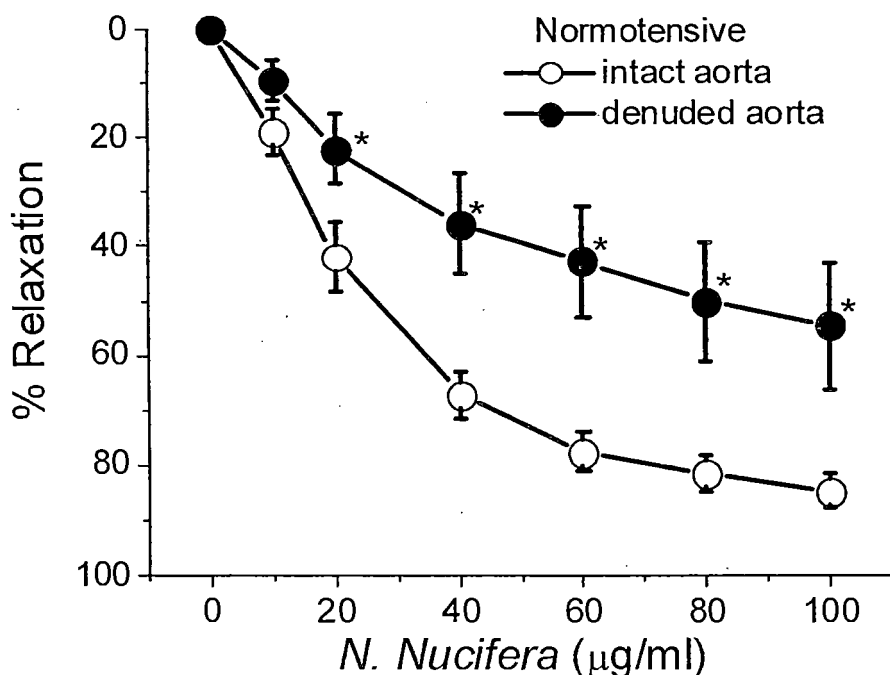
รูปภาพ 6 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ได้รับ atropine กับ กลุ่มที่ไม่ได้รับ atropine ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean \pm S.E.M.

<i>N. nucifera</i> (µg/ml)	% Relaxation			
	Normotensive		Hypertensive	
	Without atropine	With atropine	Without atropine	With atropine
10	19.15 \pm 4.09	12.93 \pm 3.69	18.90 \pm 6.64	13.32 \pm 3.89
20	42.24 \pm 8.19	35.85 \pm 6.12	37.12 \pm 8.57	27.93 \pm 7.30
40	70.54 \pm 4.42	62.48 \pm 4.78	58.76 \pm 8.55	50.52 \pm 8.79
60	81.40 \pm 3.89	71.57 \pm 4.18	71.36 \pm 8.06	62.03 \pm 9.8
80	83.22 \pm 4.38	74.94 \pm 3.62	79.20 \pm 7.51	69.18 \pm 9.89
100	85.39 \pm 4.52	77.11 \pm 3.07	83.80 \pm 5.82	73.22 \pm 8.9

ตาราง 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มที่ได้รับ atropine กับ กลุ่มที่ไม่ได้รับ atropine ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean \pm S.E.M.

3.4 ประเมินฤทธิ์คลายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงแบบ endothelium-independent

การศึกษานี้ ทำการทดลองโดยใช้หลอดเลือดจากหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ และแบ่งหลอดเลือดเป็น 2 กลุ่มคือ หลอดเลือดที่มี EC (intact aorta) และหลอดเลือดที่ปราศจาก EC (denuded aorta) โดยเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดมีแรงตึง (active tone) ด้วย PE ขนาดที่ทำให้หลอดเลือดหดตัวได้ 80% เมื่อการหดตัวของหลอดเลือดอยู่ในสภาวะคงที่ (steady state) จึงให้สารสกัดใบบัวหลวงขนาด 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ แบบ cumulative dose ผลการทดลองพบว่า หลอดเลือดที่ปราศจาก EC ตอบสนองต่อสารสกัดใบบัวหลวงได้น้อยกว่าหลอดเลือดที่มี EC ที่ความเข้มข้นทุกระดับของสารสกัดใบบัวหลวง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงขนาด 100 $\mu\text{g/ml}$ มีผลทำให้หลอดเลือดที่มี EC คลายตัวได้ถึง $84.77 \pm 9.25\%$ แต่หลอดเลือดที่ไม่มี EC คลายตัวได้เพียง $54.66 \pm 30.52\%$ (รูปภาพ 7) (ตาราง 5) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ ทั้งแบบ endothelium-dependent และ endothelium-independent กล่าวคือมีผลกระตุ้น VSMC โดยตรง



