



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “กลไกของกล้วยไทยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของ
ผิวหนังหนูกที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี”

(Mechanisms underlying preventive effects of
Thai banana on UVB-induced skin damage in mice)

โดย

นางสาวจรรุภา วิโยชน์
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
สิงหาคม 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “กลไกของกล้วยไทยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของ
ผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี”

(Mechanisms underlying preventive effects of
Thai banana on UVB-induced skin damage in mice)

คณะผู้วิจัย

นางสาวจรรุภา วิโยชน์

สังกัด

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

เนื้อหางานวิจัย

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

โรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของร่างกายมีหลายโรค ได้แก่ โรคอ้วน ความดัน โรคเบาหวาน โรคหัวใจ การเสื่อมสภาพของผิวหนัง และมะเร็งบางชนิด การเกิดขึ้นของโรคเหล่านี้ล้วนเป็นผลมาจากการสะสมกันของโมเลกุลอนุมูลอิสระ (Oxidant) อันเนื่องมาจากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative damage) อนุมูลอิสระหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันที่สำคัญคือกลุ่มปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีออกซิเจนอยู่ในโมเลกุล หรือเรียกว่า Reactive oxygen species (ROS) สาร ROS ที่จัดอยู่ในประเภทของสารอนุมูลอิสระ (free radical) ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ เรดิคัล (superoxide radical; O_2^-), ไฮดรอกซิลเรดิคัล (hydroxyl radical; HO), อัลคอกซิลเรดิคัล (alkoxyl radical; RO) และไนตรัส เรดิคัล (nitrous radical; NO) สารประกอบเหล่านี้เป็นสารประกอบที่มีอิเล็กตรอนที่วงพลังงานรอบนอกของอะตอมออกซิเจนเป็นเลขคี่จึงไม่คงตัวและไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น สารอนุมูลอิสระสามารถผลิตได้จากร่างกาย (Endogenous) ได้แก่ กระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolisms) และการเสื่อมถอยของร่างกาย (Aging) นอกจากนี้อนุมูลอิสระดังกล่าวยังเกิดขึ้นได้จากปัจจัยภายนอกที่มากกระตุ้นร่างกาย (Exogenous) ได้แก่ ฝุ่น ควัน มลภาวะ ควันบุหรี่ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการได้รับสัมผัสจากแสงยูวีเป็นเวลานาน แต่อย่างไรก็ตาม ร่างกายของมนุษย์มีกลไกต่างๆ ในการกำจัดและต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยหนึ่งในกลไกนั้นคือ ในร่างกายมีกลูตาไธโอน และวิตามินซี ซึ่งเป็นสารที่มีมวลน้อยและมีความไวในการกำจัดอนุมูลอิสระ ทว่าการสะสมของอนุมูลอิสระในร่างกายทำให้กลไกนี้มีความสามารถลดลงในการกำจัดอนุมูลอิสระ ดังนั้นการรับประทานอาหารที่มีแอนติออกซิเดนต์อย่างสม่ำเสมอ จะช่วยกระตุ้นกลไกนี้ของร่างกายให้ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งนอกจากจะช่วยป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระแล้วยังช่วยลดการเกิดโรคต่างๆ ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นอีกด้วย ในปัจจุบันมีการศึกษาว่าแอนติออกซิเดนต์ที่พบมากมักจะอยู่ในผักและผลไม้ และการรับประทานผักและผลไม้อย่างสม่ำเสมอแล้ว จะเป็นการช่วยเพิ่มแอนติออกซิเดนต์ภายในร่างกาย[1-4] นอกจากนี้ แอนติออกซิเดนต์ที่พบในผักและผลไม้ยังช่วยเพิ่ม และกระตุ้นให้ร่างกายผลิตแอนติออกซิเดนต์ (Endogenous antioxidant)[5-7] ซึ่งนำไปสู่การชะลอ และลดอัตราการเกิดโรคเสื่อมสภาพของร่างกาย[8-10]

ปัจจุบันพบว่าโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของร่างกายกลายเป็นปัญหาสุขภาพของประเทศไทย เนื่องจากการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจอย่างรวดเร็วร่วมกับการรับวัฒนธรรมตะวันตกที่เข้ามาเปลี่ยนแปลงวิถีชีวิต คุณภาพชีวิต และลักษณะของอาหารที่รับประทานก็เปลี่ยนแปลงตามไปด้วย เช่นการรับประทานอาหารจานด่วน ฟาสต์ฟู้ด เป็นต้น เห็นได้ทั่วไปว่า อาหารของคนไทยเปลี่ยนไป จากที่มีส่วนผสมของผักและผลไม้ กลายเป็นอาหารที่มีส่วนผสมของไขมัน และเนื้อสัตว์มากขึ้น ในทางกลับกันผักผลไม้ก็ลดลง มีรายงานว่า คนไทยได้รับผักและผลไม้ น้อยกว่าปกติ เท่าที่ควรจะได้รับ โดยเฉพาะในสังคม

กลุ่มผู้มีรายได้น้อย [11] ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการมุ่งเน้นเพื่อส่งเสริมและประชาสัมพันธ์ ในการประชาชน ได้รับผักและผลไม้อย่างเพียงพอ เพื่อป้องกันการเกิดของโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของร่างกายของคนไทย โดยเฉพาะการส่งเสริมการรับประทานผลไม้ไทยที่มีตามท้องตลาด หาได้ไม่ยาก มีราคาถูก และหา รับประทานได้ตลอดปี ทั้งผลสดและผลิตภัณฑ์แปรรูป เช่น กัวยไข่ กัวยน้ำว่า เป็นต้น

แนวทางที่ดีที่สุดในการส่งเสริมการรับประทานผักและผลไม้ที่เหมาะสมคือการให้ความรู้และข่าวสารเชิงวิทยาศาสตร์ที่มีหลักฐานประจักษ์ มีงานวิจัยรับรองแก่ประชาชน เพื่อคุณภาพชีวิตที่ดีของคนไทย แต่ยังมี การศึกษาไม่มากนัก ที่ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างสารสำคัญต่างๆที่มีในผลไม้ ความสามารถในการเป็นสารกลุ่มแอนติออกซิแดนซ์ และผลประโยชน์ต่อร่างกายจากการรับประทานผลไม้ไทย ด้วย เหตุผลดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการวิจัยค้นคว้าเพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับประโยชน์ของผลไม้ไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกัวยไทย ได้แก่ กัวยไข่และกัวยน้ำว่า ในการศึกษาที่ผ่านมา [7] ผู้วิจัยได้ศึกษาประเมินประสิทธิภาพของกัวยไข่และกัวยน้ำว่าในการป้องกันผิวหนังที่ถูกทำลาย โดย ผิวหนังหนูทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแก่ก่อนวัยและถูกทำลายโดยรังสียูวีบี ผู้วิจัยพบว่า การที่หนูทดลองกินกัวยไข่ทุกวันๆละ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวต่อวันสามารถลดการถูกทำลายจากรังสียูวีบี และชะลอการเสื่อมสภาพของผิวหนังได้ การลดลงของกลูต้าไธโอนในผิวหนังซึ่งเป็นแอนติออกซิแดนซ์ที่ใน ร่างกายที่สำคัญพบในกลุ่มหนูทดลองที่ถูกฉายด้วยรังสียูวีบี เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ คือไม่ได้รับรังสียูวีบี นอกจากนี้หนูที่ได้รับกัวยไข่ทุกวันๆละ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน หรือ ได้รับวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวัน ยังพบกลูต้าไธโอนในปริมาณที่สูงอยู่ การได้รับกัวยน้ำว่าไม่มีผลต่อระดับกลูต้าไธโอนใน ผิวหนังซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญกับหนูกลุ่มที่ถูกฉายด้วยรังสียูวีบี จากการศึกษาปริมาณฟีนอลิกรวม โดยวิธี Folin-Ciocalteu และความสามารถในการต่อต้านสารออกซิแดนซ์ โดยวิธี DPPH assay ว่า ปริมาณฟีนอลิกรวมในกัวยน้ำว่าและกัวยไข่มี 144.1 ± 5.0 และ 308.8 ± 5.4 มิลลิกรัมกัลป์ลิกสมมูลต่อ กัวยสด 100 กรัม ตามลำดับ และค่า IC_{50} ในการต่อต้านการเกิดออกซิเดชันของกัวยน้ำว่า กัวยไข่ และวิตามินซี เป็น 108.3 ± 5.8 , 16.2 ± 1.7 และ 0.06 ± 0.004 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากงานวิจัยที่ผ่านมา ผู้วิจัยมีสมมติฐานว่า กระบวนการป้องกันผิวหนังเสื่อมสภาพในหนูที่ถูก เหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบีอาจจะเป็นผลมาจากกิจกรรมของสารแอนติออกซิแดนซ์ที่พบในกัวยไข่มากกว่า กัวยน้ำว่าถึง 6 เท่า นอกจากนี้กัวยไข่ยังมีความสามารถในการฟื้นฟูระดับของกลูต้าไธโอนที่เทียบเท่า กับหนูทดลองในกลุ่มปกติที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี ผลที่เกิดขึ้นอาจจะมาจากสารสำคัญเช่น เบต้าแคโรทีน กรด กัลลิก และแคทีชินที่มีอยู่ในกัวยชนิดนี้[12-14] เพื่อทดสอบสมมติฐานดังกล่าว ในการศึกษานี้จะศึกษา ความแตกต่างของสารแอนติออกซิแดนซ์ที่มีในกัวยทั้งสองชนิดได้แก่กัวยไข่ และกัวยน้ำว่า และศึกษา กลไกของกัวยในการเหนี่ยวนำการเพิ่มระดับกลูต้าไธโอน โดยศึกษาระดับของเอนไซม์ Gamma-GCS ซึ่ง เป็น rate limiting step เอนไซม์ ในการผลิตกลูต้าไธโอนในผิวหนังหนูที่ได้รับกัวยไข่ กัวยน้ำว่า หรือ วิตามินซีเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติที่ไม่ได้รับยูวีบี และกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่าร่วมกับยูวีบี นอกจากนี้จะศึกษา

ระดับของกลูต้าไธโอน ผลิตผลจากกระบวนการเพอร์ออกซิเดชันของไขมัน และกระบวนการออกซิเดชันของโปรตีนที่อาจเกิดจากการถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี ผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสารสำคัญที่มีในกล้วย สารแอนตีออกซิแดนท์ และผลต่อร่างกายที่เกิดจากการรับประทานกล้วยไทย ดังนั้น การศึกษานี้จะเป็นความรู้พื้นฐานในการช่วยส่งเสริมและประชาสัมพันธ์ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์แก่ผู้ค้าต่างๆ ให้ผู้คนหันมาทานผลไม้ที่อุดมไปด้วยสารอาหารมากขึ้น ทำให้สุขภาพดี คุณภาพชีวิตที่ดี ลดปัญหาการสาธารณสุขของประเทศ

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสารแอนตีออกซิแดนท์ที่มีในกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้า
2. เพื่อศึกษาความสามารถของสารแอนตีออกซิแดนท์ในกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าในการป้องกันการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันและโปรตีนออกซิเดชันในผิวหนังหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี
3. เพื่อศึกษากลไกของกล้วยในการกระตุ้นให้ผิวหนังสร้างกลูต้าไธโอนในหนูเม้าส์ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบี

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

1. สารเคมี สัตว์ทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1.1 แหล่งพืช

1. กล้วยไข่ (*Musa surier*, *Musa AA* group) จังหวัดพิษณุโลก
2. กล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum*, *Musa ABB* group) จังหวัดพิษณุโลก

1.2 สารเคมี

1. Acetone (AR. grade, Batch No. 13030020, LabScan Asia Co. LTD., Bangkok, Thailand)
2. Beta-Carotene (HPLC grade, Lot. SLBG6787V, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
3. Rabbit Polyclonal Antibody to MMP-1 Antibody (Lot. GR121039-30, Abcam plc., Cambridge UK)
4. Rabbit Polyclonal Antibody to Malondialdehyde Antibody (Lot. GR256851-1, Abcam, plc., Cambridge UK)
5. Rabbit Polyclonal Antibody to 4-Hydroxynonenal (Lot. GR217413-2 Abcam, plc., Cambridge UK)
6. Rabbit Polyclonal Antibody to GCLC (γ -GCS) (Lot. GR120972-1 Abcam, plc., Cambridge UK)
7. GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit (Fluorometric-Green) (Lot. GR214078-1 Abcam, plc., Cambridge UK)
8. Goat anti-rabbit IgG-HRP (Millipore, Massachusetts, USA)
9. Goat anti-mouse IgG, HRP conjugate, Lot. NG1850774, Merck Millipore, California, USA)
10. Acrylamide (BIO-RAD laboratories, Philadelphia, USA)
11. Ammonium persulfate (Cat. 161-0700, BIO-RAD Laboratories, California, USA)
12. Bovine serum albumin (Lot. 051M1845V Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, USA)
13. Bromophenol blue (Cat. 161-0404, BIO-RAD Laboratories, California, USA)
14. DCTM Protein assay Reagent A (Cat. 500-0113, BIO-RAD Laboratories, California, USA)
15. DCTM Protein assay Reagent B (Cat. 500-0114, BIO-RAD Laboratories, California, USA)
16. Deionized water (Batch No. 151280066, LabScan Asia Co. LTD., Bangkok, Thailand)
17. Ethanol (AR. grade, Batch No. 14080302, LabScan Asia Co. LTD., Bangkok, Thailand)
18. Goat polyclonalAb to Rb IgG Cy5 conjugated (Lot. GR93882-13 Abcam, canbridge, UK)