รูปภาพ 7 ผลของสารสกัดใบบัวหลวง ต่อ เปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา โดยเปรียบเทียบระหว่างหลอดเลือดที่มี EC และหลอดเลือดที่ปราศจาก EC ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs หลอดเลือดที่มี EC

N. nucifera (µg/ml)	% Relaxation	
	Normotensive	
	Intact aorta	Denuded aorta
10	18.97 \pm 12.84	9.43 \pm 10.62
20	41.94 \pm 19.07	22.09 \pm 17.10
40	67.22 \pm 12.76	35.81 \pm 24.28
60	77.68 \pm 10.79	42.74 \pm 26.75
80	81.44 \pm 9.94	50.12 \pm 28.98
100	84.77 \pm 9.25	54.66 \pm 30.52

ตาราง 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา เมื่อได้รับสารสกัดใบบัวหลวง โดยเปรียบเทียบระหว่าง หลอดเลือดที่มี EC และหลอดเลือดที่ปราศจาก EC ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ ผลการทดลองแสดงโดยค่า mean \pm S.E.M. * $P < 0.05$ vs หลอดเลือดที่มี EC

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ผลการศึกษาค้างนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบบัวหลวงขนาด 10-100 $\mu\text{g/ml}$ ออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดเออร์ตาที่แยกออกจากร่างกายหนูขาวคลายตัวในลักษณะ dose-dependent ทั้งในกลุ่มความดันโลหิตปกติ และ กลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังพบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดนั้นไม่สามารถถูกยับยั้งโดย propranolol (beta-adrenergic receptor antagonist) และ atropine (muscarinic receptor antagonist) แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านทาง muscarinic receptor และ beta-adrenergic receptor ที่หลอดเลือด แต่การคลายตัวของหลอดเลือดโดยสารสกัดใบบัวหลวงนั้นถูกยับยั้งโดย L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะออกฤทธิ์ผ่าน NO นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดใบบัวหลวงทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้น้อยลงเมื่อไม่มี endothelium แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะออกฤทธิ์คลายหลอดเลือดทั้งแบบ endothelium-dependent และ endothelium-independent

การเหนี่ยวนำให้หนูเป็นความดันโลหิตสูง

การศึกษานี้ได้เหนี่ยวนำให้หนูขาวมีภาวะความดันโลหิตสูงโดยใช้วิธีตีบ renal artery ตามวิธีของ Trongtorsak และคณะ (2004) ซึ่งดัดแปลงจาก Goldblatt model (Callera et al., 2000) วิธีนี้มีผลให้ renal blood flow ลดลง และส่งผลไปกระตุ้น rennin-angiotensin-aldosterone system ซึ่ง angiotensin II มีผลกระตุ้นให้หลอดเลือดตีบตัว และเพิ่มการทำลาย NO ส่วน aldosterone ทำให้ปริมาณน้ำในร่างกายเพิ่มขึ้น ผลทั้ง 2 ทางทำให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น เรียกภาวะความดันโลหิตสูงในลักษณะนี้ว่า renovascular hypertension (Dobrian et al., 2001) จากการศึกษาของ Trongtorsak และคณะ (2004) พบว่าการเหนี่ยวนำภาวะความดันโลหิตสูงโดยวิธีนี้ จะทำให้ความดันโลหิตในสัปดาห์ที่ 6-9 สูงและมีการเบี่ยงเบนน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ ดังนั้นวิธีการเหนี่ยวนำให้หนูมีความดันโลหิตสูงที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้ สามารถทำให้หนูมีภาวะความดันโลหิตสูงแบบเรื้อรังจึงเป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและเหมาะสมสำหรับศึกษาภาวะความดันโลหิตสูง

ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวง

จากผลการทดลองได้ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงขนาด 10-100 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้หลอดเลือดเออร์ตาที่แยกออกจากร่างกายหนูขาวคลายตัวในลักษณะ dose-dependent โดยทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ 19 – 85% ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ และ 19 – 84% ในหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง (รูปภาพ 3) (ตาราง 1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดใบบัวหลวงออก

ฤทธิ์โดยตรงที่หลอดเลือดเออร์ตาทำให้หลอดเลือดคลายตัว และประสิทธิภาพการคลายตัวเพิ่มขึ้นตามขนาดความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงที่เพิ่มขึ้น ในทางการแพทย์แผนไทยได้นำใบบัวมาต้มกับน้ำให้เดือดแล้วดื่ม จะช่วยให้ความดันโลหิตลดลงได้ (วันดี กฤษณะพันธ์, 2541) นอกจากนี้มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงทางเภสัชวิทยาพบว่า สารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความดันโลหิตระยะยาว โดยป้อนสารสกัดใบบัวหลวงแก่หนูขาวที่มีภาวะความดันโลหิตสูง ติดต่อกัน 3 สัปดาห์พบว่าสามารถลดความดันโลหิตได้โดยเฉลี่ย 5-11% (Trongtorsak et.al., 2004) ส่วนการศึกษาฤทธิ์เฉียบพลันของสารสกัดใบบัวหลวง โดยฉีดเข้าทาง femoral vein สามารถลดความดันโลหิตได้เช่นกัน (จารุณี ปัญญาจิรวุฒิ, 2547; นวชัย อธิปชาติศิริ, 2548) จากหลักฐานดังกล่าวจึงน่าจะสรุปได้ว่า สารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความดันโลหิตได้ โดยทำให้หลอดเลือดคลายตัว ทำให้ความต้านทานรวมของหลอดเลือดลดลง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ได้ใช้หลอดเลือดที่มีขนาดใหญ่ (diameter > 1mm) จึงควรมีการศึกษาเพิ่มในหลอดเลือดที่มีขนาดเล็ก ซึ่งมีอิทธิพลต่อความต้านทานมากกว่าหลอดเลือดขนาดใหญ่

จากการศึกษาหาสารประกอบในใบบัวหลวง พบว่าสารประกอบส่วนใหญ่เป็น alkaloids ได้แก่ nuciferine, remerine และ nor-nuciferine (Tang & Eisenbrand, 1992) มีรายงานว่าสารสกัดจากใบบัว (ไม่ระบุสายพันธุ์) ทำให้หลอดเลือดขยาย จึงลดความดันโลหิตในสัตว์ทดลองได้ (Sinoherbking, 2004) นอกจากนี้ยังมีสารที่สกัดได้จากใบบัวหลวงเช่น asimilobine และ lirinidine มีฤทธิ์ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดเออร์ตาที่เหนี่ยวนำด้วย serotonin (Shoji et al., 1998) จากการศึกษาสารสกัดอย่างหยาบของดิบัว พบว่ามีฤทธิ์ลดความดันโลหิตในหนูขาวได้ (Jittiporn et al., 2002) สาร alkaloid ที่พบในดิบัวเช่น arnepavine และ liensinine นั้นสามารถพบได้ในส่วนของใบบัวเช่นกัน (วิสุตา สุวิทย์วัฒน์, 2540) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ที่ยับยั้งการหดตัวของหลอดเลือดเออร์ตาที่เหนี่ยวนำด้วย phenylephrine ในการศึกษาครั้งนี้ เกิดจากผลร่วมกันของสารเหล่านี้ในการทำให้หลอดเลือดคลายตัว ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงควรทำการสกัดสารให้บริสุทธิ์ แล้วนำสารแต่ละตัวมาทดสอบฤทธิ์ลดความดันโลหิต และฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือดต่อไป

ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงผ่านทาง NO

การทดลองนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของ L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) ต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหลอดเลือดที่ได้รับสารสกัดใบบัวหลวงอย่างเดียว กับหลอดเลือดที่ได้รับสารสกัดใบบัวหลวงร่วมกับ L-NAME พบว่าในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ หลอดเลือดคลายตัวได้ 85% และ 28% ส่วนในหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูงหลอดเลือดคลายตัวได้ 84% และ 52% ตามลำดับ (รูปภาพ 4) (ตาราง 2) ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงเสนอแนะว่า NO ที่หลังจากสารสกัดใบบัวหลวงเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว โดยสารสกัดใบบัวหลวง

กระตุ้น endothelial cell ให้สร้าง NO จากนั้น NO จะแพร่ไปยัง vascular smooth muscle cell แล้วมีผลกระตุ้นการทำงานของ guanylate cyclase ให้เปลี่ยน GTP เป็น cGMP (second messenger) ซึ่งไปออกฤทธิ์ที่ protein kinase G จึงมีผลลดการเกิด phosphorylation ที่ myosin light chain kinase จึงทำให้หลอดเลือดคลายตัว (Furchgott & Zawadzki, 1980; Furchgott, 2006)