19. Goat polyclonalAb to Rb IgG FITC conjugated (Lot. 887327 Abcam, canbridge, UK)
20. Glycerol (Lot. SHBC7796V, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA)
21. Glycine (Cat. 161-0718, BIO-RAD Laboratories, California, USA)
22. Histological staining for nuclear staining Haematoxylin and Eosin staining (Lot. SEP. 2015, C.V. Laboratories CO., LTD. Bangkok, Thailand)
23. Histological staining for PATH.1 Counter staining Haematoxylin and Eosin staining (Lot. SEP. 2015, C.V. Laboratories CO., LTD. Bangkok, Thailand)
24. 2-mercaptoethanol (BIO-RAD Laboratories, California, USA)
25. Methanol (AR. grade, Batch No. 14040243, LabScan Asia Co. LTD., Bangkok, Thailand)
26. N,N' methylene-bis-acrylamide (Bis) (BIO-RAD Laboratories, California, USA)
27. Histological Mounting Medium (Permout) (Lot. 1813446, Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
28. Potassium dihydrogen orthophosphate (Batch No. AF501339, Ajax Finechem Pty., LTD, Auckland, New Zealand)
29. Sodium chloride (Batch No. 1306251725, Ajax Finechem Pty., LTD, Auckland, New Zealand)
30. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Cat. 161-0301, BIO-RAD Laboratories, California, USA)
31. N,N,N',N',-tetramethylethylenediamine (TEMED) (Lot No. 210001692, BIO-RAD Laboratories, California, USA)
32. Tris (Hydroxymethyl) amonmethane (Cas-No. 77-86-1, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
33. Triton-X (analytical grade, Sigma-Aldrich Co., St.Loious, Missouri, U.S.A.)
34. Transfer buffer (Lot. PF199282, Thermo Scientific, Illinois, USA)
35. Frozen section compound (Lot. 091012, Leica Microsystems, Illinois, USA)
36. Tissue Protein Extraction reagent (T-per[®]) (Lot. QC214313, Thermo Scientific, Illinois, USA)
37. Tween 20 (Srichand United Dispensary CO., LTD., Bangkok Thailand)
38. Skim milk powder (Lot. VL321563 126, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
39. Hydrogen peroxide 30% (Cas. No. 1336-21-6, Lot. K45343387-415 Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

40. Anti- β -actin monoclonal antibody (A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
41. PVDF membrane (Pall Corporation, Florida, USA)
42. Poly-L-Lysine solution (Lot. SLBN6266V, Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, Missouri, USA)
43. L (+) Ascorbic acid (POCH, Sowinskiego, Poland)
44. OxyIHCTM Oxidative stress Detection Kit, S7450 (Lot. 2639344, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

1.3 สัตว์ทดลอง

1. หนูทดลองเพศผู้ (หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR, อายุ 5 สัปดาห์, สำนักทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล, จังหวัดนครปฐม)

1.4 อุปกรณ์ และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. pH meter (METTLER TOLEDO, S20-k, Mettler-Toledo International inc, Ohio, USA) Ultracentrifuge (HETTICH, MIKRO 120, Massachusetts, USA)
2. Freeze drying apparatus (FTS system Dura dry type FD 95C12, FTS Systems Inc., New York, U.S.A.)
3. Magnetic stirrer (HL instrument, MS 115, Harikul Science, Tokyo, Japan)
4. Carl zeiss-axio observer z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss Microscopy Ltd, Cambridge, England) Microplate reader (model CeresUV900C, Bio-Tex Instrument, USA)
5. Cryostat (Leica Microsystem Nussloch GmbH, Nussloch, Germany)
6. Vertical gel electrophoresis
7. Water bath (model LWB-211A, Daihom Lab Tech Co. TLD., Korea)
8. ChemiDocTM XRS+ with Image LabTM Software (BIO-RAD Laboratories, California, USA)
9. Carl zeiss-axio observer z1 fluorescent microscope (Carl Zeiss Microscopy Ltd, Cambridge, England)

2. วิธีการดำเนินการวิจัยและผลการวิจัย

2.1 รายละเอียดของพืชที่ใช้ในการทดลอง

กล้วยไข่และกล้วยน้ำว้า เป็นพืชล้มลุกที่อภิปรัชญาศาสตร์ *Musa surier* และ *Musa sapientum* L. ตามลำดับ เป็นพืชในวงศ์ Musaceae นอกจากนี้กล้วยไข่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม AA และกล้วยน้ำว้าถูกจัดอยู่ในกลุ่ม ABB ตามจำนวนโครโมโซม[15] ลักษณะโดยทั่วไปของกล้วยทั้งสองชนิดนี้เป็นพืชล้มลุก มีลำต้นใต้ดิน มีอายุได้หลายปี ลำต้นบนดินรูปทรงกระบอก สูง 2-9 เมตร เป็นลำต้นปลอม เกิดจากกาบใบห่อหุ้มซ้อนกัน ใบออกเรียงเวียนสลับกันรูปขอบขนานท้องใบ เส้นใบมีจำนวนมาก แยกออกจากเส้นกลางใบทั้งสองข้าง ขนานกันไปจดขอบใบ ก้านใบ ยาว 1-2 เมตร ด้านกลางกลม ด้านบนเป็นร่อง ส่วนโคนแผ่ออกเป็นกาบ (sheath) ดอก ออกเป็นช่อห้อยลง เรียกหัวปลี ก้านดอกช่อ (peduncle) แข็ง ดอกย่อยแยกเป็นดอกเพศผู้ (staminate flower) และเพศเมีย (pistillate flower) ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อสุกมีรสหวาน มีสีเหลือง เนื้อในสีขาวหรือขาวอมเหลืองถึงส้ม รับประทานได้ เมล็ด ไม่มี หรือ มีแต่น้อย ค่อนข้างกลม ทั้งช่อดอกที่เจริญเป็นผลเรียกเครือ ลักษณะผลของกล้วยน้ำว้ามีขนาดใหญ่กว่ากล้วยไข่ ผลกล้วยมีเหลี่ยมเล็กน้อย ส่วนผลกล้วยไข่ เมื่อสุกผลจะไม่มีเหลี่ยม ปลายผลกลมมน มีขนาดเล็กกว่ากล้วยน้ำว้า การจัดเรียงผลมักไม่เป็นระเบียบ กล้วยในประเทศไทยมีวิวัฒนาการมาจากกล้วยป่า ที่คนไทยนิยมบริโภคได้แก่ กล้วยหอม กล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้า[16]



<http://www.bansuanporpeang.com/node/63>

รูปที่ 1 กล้วยไข่ (*Musa surier*)



<http://www.fankaset.com/product/14/>

รูปที่ 2 กล้วยน้ำว้า (*Musa sapientum*)

2.2 การสกัด Polyphenols จากกล้วยน้ำว้า และกล้วยไข่

นำกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ที่มีความสุกระดับ 6-7 ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะของสีเปลือก ซึ่งจะมีสีเหลืองทั่วทั้งลูกและมีจุดสีน้ำตาลประปราย ล้างน้ำให้สะอาด ปอกเปลือกเอาเฉพาะเนื้อป็นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำกล้วยที่ปั่นละเอียด 30 กรัม สกัดในตัวทำละลาย 50% Ethanol โดยใช้วิธี Maceration ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที นำไปกรองเพื่อกำจัดส่วนที่เป็นกากและปั่นเหวี่ยงด้วย Centrifuge ความเร็วรอบ 15000 rpm นาน 10 นาที ส่วนใส Supernatant จะถูกนำไปวิเคราะห์ต่อไป[7]

2.3 การวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Activity) ของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่ [17]

สารสกัดที่ได้จากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่จะถูกทดสอบประสิทธิภาพ ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Free radical scavenging) โดยใช้สาร 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ในการทดสอบ ซึ่งจะเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (L-Ascorbic acid) โดยตัวชี้วัดประสิทธิภาพของการทดสอบสารละลายตัวอย่างคือการจางลงของสี DPPH จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ในการทดสอบจะใช้ Supernatant ตัวอย่างที่สกัดใน 50% Ethanol และละลายสาร DPPH ในตัวทำละลาย 50% Ethanol เช่นเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายที่ได้ในความเข้มข้นต่างๆ (0.0002 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถึง 33.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยตัวทำละลาย 50% Ethanol หยดลง 96-well plate ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.2 mM ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที ในความมืด ที่อุณหภูมิห้อง

ในการวัดสารละลายมาตรฐาน (Blank Solution) จะใช้ 50% Ethanol แทนสารตัวอย่างในปริมาตรที่เท่ากัน เมื่อครบเวลาจึงทำการวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Microplate Reader (BioTek Instruments, BioStack Ready) โดยจะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จึงนำค่าที่ได้มาหาประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระเป็นจำนวนร้อยละของการจางสีของ DPPH โดยสมการต่อไปนี้

$$\text{ร้อยละของประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระ} = [1 - (A_S / A_B)] \times 100$$

โดย A_S คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH โดยมีสารละลายตัวอย่าง และ

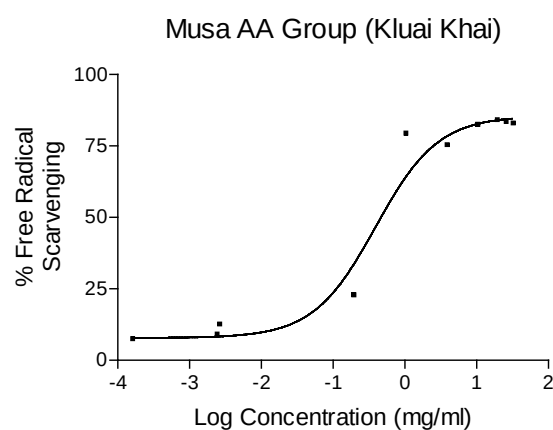
A_B คือ ค่าดูดกลืนแสงของ DPPH โดยไม่มีสารละลายตัวอย่าง

จากการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระแสดงในค่า EC_{50} (ค่าความเข้มข้นสมมูลที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพร้อยละ 50) ของสารสกัดจากกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า และ L-

Ascorbic acid ดังแสดงในตารางที่ 1,2,3 และรูปที่ 1,2,3 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกล้วยไข่ (EC50 391.8 $\pm$ 0.13 μ g/ml) มีความสามารถมากกว่ากล้วยน้ำว้า (EC50 1368 $\pm$ 0.13 μ g/ml) แต่ทั้งนี้สารสกัดในกล้วยทั้งสองชนิดมีความสามารถน้อยกว่า L-Ascorbic acid

ตารางที่ 1 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกล้วยไข่

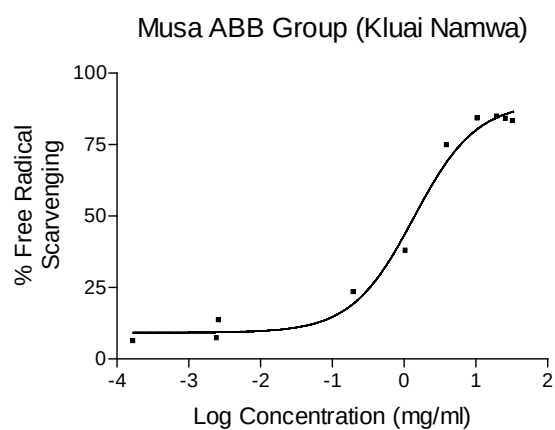
ความเข้มข้นของสารสกัดกล้วยไข่ (mg/ml)	% Free radical scavenging	EC50 (μ g/ml)
0.0002	7.29 $\pm$ 1.28	391.8 $\pm$ 0.13
0.0025	8.89 $\pm$ 1.33	
0.0027	12.38 $\pm$ 1.81	
0.2000	40.56 $\pm$ 1.93	
1.0666	79.23 $\pm$ 4.49	
3.9996	75.13 $\pm$ 3.92	
10.6656	82.31 $\pm$ 2.00	
19.9980	83.89 $\pm$ 0.59	
26.6640	83.27 $\pm$ 0.40	
33.3300	82.71 $\pm$ 0.18	



รูปที่ 3 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกล้วยไข่

ตารางที่ 2 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกล้วยน้ำว้า

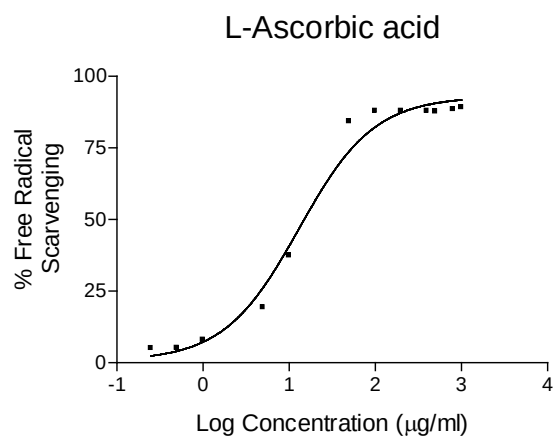
ความเข้มข้นของสารสกัดกล้วยน้ำว้า (mg/ml)	% Free radical scavenging	EC50 (μ g/ml)
0.0002	6.15 ± 2.48	1368 ± 0.13
0.0025	7.09 ± 1.56	
0.0027	13.42 ± 2.52	
0.2000	23.32 ± 0.32	
1.0666	37.82 ± 2.29	
3.9996	74.72 ± 0.53	
10.6656	84.05 ± 1.39	
19.9980	84.73 ± 0.92	
26.6640	83.98 ± 1.43	
33.3300	83.12 ± 1.86	



รูปที่ 4 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดกล้วยน้ำว้า

ตารางที่ 3 ร้อยละของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ L-Ascorbic acid

ความเข้มข้นของ L-ascorbic acid ($\mu\text{g/ml}$)	% Free radical scavenging	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
0.25	5.07 ± 3.81	13.02 ± 3.43
0.5	5.09 ± 4.83	
1	7.98 ± 7.49	
5	19.33 ± 5.97	
10	37.40 ± 7.44	
50	84.18 ± 8.31	
100	87.87 ± 2.00	
200	87.87 ± 2.24	
400	87.88 ± 2.35	
500	87.64 ± 2.76	
800	88.47 ± 1.42	
1000	89.14 ± 0.93	



รูปที่ 5 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ L-Ascorbic acid

2.4 การวัดปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) ในสารสกัดกล้วยน้ำว้า และ กล้วยไข่(2)

สารสกัดที่ได้จากกล้วยน้ำว้าและกล้วยไข่จะถูกวัดปริมาณฟีนอลิกรวม (Total phenolic content) โดยใช้สาร Folin-Ciocalteu's reagent ในการทดสอบซึ่งจะศึกษาเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid ซึ่งใช้ 5 ความเข้มข้น 0.015, 0.03, 0.075, 0.150 และ 0.300 ตามลำดับ เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน

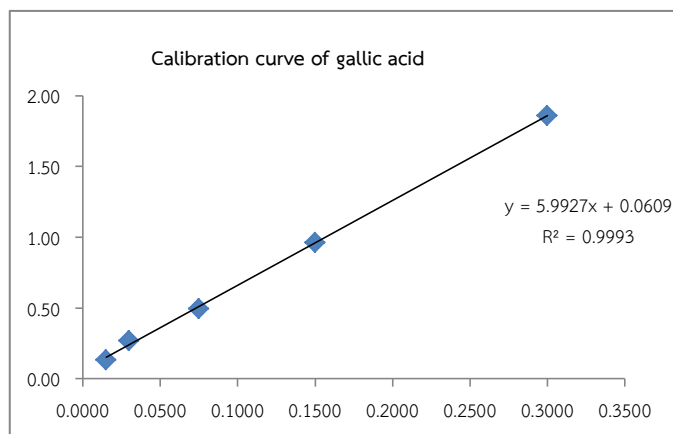
ในการทดสอบปริมาณฟีนอลิกรวม สารสกัดจากกล้วยน้ำว้า, กล้วยไข่ และ สารละลายเจือจางสารมาตรฐานถูกหยดลงใน 96-well plate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 130 ไมโครลิตร และ Folin-Ciocalteu's reagent ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หมั่นด้วยอุณหภูมิต่ำสุด บ่มนาน 5 นาทีในที่มืด จากนั้น sodium bicarbonate (7%Na₂CO₃) ถูกหยดลงในหลุมทดลองปริมาตร 100 ไมโครลิตร หมั่นด้วยอุณหภูมิต่ำสุด บ่มนาน 30 นาทีในที่มืด วัดปริมาณ Total phenolic โดย Folin-Ciocalteu's reagent จะ ทำปฏิกิริยากับสาร Phenolic ในสารสกัดจากกล้วย เกิดเป็นสีม่วงน้ำเงิน เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid

ในการวัดสารละลายมาตรฐาน (Blank Solution) จะใช้ 50% Ethanol แทนสารตัวอย่างใน ปริมาตรที่เท่ากัน เมื่อครบเวลาจึงทำการวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 750 นาโน เมตร โดยใช้เครื่อง Microplate Reader (BioTek Instruments, BioStack Ready) โดยจะทำการ ทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จึงนำค่าที่ได้มาคำนวณปริมาณฟีนอลิกรวมในหน่วยมิลลิกรัมกัลลิกเทียบเท่า 100 กรัม ผลไม้สด (mg gallic acid equivalents/100 g fresh fruit)

จากการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น พบว่า ฟีนอลิกรวมในกล้วยไข่มีปริมาณที่สูงกว่าในกล้วยน้ำว้า อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยในกล้วยไข่มีฟีนอลิกรวม 38.40 ± 1.39 mg gallic acid equivalents/100 g fresh fruit. และในกล้วยน้ำว้ามีฟีนอลิกรวม 30.05 ± 0.50 mg gallic acid equivalents/100 g fresh fruit.

ตารางที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน Gallic acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Concentration of Gallic acid (mg/ml)	Absorbance (750 nm)
0.015	0.13 ± 0.01
0.030	0.27 ± 0.01
0.075	0.49 ± 0.01
0.150	0.96 ± 0.02
0.300	1.85 ± 0.02



รูปที่ 6 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน Gallic acid $R^2 = 0.9993$

ตารางที่ 5 ปริมาณฟีนอลิกรวมในกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้า

Extracts	mg/g GAE
<i>Musa suerier</i> (Kluai Kai)	38.39 ± 1.394
<i>Musa sapientum</i> (Kluai Namwa)	30.05 ± 0.500

2.5 การสกัด และวัดปริมาณ β -carotene ทั้งหมดในผลสุกของกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้า

ในการสกัด β -carotene เพื่อนำมาวิเคราะห์นั้น กล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าที่สุก ถูกนำมาปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง Freeze dry กล้วยที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วปริมาณ 5 มิลลิกรัม ถูกนำมาบด และสกัดโดยใช้เครื่อง Soxhlet เอทานอลปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่มี 2 โมลาร์ Potassium hydroxide และ 10% L-ascorbic acid ถูกใช้เป็นตัวละลายในกระบวนการสกัด ตั้งอุณหภูมิของ water bath ระหว่างการสกัด 70-80 องศาเซลเซียส เวลาในการสกัด 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นร่อนสารสกัดเท่ากับ อุณหภูมิห้อง นำสารสกัดทั้งหมดลงใน separating funnel และทำการสกัดต่อด้วยเฮกเซนปริมาตร 70 มิลลิตร เมื่อตัวทำละลายแยกเป็นสองชั้น ทำการเก็บชั้นบน ซึ่งเป็นชั้นของเฮกเซน มาสกัดต่อใน separating funnel ที่มี 5% w/v ของ Potassium hydroxide อยู่ 50 มิลลิลิตร โดยใช้เฮกเซนสกัดต่อ 2 ครั้ง

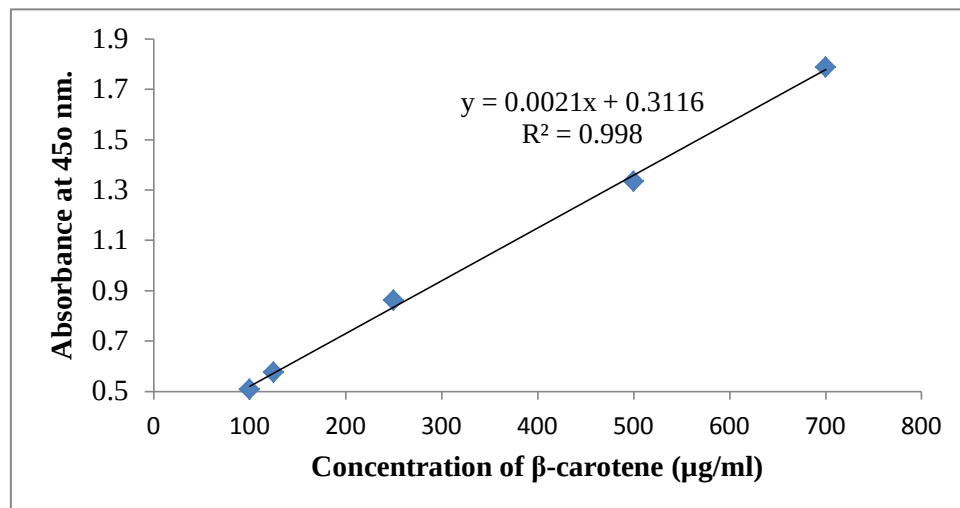
ครั้งละ 35 มิลลิลิตร นำสารสกัดชั้นเฮกเซนจากครั้งที่ 1 และ 2 มารวมกันแล้วผสมกับ 10% w/v ของ Sodium chloride ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใน separating funnel จากนั้นทำการเก็บสารสกัดชั้นเฮกเซนเพื่อกำจัดตัวทำละลายโดยวิธี Evaporation นำสารสกัดไปทำให้แห้งอีกรอบด้วยการเป่าด้วยแก๊สไนโตรเจน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

ในการวัดปริมาณ β -carotene สาร β -carotene มาตรฐานถูกนำมาละลายในตัวทำละลายเมทานอล ทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ 100, 125, 250, 500 และ 700 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน สารสกัดจากกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าถูกเตรียมที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างทั้งหมดถูกเตรียมใน 96 well plate จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรโดยเครื่อง Microplate reader นำค่าที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ β -carotene เทียบกับกราฟมาตรฐาน

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า ในกล้วยไข่มีปริมาณ β -carotene ที่สูงกว่ากล้วยน้ำว้า โดยในกล้วยไข่มีปริมาณ β -carotene 56.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมของสารสกัด ส่วนในกล้วยน้ำว้ามีปริมาณ β -carotene ต่ำกว่าความสามารถของเครื่องที่จะวัดได้



รูปที่ 7 สารสกัด β -carotene จากกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าในตัวทำละลายเมทานอล



รูปที่ 8 กราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน β -carotene $R^2 = 0.998$

2.6 การทดสอบ *In vivo* วัดความหนา และศึกษาการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อในหนังหนูกีโดมแสงยูวีบี

2.6.1 สัตว์ทดลองที่ใช้

หนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ ถูกเลี้ยงที่สถานสัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย ซึ่งได้รับมาตรฐาน AAALAC international หนูเม้าส์ถูกเลี้ยงในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 22 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ $55 \pm 10\%$ ก่อนที่จะทำการศึกษา โดยหนูหนูได้รับอาหารพื้นฐานที่ใช้ในห้องทดลอง รวมถึงได้รับน้ำอย่างพอเพียงก่อนนำมาทดลอง โครงร่างการศึกษาที่ใช้ในโครงการครั้งนี้ ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตามเลขที่โครงการ NU-AE570513

โดยในการศึกษาครั้งนี้หนูถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ดังนี้

- กลุ่มปกติ (normal group) คือ กลุ่มที่ไม่ฉายยูวีบี
- กลุ่มควบคุม (control group) คือ กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีและได้รับน้ำเปล่า
- กลุ่มเปรียบเทียบ (positive group) คือ กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีและได้รับวิตามินซีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน [7]

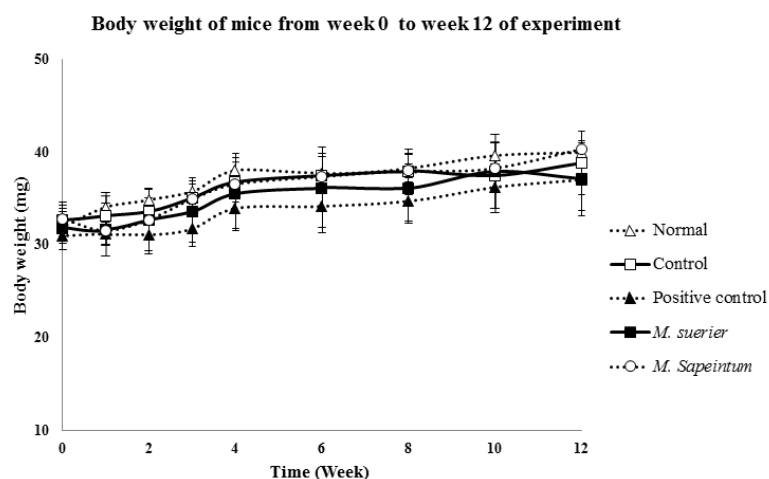
- กลุ่มทดลองที่ 1 (test group 1) คือ กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีและได้รับกล้วยไซบด 1 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน

- กลุ่มทดลองที่ 2 (test group 2) คือ กลุ่มที่ได้รับแสงยูวีบีและได้รับกล้วยน้ำว้าบด 1 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักตัวต่อวัน

ในการศึกษาผลของการกินกล้วยไซและกล้วยน้ำว้าบดต่อความหนาของผิวหนังและปริมาณของ เอนไซม์ γ -GCS, กลูต้าไธโอน, Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal และโปรตีนคาร์บอนิล ในหนูเม้าส์ ที่ได้รับแสงยูวีบี บริเวณส่วนหลังของหนูทดลอง (ตั้งแต่บริเวณขาหน้าถึงขาหลัง) จะถูกถอนออกโดยใช้ sodium sulphide ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ทำไว้เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วใช้ลากลีเปียกเช็ดออก 2 รอบ จากนั้นแต่ละกลุ่มจะได้รับการป้อนสารโดยใช้ feeding tube หนูทุกวัน แล้วทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงก่อนรับแสงยูวีบี แสงยูวีบีที่ใช้มีแหล่งกำเนิดจาก UVB chamber ที่ประกอบด้วยหลอด UVB Lamp (ชนิด 8 วัตต์ ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 275-305 นาโนเมตร, Toshiba, Japan)

หนูจะได้รับแสงยูวีบีสัปดาห์ละ 3 ครั้ง (จันทร์ พุธ และศุกร์) ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็นช่วงดังนี้

- ช่วงสัปดาห์ที่ 1-4 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 54 จูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 4-7 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 72 จูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 7-10 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 108 จูลต่อตารางเซนติเมตร
- ช่วงสัปดาห์ที่ 10-12 ความเข้มแสงที่ใช้คือ 126 จูลต่อตารางเซนติเมตร [7]



รูปที่ 9 แสดงน้ำหนักของหนูเม้าส์ในแต่ละกลุ่ม ระหว่างทำการศึกษาน้ำหนักหนูเม้าส์เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่ม และแตกต่างกันไม่มีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าการกินกล้วยไซ หรือกล้วยน้ำว้า ไม่ได้ส่งผลต่อความอ้วนของหนูเม้าส์



รูปที่ 10 แสดงลักษณะผิวหนังหนุ่เฒ่าสีในกลุ่มปกติ (Normal group) ในสัปดาห์ที่ 9 ซึ่งไม่ได้รับแสงยูวีบี



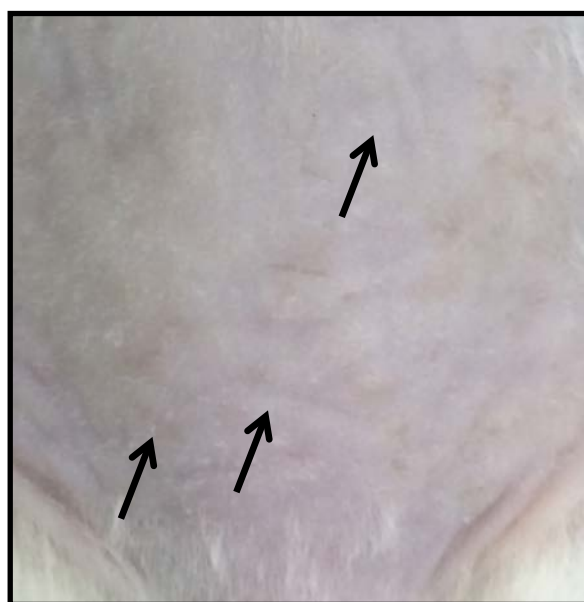
รูปที่ 11 แสดงลักษณะผิวหนังหนุ่เฒ่าสีในกลุ่มควบคุม (Control group) ในสัปดาห์ที่ 9 ซึ่งได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินน้ำเปล่า



รูปที่ 12 แสดงลักษณะผิวหนังหนุ่เฝ้าสีในกลุ่มควบคุม (Positive Control group) ในสัปดาห์ที่ 9 ซึ่งได้รับแสงยูวีบีพร้อมกับการกินวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวัน



รูปที่ 13 แสดงลักษณะผิวหนังหนุ่เฝ้าสีในกลุ่มทดลอง (Test group) ในสัปดาห์ที่ 9 ซึ่งได้รับแสงยูวีบีพร้อมกับการกินกล้วยไ้บด 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน



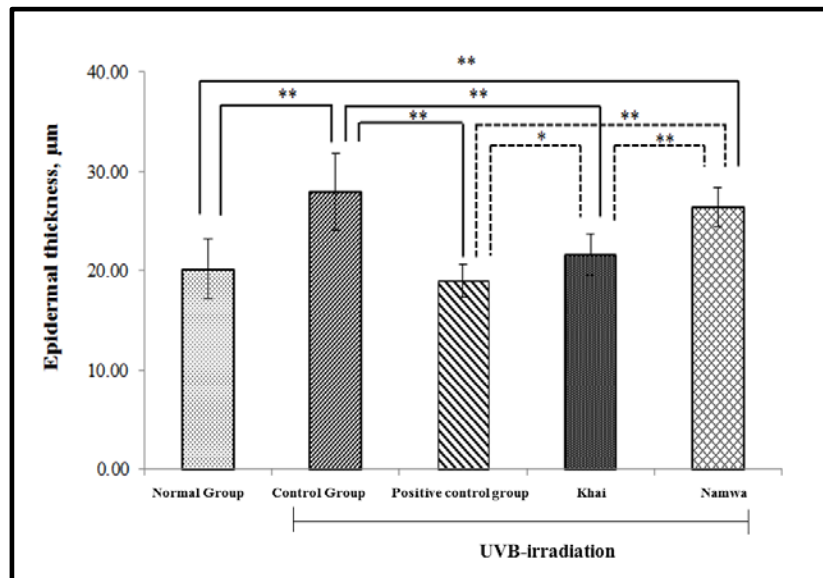
รูปที่ 14 แสดงลักษณะผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ในสัปดาห์ที่ 9 ซึ่งได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยน้ำว้าสด 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน

2.6.2 การวัดความหนาของ epidermis โดยตรวจสอบจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological examination) ของผิวหนังหนู

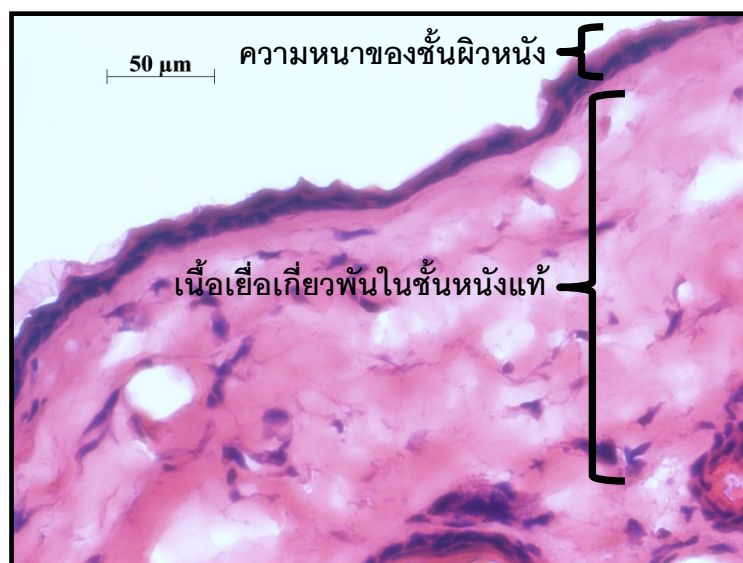
หลังจากการทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์ หนูเมาส์ถูกการุณยฆาตโดยการทำให้สลบด้วย pentobarbital 100 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักหนู จากนั้นทำการตัดผิวหนังบริเวณส่วนหลัง พื้นที่ประมาณ 3 ตารางเซนติเมตร มาเพื่อทำการ fix ใน pre-labeled base molds โดยใช้ Tissue-Tek freezing medium และใช้ microtome ตัดให้มีความหนา 8 ไมโครเมตร วางลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยโพลี-แอล-ไลซีน จากนั้นขึ้นเนื้อถูกย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin (H&E) เพื่อดูลักษณะโครงสร้างและความหนาของ epidermis เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ความหนา epidermis ของผิวหนังหนูเมาส์ และจุลกายวิภาคศาสตร์แสดงดังรูปที่ 15-20 จากกราฟที่แสดง บ่งบอกว่ารังสียูวีบีส่งผลทำให้ผิวหนังของหนูเมาส์หนาขึ้นเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มปกติ คือกลุ่มที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี (Normal group, 20.17 ± 3.00 ไมโครเมตร) และกลุ่มที่ได้รับรังสียูวีบี ร่วมกับการกินน้ำเปล่า (Control group, 27.95 ± 3.85 ไมโครเมตร) อย่างมีนัยสำคัญ และการได้รับกล้วยไข่ (21.59 ± 2.04 ไมโครเมตร) หรือวิตามินซี (19.01 ± 1.66 ไมโครเมตร) มีผลในการลดความหนาของผิวหนังหนูอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่า ส่วนการได้รับกล้วยน้ำว้า (26.37 ± 2.94 ไมโครเมตร) นั้น มีผล

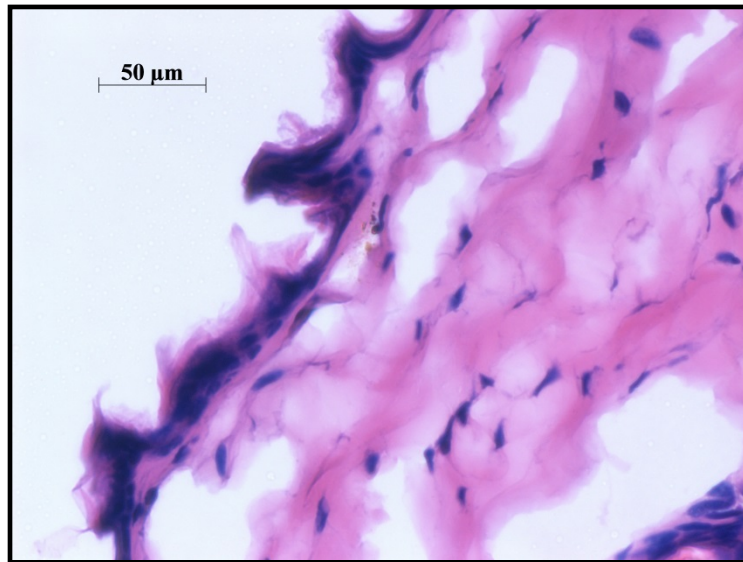
ในการลดความหนาของผิวหนังเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่าเพียงอย่างเดียว



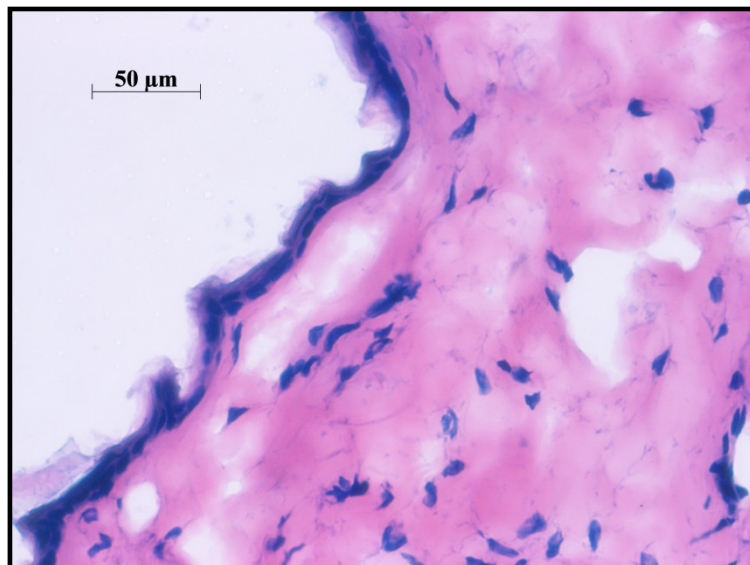
รูปที่ 15 ผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซี ต่อความหนาของผิวหนังหนู เมื่อ Normal group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, Control group คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, Positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน , test group คือได้รับแสงยูวีบี และกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าบดปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน กราฟแท่งแสดงความหนาของผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี (N=5) (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ Student's *t*-test)