จากผลการทดลองแสดงว่า L-NAME ขนาด 100 μM สามารถยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วยสารสกัดใบบัวหลวงได้ แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งนั้นไม่ถึง 100% ทั้งๆที่ขนาดความเข้มข้นของ L-NAME เป็นขนาดสูง แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงน่าจะออกฤทธิ์ผ่านกลไกอื่น ๆ อีก นอกจาก NO ในปัจจุบันได้มีการเสนอกลไกในการทำให้หลอดเลือดขยายโดย endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) กล่าวคือ endothelial cells จะปล่อย K^+ ออกนอกเซลล์ เป็นผลทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเกิด hyperpolarization และตามด้วยการคลายตัวของหลอดเลือด (Busse et al., 2002) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงอาจมีกลไกการออกฤทธิ์บางส่วนผ่าน EDHF นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่าในสารสกัดใบบัวหลวงนั้นมีความเข้มข้นของ K^+ สูงจึงทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดเกิด hyperpolarization และเกิดการคลายตัวได้

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ และ หนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง เมื่อให้สารสกัดใบบัวหลวงร่วมกับ L-NAME พบว่าหลอดเลือดคลายตัวได้ 28% และ 52% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของ L-NAME ยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดในหนูกลุ่มปกติ ได้มากกว่าหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากพยาธิสภาพของหลอดเลือดในภาวะความดันโลหิตสูงนั้น ส่งผลให้เกิดการเสื่อมหน้าที่ของ endothelial cell ทำให้ประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อสารเคมีบางชนิดลดลงเช่น acetylcholine, bradykinin, substance P เป็นต้น (Luscher et al., 1992) จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า หลอดเลือดของหนูที่มีความดันโลหิตสูงนั้นมีการเสื่อมของ endothelial cells ทำให้ตอบสนองต่อ L-NAME ลดลง

Beta adrenergic receptor blocker ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง

การทดสอบผลของ propranolol (beta adrenergic receptor antagonist) ต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงโดยให้ propranolol ขนาด 50 μM ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง พบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดมีค่าใกล้เคียงกับการให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ และ ในหนูกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เป็นความดันโลหิตสูง (รูปภาพ 5) (ตาราง 3) แสดงว่า propranolol ไม่สามารถยับยั้งการคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำโดยสารสกัดใบบัวหลวงได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาโดย Trongtorsak et.al. (2004) พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ลดความดันโลหิต

ในหนูขาว และฤทธิ์ดังกล่าวถูกยับยั้งโดย atenolol (selective β_1 adrenergic receptor antagonist) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดใบบัวหลวงกระตุ้น lipolysis ในเซลล์ไขมันโดยผ่าน β adrenergic receptors เพราะถูกยับยั้งโดย propranolol (Ono et al., 2006)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ให้ propranolol ในขนาดที่สูงมาก (50 μ M) ซึ่งความเข้มข้นระดับนี้มีรายงานยืนยันว่าสามารถทำให้ aorta และ mesentery artery คลายตัว (Priviero et al., 2006) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า propranolol ทำให้หลอดเลือดคลายตัว จึงต้านฤทธิ์ของ PE ที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว เมื่อให้ PE ในขนาดที่ทำให้เกิดการตอบสนอง 80% ขณะที่ให้ propranolol จึงเกิดการตอบสนองได้ไม่ถึง 80% ทำให้การคำนวณค่าการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดจากสารสกัดใบบัวหลวงได้ค่ามากเกินไปจนไม่เป็นจริง ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงยังไม่อาจสรุปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านทาง beta adrenergic receptors ของหลอดเลือด จึงควรมีการศึกษาต่อไปโดยเลือกใช้ beta adrenergic receptor antagonist กลุ่มอื่น

เนื่องจาก propranolol เป็นยาที่ไปปิดกั้นทั้ง β_1 และ β_2 adrenergic receptors ที่หลอดเลือด แต่ที่หลอดเลือดพบว่า β_2 adrenergic receptors เป็นส่วนมาก ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงควรเปลี่ยนจาก propranolol เป็นยาในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ปิดกั้นเฉพาะ β_2 adrenergic receptors นอกจากนี้สารสกัดใบบัวหลวงยังอาจจะออกฤทธิ์ผ่านกลไกอื่นเช่น β_3 adrenergic receptors การกระตุ้น receptor ดังกล่าวมีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัว โดยทำให้ endothelial cells หลั่ง NO (Trochu et al., 1999)

ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงไม่ผ่านทาง muscarinic receptors

การศึกษาผลของ atropine (muscarinic receptor antagonist) ต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง โดยให้ atropine ขนาด 1 μ M ร่วมกับสารสกัดใบบัวหลวง พบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดมีค่าใกล้เคียงกับการให้สารสกัดใบบัวหลวงเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ทั้งในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ และ ในหนูกลุ่มที่เหนียวน้ำให้เป็นความดันโลหิตสูง (รูปภาพ 6) (ตาราง 4) แสดงว่าสารสกัดใบบัวหลวงไม่ได้ออกฤทธิ์ผ่านทาง endothelium muscarinic receptors ในการทำให้หลอดเลือดคลายตัว จากการศึกษาของ จารุณี ปัญญาจิรัฐ (2547) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงในหนูขาว โดยปิดกั้น muscarinic receptors ด้วย atropine แล้วฉีดสารสกัดใบบัวหลวงเข้าทางหลอดเลือดดำ พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความดันโลหิตได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงนั้นไม่ผ่านทาง muscarinic receptors

ฤทธิ์ขยายหลอดเลือดของสารสกัดใบบัวหลวงแบบ endothelium-independent

การศึกษาฤทธิ์การคลายตัวของสารสกัดใบบัวหลวงในหลอดเลือดที่ปราศจาก endothelial cells ผลการทดลองพบว่า สารสกัดใบบัวหลวงสามารถออกฤทธิ์โดยตรงที่ smooth muscle cells โดยความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงขนาด 100 ug/ml ทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ 55% ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ (รูปภาพ 7) (ตาราง 5) โดยทั่วไปกลไกที่ทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัวนั้นเกี่ยวข้องกับการปิดกั้น Ca^{2+} เข้าสู่ smooth muscle cells ทำให้ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์มีระดับต่ำ (Gonzales et al., 2000) จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ปิดกั้น Ca^{2+} channel ในกล้ามเนื้อเรียบ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาขั้นต่อไปเพื่อหากลไกที่สารสกัดใบบัวหลวงทำให้กล้ามเนื้อเรียบที่หลอดเลือดคลายตัว

ในหลอดเลือดที่มี endothelial cells ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดใบบัวหลวงขนาด 100 ug/ml ทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ 85% ในหนูกลุ่มความดันโลหิตปกติ (รูปภาพ 7) (ตาราง 5) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การคลายตัวของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำโดยสารสกัดใบบัวหลวงนั้นถูกยับยั้งโดย L-NAME ซึ่งยับยั้งการสร้าง NO ที่ endothelial cells ดังนั้นฤทธิ์การคลายตัวของสารสกัดใบบัวหลวงยังมีลักษณะแบบ endothelium-dependent ซึ่งเกี่ยวข้องกับ NO pathway อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งต่อไปควรรหาหลักฐานเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงผ่านทาง prostacyclin, EDHF และ histamine receptors และควรทำการตรวจวัดค่า electrolyte ของสารสกัดใบบัวหลวง โดยเฉพาะ K^+ ซึ่งมีผลเหนี่ยวนำให้เยื่อเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบเกิด hyperpolarization ทำให้หลอดเลือดคลายตัวตามมา (Kwon et al., 1999; Sobey, 2001)

ศักยภาพของสารสกัดใบบัวหลวงในการลดความดันโลหิต

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ทั้งในหลอดเลือดปกติ และในหลอดเลือดที่มีพยาธิสภาพความดันโลหิตสูง โดยออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือดทั้งแบบ endothelium-dependent ทำให้มีการหลั่ง NO และแบบ endothelium-independent ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดคลายตัวโดยตรง ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการแพทย์แผนไทย (วันดี กฤษณะพันธ์, 2541) และสอดคล้องกับหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่พบว่าสารสกัดใบบัวหลวงสามารถลดความดันโลหิตในหนูขาว (Trongtorsak et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สารสกัดใบบัวหลวง (methanol extract) มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Wu et al., 2003) ซึ่งอนุมูลอิสระที่มีมากในหลอดเลือด จะทำลาย NO และได้เป็น peroxynitrite ($ONOO^-$) จึงทำให้หลอดเลือดหดตัวมากขึ้น และเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคความดันโลหิตสูง (McIntyre, 1999) การกำจัดอนุมูลอิสระที่หลอดเลือดจะทำให้มี NO ถูกทำลายน้อยลง ดังนั้นจึงมี NO มากพอที่จะทำให้หลอดเลือดคลายตัว จากหลักฐานที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดใบบัวหลวงมีคุณสมบัติทั้ง antioxidant และ

vasorelaxation ผ่านทาง NO pathway จากการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดใบบัวหลวงพบว่ามี ความเป็นพิษน้อย โดยค่า LD₅₀ (lethal dose 50%) มีค่ามากกว่า 8 g/kg (BW) (จงกลณี ใจเพียร, 2541) ดังนั้นสารสกัดใบบัวหลวงจึงน่าจะมีศักยภาพสูงในการลดความดันโลหิต และพัฒนาเป็นยา แผนปัจจุบันเพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูง

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดใบบัวหลวงออกฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดเออร์ตาคลายตัวแบบ dose-dependent ทั้ง ในหลอดเลือดปกติ และในหลอดเลือดที่มีพยาธิสภาพความดันโลหิตสูง โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ของ สารสกัดใบบัวหลวง 2 แบบ คือ endothelium-dependent โดยการหลั่ง NO แล้วทำให้หลอดเลือด คลายตัว และแบบ endothelium-independent โดยทำให้กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดคลายตัว โดยตรง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงอีกครั้ง โดยปรับขนาดของ propranolol ให้ต่ำลง หรือเลือกใช้ selective β_2 adrenergic receptor antagonist เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวงผ่านทาง β adrenergic receptor
2. ควรมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัวหลวง โดยเลือกใช้ blocker ชนิดต่างๆ เช่น cyclooxygenase inhibitor, K^+ channel blocker เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ของสารสกัดใบบัว หลวงผ่านทาง กลไกอื่นนอกจาก NO
3. ควรทำการตรวจวัดค่า electrolyte ในสารสกัดใบบัวหลวง เพื่อพิสูจน์ว่าในสารสกัดใบบัว หลวงมี K^+ สูงหรือไม่ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ hyperpolarization-induced-relaxation
4. ควรแยกสารสกัดบริสุทธิ์จากใบบัวหลวง แล้วนำสารแต่ละชนิดมาทดสอบการทำงานของ หลอดเลือด

เอกสารอ้างอิง

- กองควบคุมยา. (2549). มุลค่าการนำเข้ายาประจำปี 2547 ที่จัดแยกตามฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. วันที่ค้นข้อมูล 1 สิงหาคม 2549, เข้าถึงได้จาก http://wwwapp1.fda.moph.go.th/drug/zone_search/files/sea001_b13.asp
- กองควบคุมยา. (2547). หลักเกณฑ์การผลิตยาจากสมุนไพรตามสุขลักษณะที่ดี. วันที่ค้นข้อมูล 1 ธันวาคม 2547, เข้าถึงได้จาก http://wwwapp1.fda.moph.go.th/drug/zone_search/files/sea001_b13.asp
- กัญจนา ตีวีเศษ และ คณะ. (2542). ผักพื้นบ้านภาคกลาง (1). กรุงเทพมหานคร: องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
- จงกลณี ใจเพียร. (2546). การทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดใบบัวหลวงในหนูถีบจักร. โครงการงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จารุณี ปัญญาจิรวุฒิ. (2547). ฤทธิ์แบบเฉียบพลันของสารสกัดจากใบบัวหลวงต่อความดันโลหิตในหนูขาว. โครงการงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ชยันตร์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาล ขวลิขิต และ วิเชียร จีรวงศ์. (2541). ตำราพระโอสถพระนารายณ์. กรุงเทพมหานคร: อัมรินทร์.
- นันทวัน บุญยประภัสร์ และ อรุณช โชคชัยเจริญพร. (2541). สมุนไพรพื้นบ้าน (2). กรุงเทพมหานคร: ประชาชน.
- นวย อธิปชาติศิริ. (2548). ฤทธิ์แบบเฉียบพลันของสารสกัดจากใบบัวหลวงต่อการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือดในหนูขาว. โครงการงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- พร้อมจิต ศรีลัมพ์. (2548). โครงการการพัฒนาด้านการผลิต การแปรรูป และการตลาดผลิตภัณฑ์ สมุนไพร เพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขัน. ใน การนำเสนอผลการดำเนินงาน โครงการวิจัยบูรณาการ "จากห้องสู่น้ำ" กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์ และณัฐฎิณี ใจจิตร. (2546). การศึกษาฤทธิ์ลดความดันโลหิตของสารสกัดใบบัวหลวง. โครงการวิจัย, สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- รัชณี ฉวีราช. (2532). พรรณไม้หน้า. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 17(3), 147-51.
- วิจิต วัฒนวิบูลย์. (2529). บัวสมุนไพรมีคุณค่า. หมอชาวบ้าน, 8(88), 111-12.
- วันดี กฤษณพันธ์. (2541). สมุนไพรน่ารู้. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วันดี กฤษณพันธ์. (2544). พฤษเคมีเบื้องต้น. ใน นพมาศ สุนทรเจริญนนท์ (บรรณาธิการ). เภสัชวินิจฉัย ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วิสุตา สุวิทยาวัฒน์. (2540). บัวหลวง. จุลสารข้อมูลสมุนไพร, 14(3), 16-21.
- สุนทรี่ สิงหนุต. (2535). สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด. กรุงเทพมหานคร: คุณ 39.