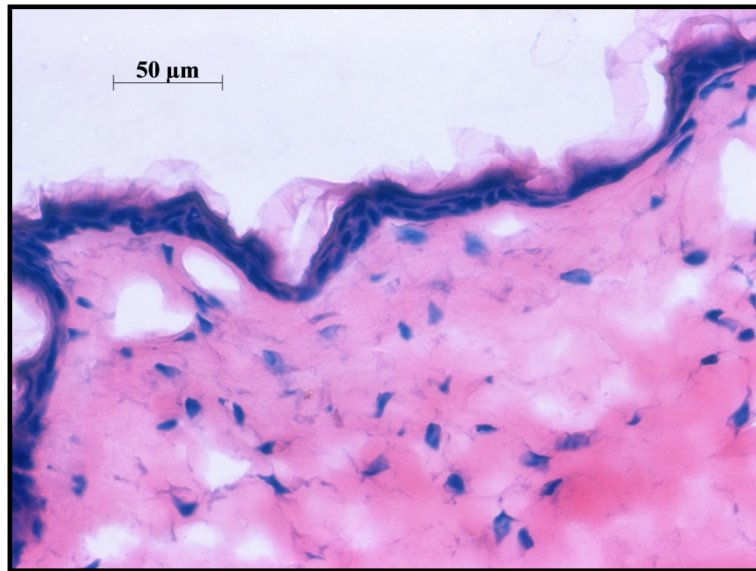
รูปที่ 16 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มปกติ (Normal group) ซึ่งไม่ได้รับแสงยูวีบี ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



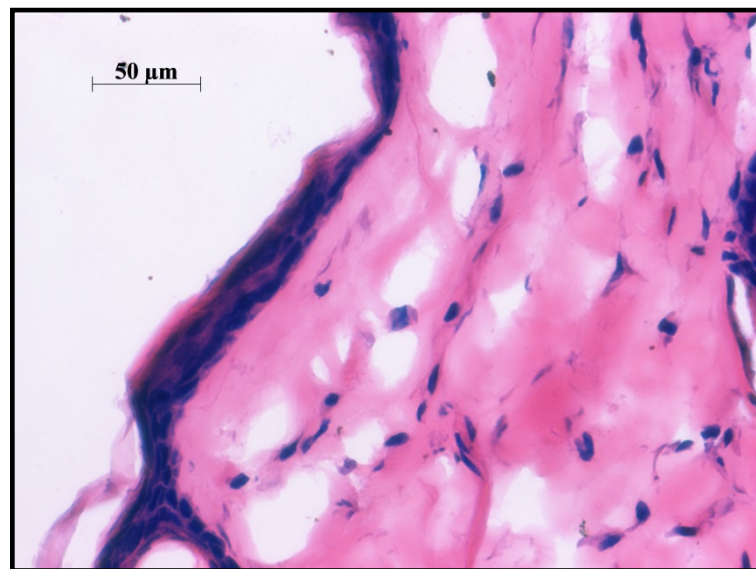
รูปที่ 17 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ที่ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินน้ำเปล่า (negative control) ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 18 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวัน (Positive control) ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 19 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยไข่บดปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน (Test group) ควบตาม ระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

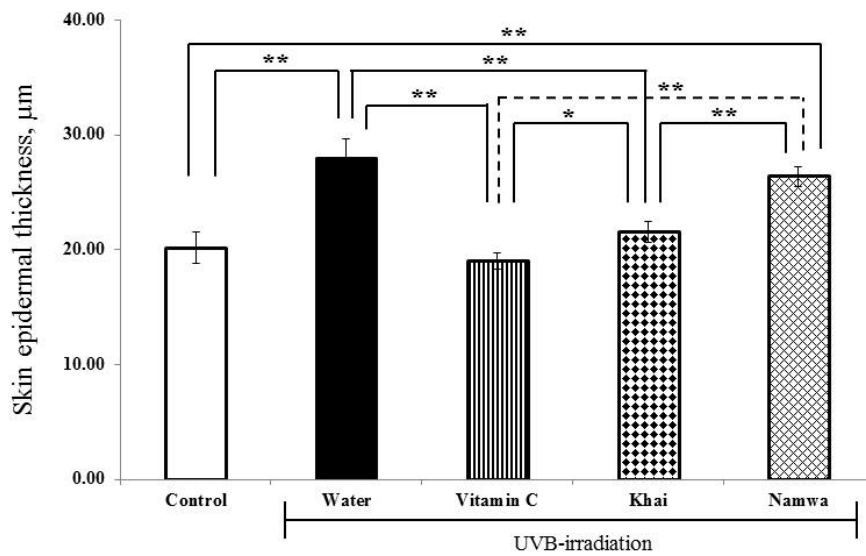


รูปที่ 20 แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาค (histology) ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยน้ำว้าบดปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน (Test group) ควบตาม ระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

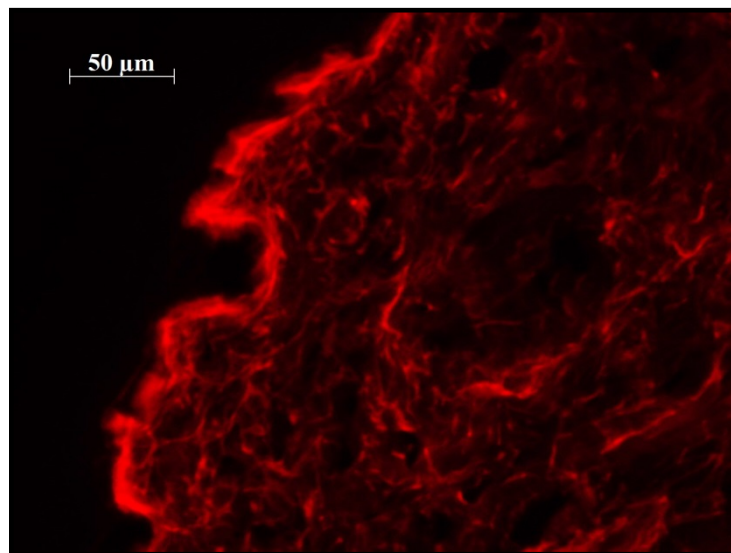
2.7 การศึกษาผลผลิตจากกระบวนการลิพิดเพอร็อกซิเดชันโดยวิธี Immunofluorescence

การศึกษาผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซีที่ร่วมกับการฉายรังสียูวีบีต่อกระบวนการลิพิดเพอร็อกซิเดชันถูกวิเคราะห์โดยวิธี Immunofluorescence staining เพื่อตรวจปริมาณโปรตีนที่ถูกจับโดยหมู่อัลดีไฮด์ (Malondialdehyde และ 4-Hydroxynonenal) และสอบหาตำแหน่งโปรตีนที่ถูกจับโดยหมู่อัลดีไฮด์ ในผิวหนังของหนูทดลอง โดยการวิเคราะห์นี้ถูกปฏิบัติที่อุณหภูมิห้อง โดยในขั้นแรกนำชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ถูกตัดเพื่อศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์วางบนสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยโพลี-แอล-ไลซีน เพื่อป้องกันชิ้นเนื้อหลุดระหว่างปฏิบัติการ จากนั้นสไลด์ที่มีชิ้นขนาดความหนา 8 ไมครอนถูก Fix โดยแช่ใน Methanol (ที่ถูกทำให้เย็นใน -20 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที) นาน 30 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วย PBS และ cover wash buffer (Tris buffer saline (TBS) with 0.025% Triton X-100) 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ขึ้นเนื้อถูก permeabilization โดยการบ่มด้วย TBS ที่มี 0.2% Triton X-100 ผสมอยู่ 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที หลังจากนั้นขึ้นเนื้อถูกป้องกันการย้อมที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific staining) โดยใช้ blocking buffer (TBS with 10% bovine serum albumine (BSA)) บ่มเป็นเวลา 30 นาทีในกล่องขึ้น หลังจากนั้นทำการกำจัด blocking buffer โดยการเททิ้ง และไม่ต้องผ่านการล้าง ขึ้นเนื้อถูกบ่มใน unconjugated primary Malondialdehyde antibody หรือ 4-hydroxynonenal antibody ในอัตราส่วน 1:100 dilution buffer (TBS with 1% BSA) และบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในที่มืดในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 4°C แล้วล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง ทำการย้อม secondary antibody ด้วย Cyanine Dyes (Cy5) หรือ Fluorescein isothiocyanate (FITC) ในอัตราส่วน 1:200 dilution buffer และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืดในกล่องขึ้น แล้วสังเกตสไลด์ที่เตรียมภายใต้กล้อง fluorescence microscope โดย Cy5 จะถูกกระตุ้นภายใต้แสงสีแดง (650 นาโนเมตร) ดังนั้นจึงเห็นเป็นสีแดง (670 นาโนเมตร) และ FITC จะถูกกระตุ้นภายใต้แสงสีเขียว (495 นาโนเมตร) ดังนั้นจึงเห็นเป็นสีเขียว (519 นาโนเมตร)

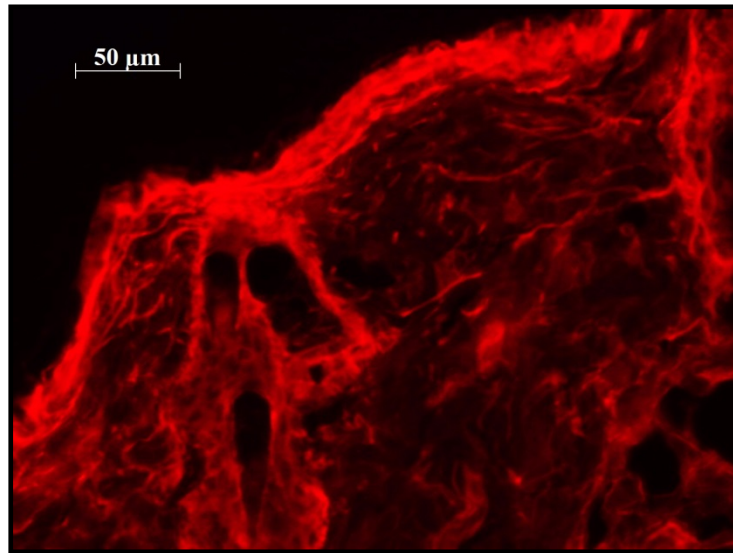
รูปภาพที่ได้ภายใต้กล้อง fluorescence microscope ถูกวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ รูปภาพถูกวิเคราะห์ความเข้มของแสง fluorescence (ค่า intensity) ด้วยโปรแกรม Image J จากการศึกษารายละเอียดและการกระจายตัวของ MDA และ 4-HNE ในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนู แสดงดังรูป 22-32 พบว่า หนูกลุ่มที่กินกล้วยไข่ หรือวิตามินซี มีปริมาณและการกระจายตัวของ MDA และ 4-HNE ใกล้เคียงกับกลุ่มปกติซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับยูวีบี สังเกตได้จากจุดที่เรืองแสงสีเขียว หรือ สีแดงที่กระจายอยู่ทั่วตัวอย่างชิ้นเนื้อ ส่วนหนูในกลุ่มที่ได้กินน้ำเปล่าหรือกล้วยน้ำว้ามีปริมาณและการกระจายตัวของ MDA และ 4-HNE สูงกว่ากลุ่มปกติ และสูงกว่ากลุ่มที่กินกล้วยไข่หรือวิตามินซี ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของโปรตีนคาร์บอนิลที่เกิดขึ้น



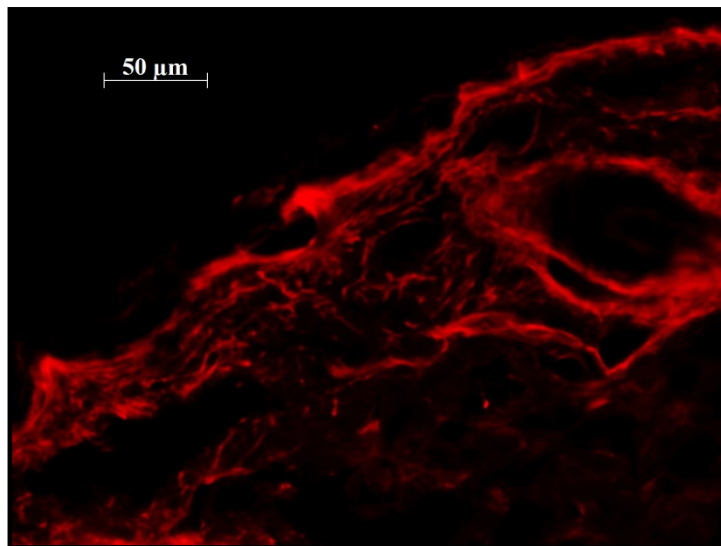
รูปที่ 21 ผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซี ต่อปริมาณ MDA ในผิวหนังหนู เมื่อ Normal group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, Control group คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, Positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน , test group คือได้รับแสงยูวีบี และกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าบดปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน กราฟแท่งแสดงความหนาของผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี (N=5) (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ Student's *t*-test)



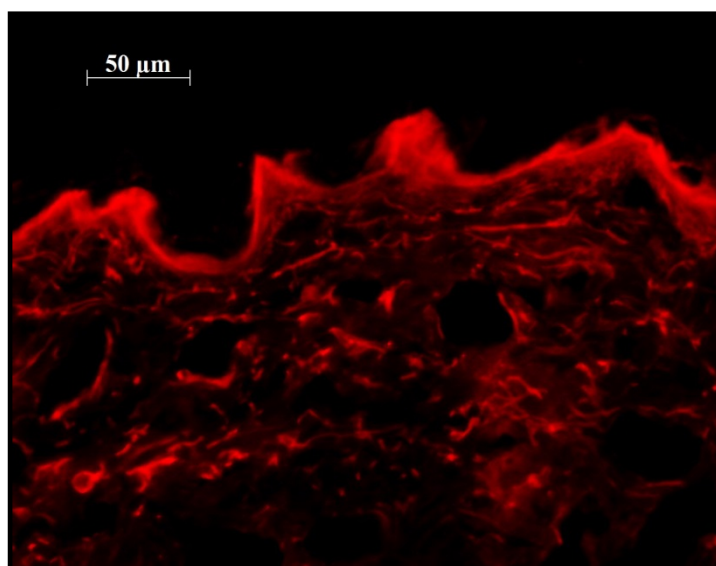
รูปที่ 22 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ MDA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มปกติ (Normal group) ซึ่งไม่ได้รับแสงยูวีบี ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



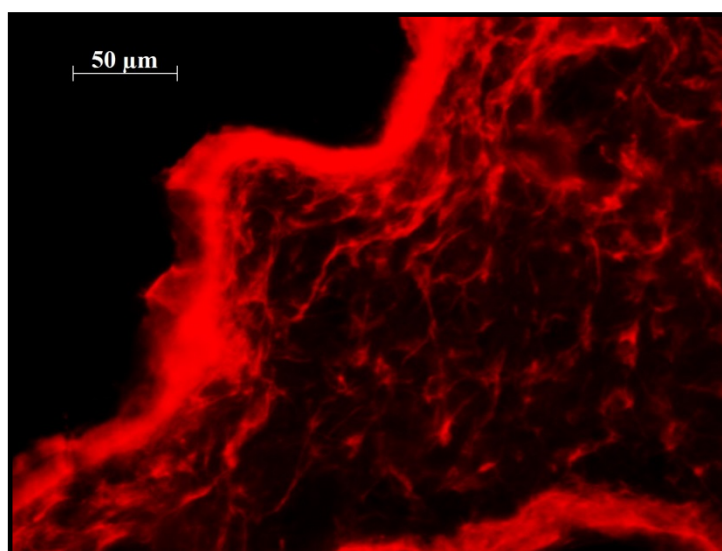
รูปที่ 23 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ MDA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุม (Control group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินน้ำเปล่า ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



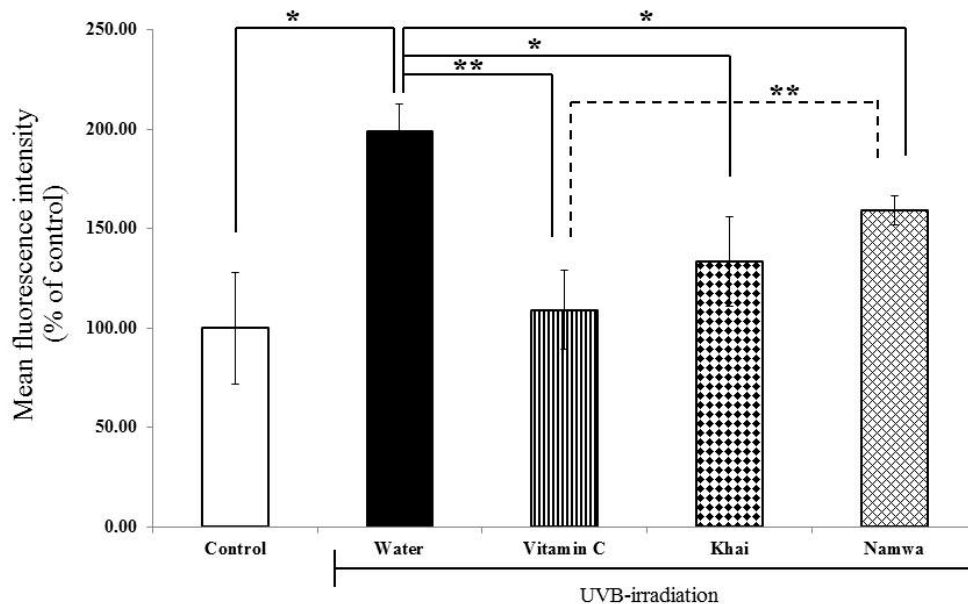
รูปที่ 24 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ MDA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุม (Positive control group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินวิตามินซี ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



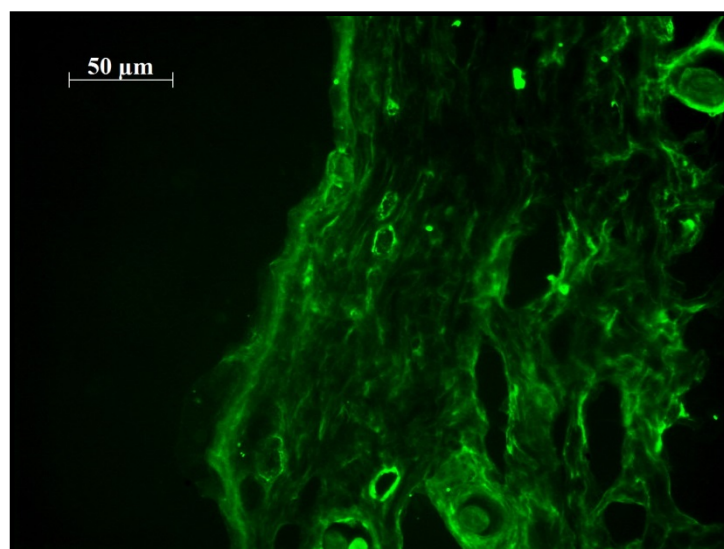
รูปที่ 25 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ MDA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยไซบด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



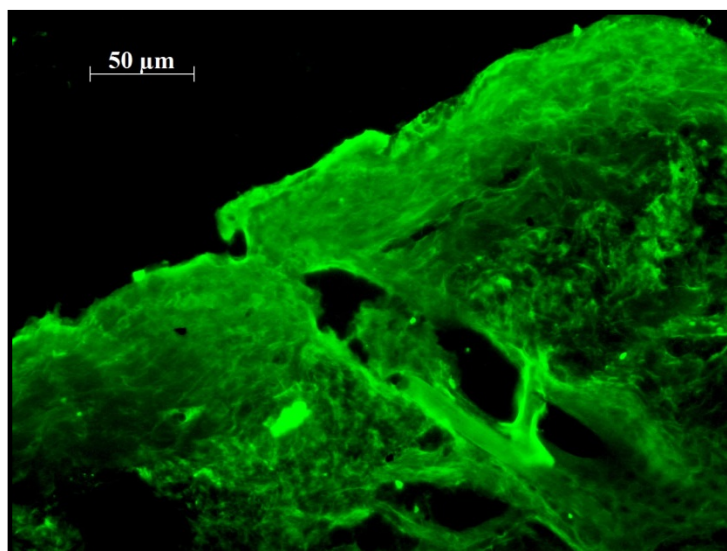
รูปที่ 26 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ MDA ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยน้ำว้าบด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



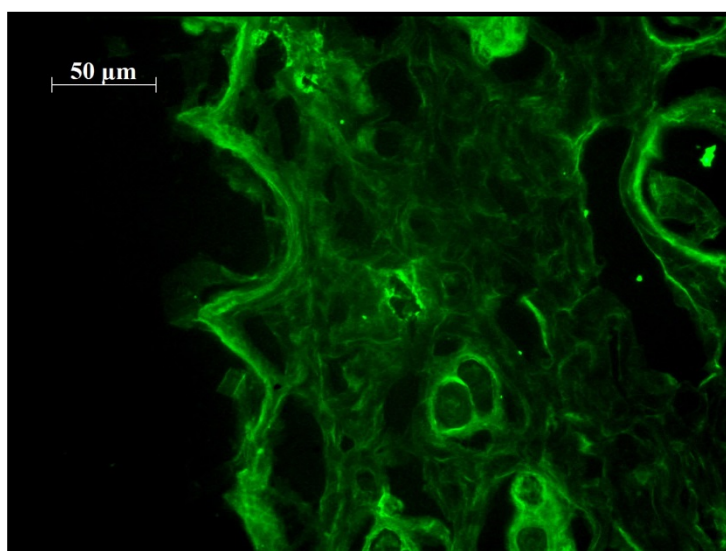
รูปที่ 27 ผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซี ต่อปริมาณ 4-HNE ในผิวหนังหนู เมื่อ Normal group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, Control group คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, Positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน , test group คือได้รับแสงยูวีบี และกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าบดปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน กราฟแท่งแสดงความหนาของผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี (N=5) (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ Student's *t*-test)



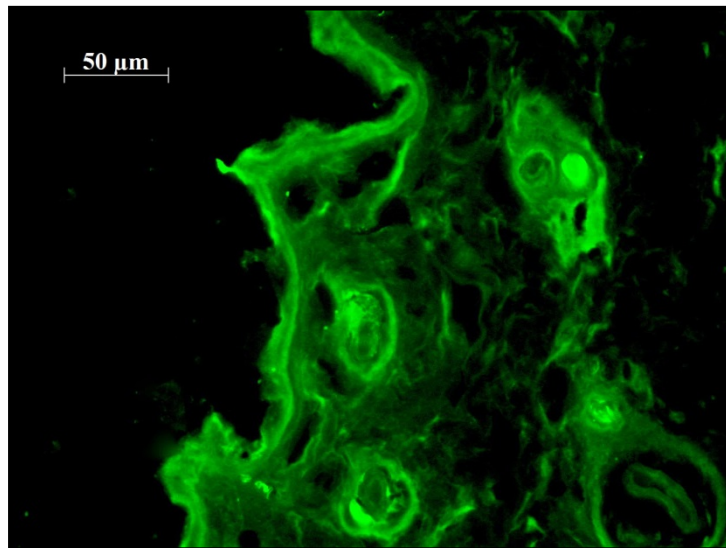
รูปที่ 28 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ 4-HNE ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มปกติ (Normal group) ซึ่งไม่ได้รับแสงยูวีบี ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



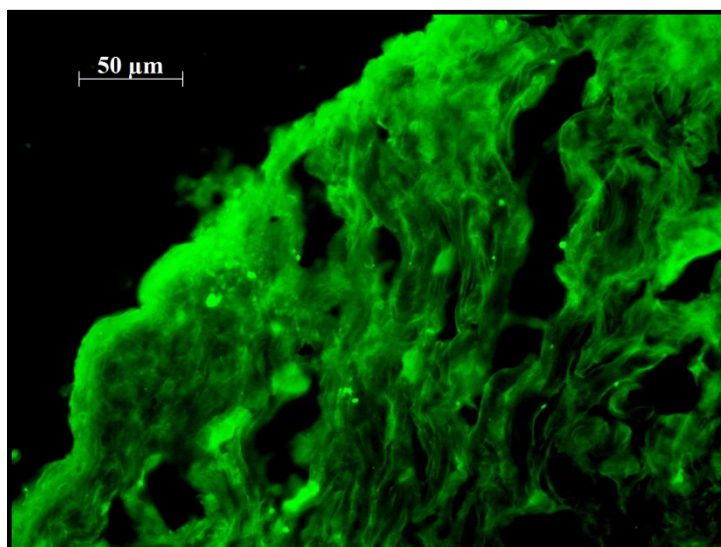
รูปที่ 29 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ 4-HNE ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุม (Control group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินน้ำเปล่า ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 30 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ 4-HNE ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุม (Positive control group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินวิตามินซี ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 31 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ 4-HNE ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยไต่บด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