- สมฤดี อรรถชาติ. (2547). ผลของสารสกัดใบบัวหลวงต่อการทำงานของหัวใจหนูขาว. *โครงการวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.*
- สำนักงานสถิติแห่งชาติ. (2549). สถิติสุขภาพ. วันที่ค้นข้อมูล 7 สิงหาคม 2549, เข้าถึงได้จาก http://www.nso.go.th/nso/data/data23/data23_4.html
- Busse, R., Edwards, G., Feletou, M., Fleming, I., Vanhoutte, P.M., & Weston, A.H. (2002). EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*, 23 (8), 374-380.
- Callera, G.E., Varanda, W.A., & Bendhock, L.M. (2000). Impaired relaxation to acetylcholine in 2K-1C hypertensive rat aortas involves changes in membrane hyperpolarization instead of an abnormal contribution of endothelial factors. *Gen Pharmacol*, 34, 379-389.
- Dobrian, A.D., Schriver, S.D., & Prewitt, R.L. (2001). Role of Angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension*, 38, 361-366.
- Drug treatment for primary hypertension. (2006). Retrieved June 8, 2006, from www.harcourt-international.com/e-books/pdf/404.pdf
- Furchgott, R. The nature of the endothelium-derived relaxing factor. Retrieved January 29, 2006, from <http://www.hscbklyn.edu/pharmacology/furch.html>.
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cell in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288, 373-376.
- German, W.J., & Standfield, C.L. (2002). Principles of human physiology (International ed.). Boston: Benjamin Cummings.
- Gonzales, R.J., Carter, R.W., & Kanagy, N.L. (2000). Laboratory demonstration of vascular smooth muscle function using rat aortic ring segments, *Adv Physiol Educ*, 24, 13-21.
- Huralikuppi, J.C., Christopher, A.B. & Stephen, P.M., (1991a). Antidiabetic effect of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Extract: Part I Preliminary studies in rabbits [Abstract]. *Phytother Res*, 5(2), 54-58.
- Huralikuppi, J.C., Christopher, A.B. & Stephen, P.M., (1991b). Antidiabetic effect of *Nelumbo nucifera* Gaertn [Abstract]. Extract: Part II. *Phytother Res*, 5, 217-223.
- Jittiporn, K., Wongkrajang, Y., thongpradichote, S., Tamsiririkkul, R., Kongsakrakoon, B., Peungvicha, P. & Jaiaraj, P. (2002). Effect of extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. Embryo on cardiovascular function in rats. *Thai journal of physiological science*, 15, 34-44.
- Kwon, S.C., Pyun, W.B., Park, G.Y., Choi, H.K., Paik, K.S., & Kang, B.S. (1999). The involvement of K^+ channels and the possible pathway of EDHF in the rabbit femoral artery. *Yonsei Medical journal*, 40, 331-338.
- Li, G.R., Li, X.G., & Lu, F.H. (1989). Effects of neferine on transmembrane potentials of guinea pig myocardium [Abstract]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 10(5), 406-10.