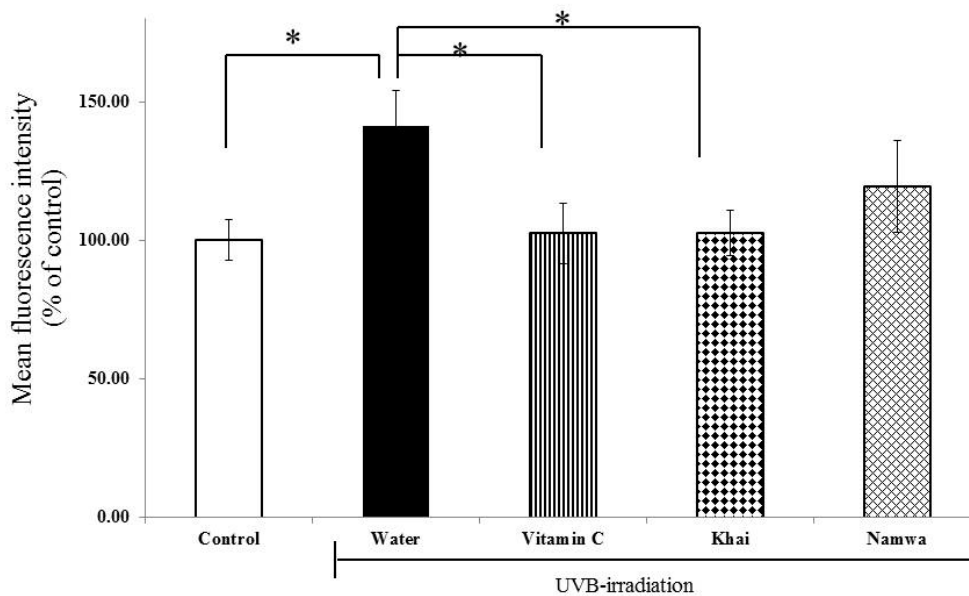


รูปที่ 32 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของ 4-HNE ของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยน้ำว้าบด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

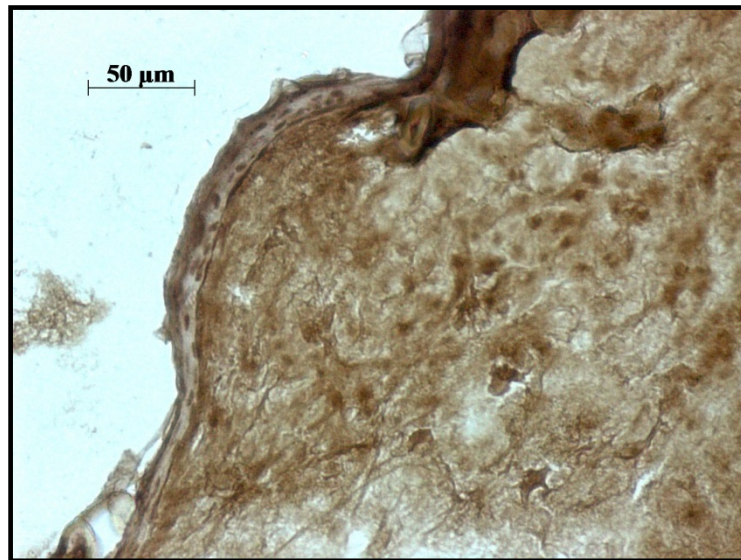
2.8 การศึกษาผลผลิตจากกระบวนการโปรตีนออกซิเดชันโดยวิธี Immunohistochemistry

การศึกษาผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซีร่วมกับการฉายรังสียูวีบีต่อกระบวนการผลิตหมู่คาร์บอนิลถูกวิเคราะห์โดยวิธี Immunohistochemistry เพื่อตรวจปริมาณโปรตีนที่ถูกจับโดยหมู่คาร์บอนิลและสอบหาตำแหน่งโปรตีนที่ถูกจับโดยหมู่คาร์บอนิลในผิวหนังของหนูทดลอง โดยการวิเคราะห์นี้ถูกปฏิบัติที่อุณหภูมิห้อง โดยในขั้นแรกนำชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ถูกตัดเพื่อศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์วางลงบนสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยโพลี-แอล-ไลซีน เพื่อป้องกันชิ้นเนื้อหลุดระหว่างปฏิบัติการ จากนั้น สไลด์ที่มีชิ้นขนาดความหนา 8 ไมครอนถูก Fix โดยแช่ใน Methacarn fixative [Methanol: Chloroform: Acetic acid 10:5:1] ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 4-6 ชั่วโมง หลังจากนั้นสไลด์ผ่านกระบวนการ Rehydrate โดยการจุ่มใน Ethanol และ น้ำกลั่น ตามลำดับ สไลด์ถูกล้างด้วย PBS และ 1X wash buffer 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ชิ้นเนื้อถูก permeabilization โดยการบ่มด้วย antigen unmasking โดยใช้ water bath ตั้งความร้อน 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หลังจากสไลด์เย็น เดิมสารละลาย DNPH บ่มต่อ 30 นาที ล้างสไลด์ด้วย 1X wash buffer 3 ครั้งๆ ละ 10 นาทีจึงป้องกันการย้อมที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific staining) โดยใช้ blocking buffer บ่มเป็นเวลา 30 นาทีในกล่องขึ้น เมื่อครบเวลาทำการเท blocking buffer ออกจากสไลด์ และไม่ต้องผ่านการล้าง ชิ้นเนื้อถูกบ่มใน unconjugated primary antibody ในอัตราส่วน 1:100 dilution buffer และบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในที่มืดในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 4°C แล้วล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง ทำการย้อม secondary antibody ด้วย biotinylated secondary antibody และบ่มเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืดในกล่องขึ้น หลังจากล้างด้วย wash buffer ชิ้นเนื้อถูกเติม 3 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ บ่มนาน 10 นาที ทำการล้างด้วย 1X wash buffer จากนั้นย้อมด้วย Streptavidin conjugated HRP บ่มในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลา ชิ้นเนื้อถูกล้าง และเติมสารตั้งต้น DAB เพื่อให้เกิดสีน้ำตาล เป็นเวลา 2-3 นาที ล้างและย้อมด้วย Hematoxylin นาน 3 นาที สไลด์ถูกล้างและ Dehydrate ด้วยการจุ่มใน Absolute ethanol และ Xylene ตามลำดับ สไลด์ถูกปิดด้วย cover slip แล้วสังเกตสไลด์ที่เตรียมภายใต้กล้อง inverted microscope โดยจะสังเกตเห็นสีของโปรตีนคาร์บอนิลเป็นสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งเป็นสีของ DAB

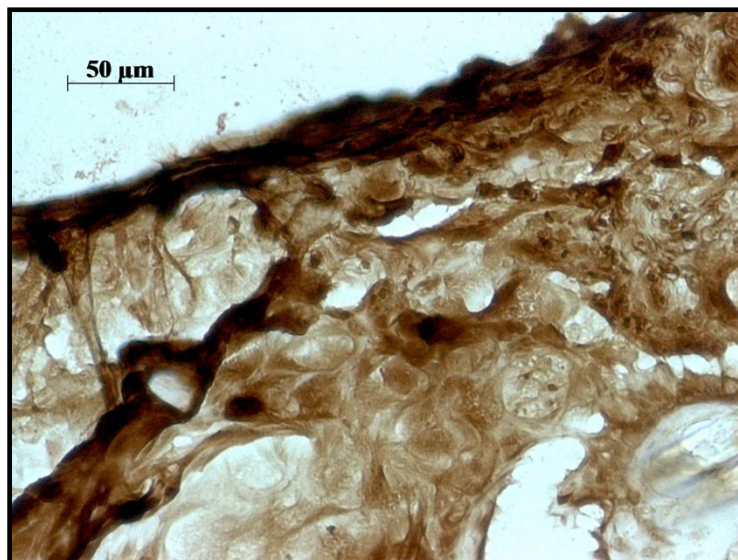
รูปภาพที่ได้ภายใต้กล้อง inverted microscope ถูกวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ รูปภาพถูกวิเคราะห์ความเข้มของสี DAB (ค่า intensity) ด้วยโปรแกรม Image J จากการศึกษารายละเอียดและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิล ในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูแสดงดังรูป 33-37 พบว่า หนูกลุ่มที่กินกล้วยไข่ หรือวิตามินซี มีปริมาณและการกระจายของโปรตีนคาร์บอนิลใกล้เคียงกับกลุ่มปกติซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับยูวีบี ส่วนหนูในกลุ่มที่ได้กินน้ำเปล่าหรือกล้วยน้ำว้ามีปริมาณและการกระจายตัวโปรตีนคาร์บอนิลสูงกว่ากลุ่มปกติ และสูงกว่ากลุ่มที่กินกล้วยไข่หรือวิตามินซีสังเกตได้จากสีน้ำตาลที่กระจายอยู่ทั่วตัวอย่างชิ้นเนื้อโดยเฉพาะในชั้น epidermis



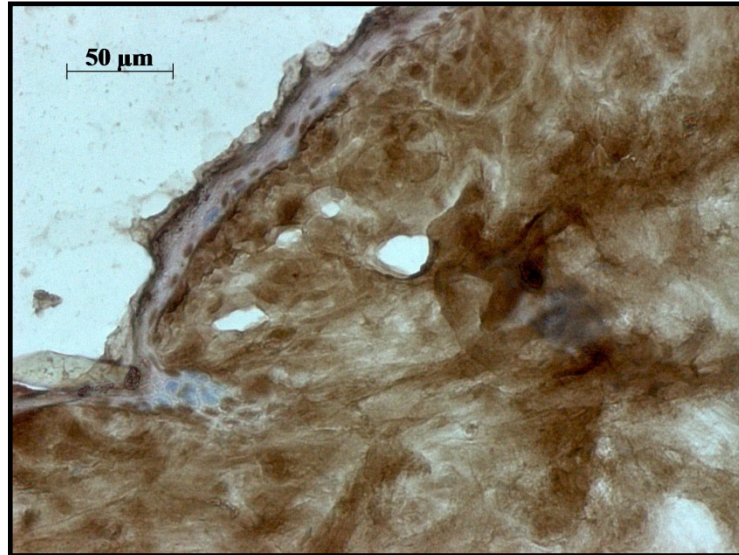
รูปที่ 33 ผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซี ต่อปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลในผิวหนังหนู เมื่อ Normal group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, Control group คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, Positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน , test group คือได้รับแสงยูวีบี และกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าบดปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน กราฟแท่งแสดงความหนาของผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี (N=5) (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ Student's *t*-test)



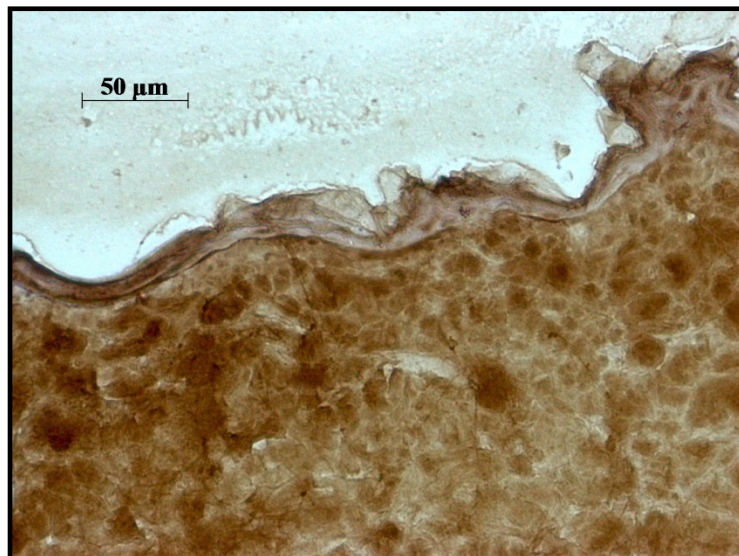
รูปที่ 34 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มปกติ (Normal group) ซึ่งไม่ได้รับแสงยูวีปี ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 35 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุม (Control group) ได้รับแสงยูวีปี ร่วมกับการกินน้ำเปล่า ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 36 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Positive control group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินวิตามินซี ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 37 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกลัยไซบด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน ควบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

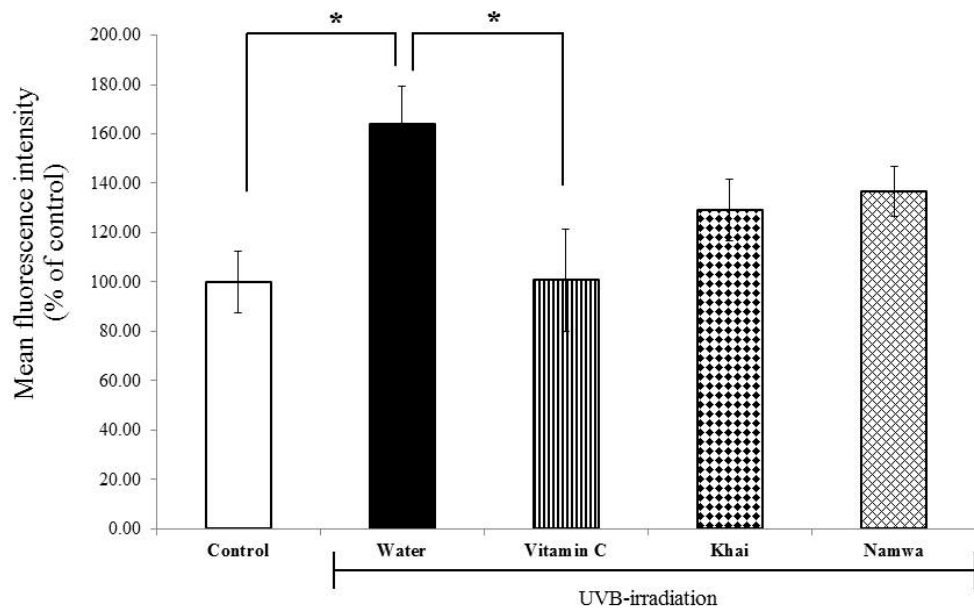


รูปที่ 38 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกลัยซีนน้ำว้าบด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