- Li, G.R., Qian, J.Q., & Lu, F.H. (1990). Effects of neferine on heart electromechanical activity in anaesthetized cats [Abstract]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 11(2), 158-61.
- Luscher, T.F., Boulanger, C.M., Dohi, Y., & Yang, Z.H. (1992). Endothelial-derived contracting factors. *Hypertension*, 19, 117-130.
- McIntyre, M., Bohr, D.F., & Dominiczak, A. F. (1999). Endothelial function in hypertension: The role of superoxide anion. *Hypertension*, 34, 539-545.
- Mukherjee, P.K., Das, J., Balasubramanian, R., Saha, K., Pal, M., & Saha, B.P. (1995b). Antidiarrhoeal evaluation of nelumbo nucifera rhizome extract [Abstract]. *J Ethnopharmacol*, 27, 262-4.
- Mukherjee, P.K., Pal, M., Saha, K., & Saha, B.P. (1995a). Hyperglycemic activity of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Fam. Nymphaeaceae) rhizome (methanol extract) in streptozotocin-induced diabetic rats [Abstract]. *Phytother Res*, 9, 522-24.
- Mukherjee, P.K., Pal, M., Saha, K., Saha, B.P., & Das, J. (1996a). Diuretic activity of extract of the rhizomes of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Fam. Nymphaeaceae) [Abstract]. *Phytother Res*, 10, 424-25.
- Mukherjee, P.K., Saha, K., Balasubramanian, R., Pal, M., & Saha, B.P. (1996b). Studies on psychopharmacological effects of *Nelumbo nucifera* Gaertn. rhizome extract [Abstract]. *J Ethnopharmacol*, 54, 63-7.
- Mukherjee, P.K., Saha, K., Pal, M., & Saha, B.P. (1997). Effect of *Nelumbo nucifera* Gaertn. rhizome extract on blood sugar level in rats [Abstract]. *J Ethnopharmacol*, 58, 207-13.
- Neal B, MacMahon S, Chapman N. (2000). Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: Results of prospectively designed overviews of randomized trials. Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. *Lancet*, 356, 1955-64.
- Nguyen, Q.V. (2001). Lotus for export to asia: An agronomic and physiologic study. In a report for the rural industries research & development corporation, Kingstons: Horticultural research institution. Retrieved June 8, 2006, from <http://www.rirdc.gov.au/reports/AFO/01032.pdf>
- Ono, Y., Hattori, E., Fukaya, Y., Imai, S., & Ohizumi, Y. (2006). Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol*, 106, 238-244.
- Priviero, F.B., Teixeira, C.E., Togue, H.A., Claudio, M.A., Webb, R.C., De Nucci, G., Zanesco, A., & Antunes, E. (2006). Vasorelaxing effects of propranolol in rat aorta and mesenteric artery: a role for nitric oxide and calcium entry blockade. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 33(5-6), 448-455.
- Shoji, N.S., Umeyama, A., Saito, N., Iuchi, A., & Takemoto, T. (1998). Asimilobine and lirinidine serotonergic receptor antagonist from *Nelumbo nucifera* [Abstract]. *J Nat Prod*, 50(4), 773-74.
- Sinha, S., Mukherjee, P.K., Mukherjee, K., Pal, M., Mandal, S.C., Saha, B.P. (2000). Evaluation of antipyretic potential of *Nelumbo nucifera* stalk extract [Abstract]. *Phytother Res*, 14, 272-74. Wang, J.L., Nong, Y., & Jing, M.X.

- Sinoherbking. (2004). Scientific extracts. Retrived December 5, 2004 from <http://www.sinoherbking.com/sk3/44003.html>
- Sobey, C.G. (2001). Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21, 28-38.
- Tang, W., & Eisenbrand, G. (1992). Chinese drugs of plant origin. Germany: Printed in Germany, 697-701.
- Trochu, J.N., Leblais, V., Rautureau, Y., Beverelli, F., Le Marec H., Berdeaux, A. & Gauthier, C. (2002). Beta3-adenoreceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*, 128, 69-76.
- Trongtorsak, P., Chaichit, N., Panyajirawut, J. & Pengjun, C. (2004) Acute and chronic hypotensive effects of crude leaf extract of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Thai journal of physiological science*, 17(2), 68-69.
- Wang, J.L., Nong, Y., & Jing, M.X. (1992). Effects of liensinine on haemodynamics in rats and the physiologic properties of isolated rabbit atria [Abstract]. *Yao Xue Xue Bao*, 27(12), 881-885.
- Wang, J.L., Nong, Y., Xia, G.J., Yao, W.X. & Jing, M.X. (1993). Effects of liensinine on slow action potentials in myocardium and slow inward current in canine cardiac Purkinje fibers [Abstract]. *Yao Xue Xue Bao*, 28(11), 812-816.
- Wu, M.J., Wang, L., Weng, C.Y., & Yen, J.H. (2003). Antioxidant activity of methanol extract of the lotus leaf (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Am J Chin Med*, 31(5), 687-698.
- Yu, J., & Hu, W.S. (1997). Effects of neferine on platelet aggregation in rabbits [Abstract]. *Yao Xue Xue Bao*, 32(1), 1-4.