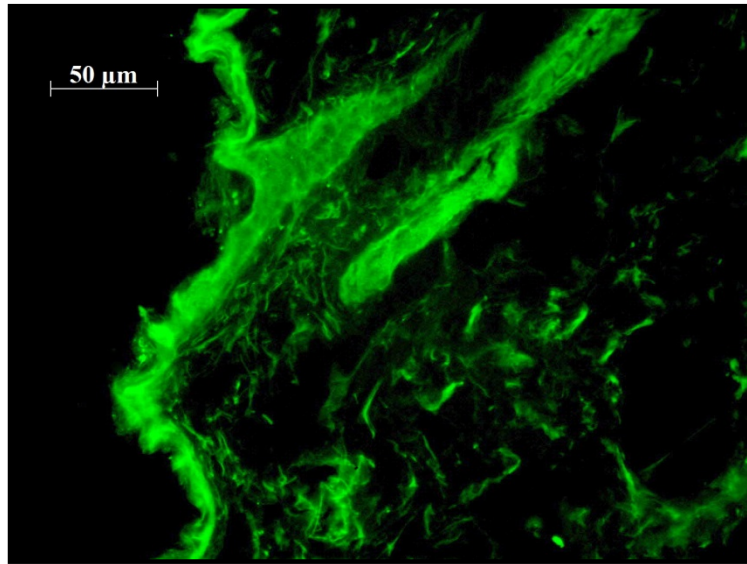
2.9 การศึกษาเอนไซม์ Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) ในผิวหนังที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสี UVB โดยวิธี Immunofluorescence staining

การศึกษาผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซีร่วมกับการฉายรังสียูวีบีต่อกระบวนการผลิต Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการทำละลายคอลลาเจนซึ่งพบมากในชั้นเดอร์มิสของผิวหนัง ถูกวิเคราะห์โดยวิธี Immunofluorescence staining เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ MMP-1 ในผิวหนังของหนูทดลอง โดยการวิเคราะห์นี้ถูกปฏิบัติที่อุณหภูมิห้อง โดยในขั้นแรกนำชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ถูกตัดเพื่อศึกษาจุลกายวิภาคศาสตร์วางบนสไลด์ที่ถูกเคลือบด้วยโพลี-แอล-ไลซีน เพื่อป้องกันชิ้นเนื้อหลุดระหว่างปฏิบัติการ จากนั้นสไลด์ที่มีชิ้นขนาดความหนา 8 ไมครอนถูก Fix โดยแช่ใน Methanol (ที่ถูกทำให้เย็นใน -20 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที) นาน 30 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วย PBS และ cover wash buffer (Tris buffer saline (TBS) with 0.025% Triton X-100) 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ชิ้นเนื้อถูก permeabilization โดยการบ่มด้วย TBS ที่มี 0.2% Triton X-100 ผสมอยู่ 2 ครั้งๆ 10 นาที หลังจากนั้นชิ้นเนื้อถูกป้องกันการย้อมที่ไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific staining) โดยใช้ blocking buffer (TBS with 10% bovine serum albumine (BSA)) บ่มเป็นเวลา 30 นาทีในกล่องขึ้น หลังจากนั้นทำการกำจัด blocking buffer โดยการเททิ้ง และไม่ต้องผ่านการล้าง ชิ้นเนื้อถูกบ่มใน unconjugated primary Matrix metalloproteinase-1 antibody ในอัตราส่วน 1:100 dilution buffer (TBS with 1%BSA) และบ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมงในที่มืดในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 4°C แล้วล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง ทำการย้อม secondary antibody ด้วย Fluorescein isothiocyanate (FITC) ในอัตราส่วน 1:200 dilution buffer (TBS with 1%BSA) และบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในที่มืดในกล่องขึ้น แล้วสังเกตสไลด์ที่เตรียมภายใต้กล้อง fluorescence microscope โดย FITC จะถูกกระตุ้นภายใต้แสงสีเขียว (495 นาโนเมตร) ดังนั้นจึงเห็นเป็นสีเขียว (519 นาโนเมตร)

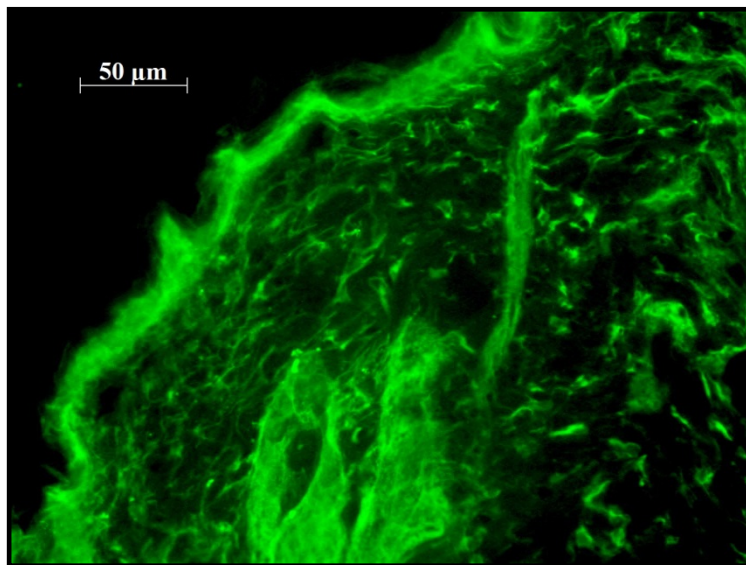
รูปภาพที่ได้ภายใต้กล้อง fluorescence microscope ถูกวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ รูปภาพถูกวิเคราะห์ความเข้มของแสง fluorescence (ค่า intensity) ด้วยโปรแกรม Image J จากการศึกษารายละเอียดและการกระจายตัวของ MMP-1 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูแสดงดังรูป 39-44 พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ถูกฉายด้วย UVB และได้รับน้ำเปล่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกฉายด้วย UVB ในทางตรงกันข้าม หนูที่ถูกฉายด้วย UVB ร่วมกับการได้รับวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวัน มีปริมาณ MMP-1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้หนูทดลองที่ได้รับกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าสด ปริมาณ MMP-1 ก็มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่า การศึกษาในครั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาครั้งก่อนหน้า หนูทดลองที่ได้รับวิตามินซีและกล้วยไข่มีการถูกทำลายของคอลลาเจนน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับเพียงน้ำเปล่า



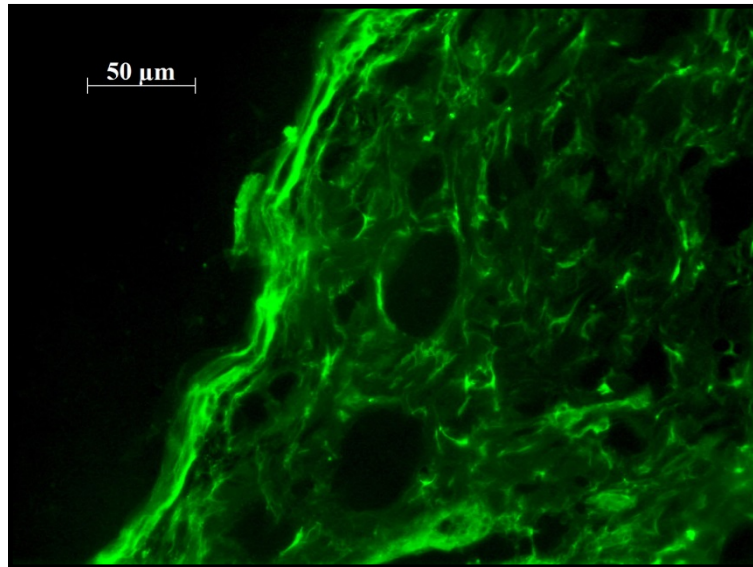
รูปที่ 39 ผลของการกินกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซี ต่อปริมาณ MMP-1 ในผิวหนังหนู เมื่อ Normal group คือไม่ได้รับแสงยูวีบี, Control group คือได้รับแสงยูวีบีและน้ำเปล่า, Positive control คือได้รับแสงยูวีบี และวิตามินซีเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน , test group คือได้รับแสงยูวีบี และ กล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าบดปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน กราฟแท่งแสดงปริมาณของ MMP-1 ในผิวหนังหนูที่ได้รับแสงยูวีบี (N=5) (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.005$ Student's *t*-test)



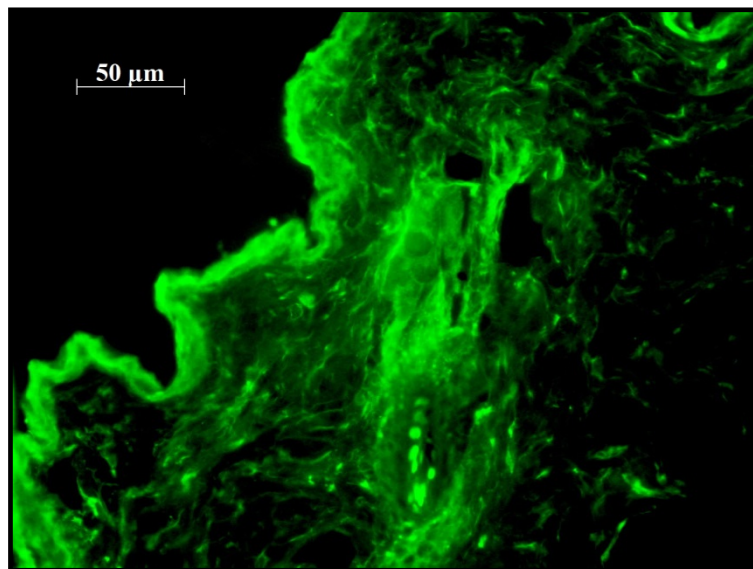
รูปที่ 40 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มปกติ (Normal group) ซึ่งไม่ได้รับแสงยูวีบี ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



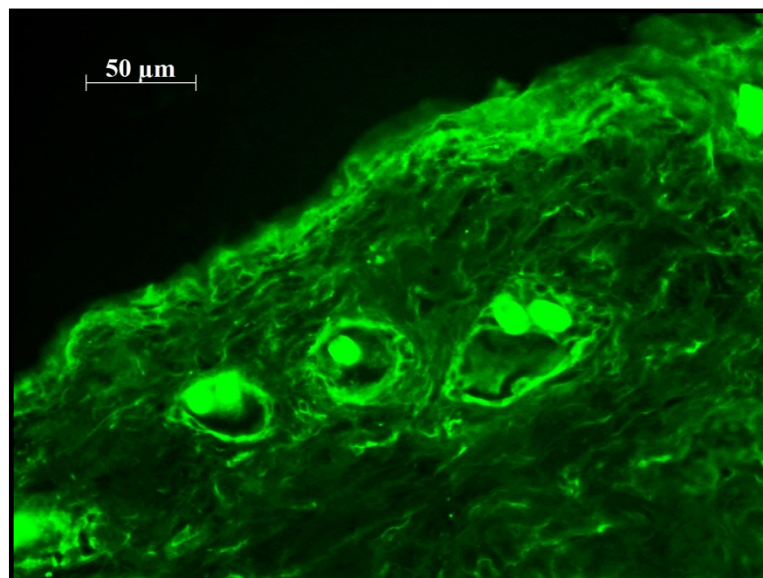
รูปที่ 41 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุม (Control group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินน้ำเปล่า ครอบคลุมระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 42 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Positive control group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินวิตามินซี ปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อวัน ครอบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400



รูปที่ 43 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยไข่สด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน ครอบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 44 แสดงปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีนคาร์บอนิลของตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเมาส์ในกลุ่มทดลอง (Test group) ได้รับแสงยูวีบี ร่วมกับการกินกล้วยน้ำว้าบด ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักต่อวัน ครบตามระยะเวลา 12 สัปดาห์เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

2.10 การหาปริมาณกลูต้าไธโอนในผิวหนังสัตว์ทดลอง

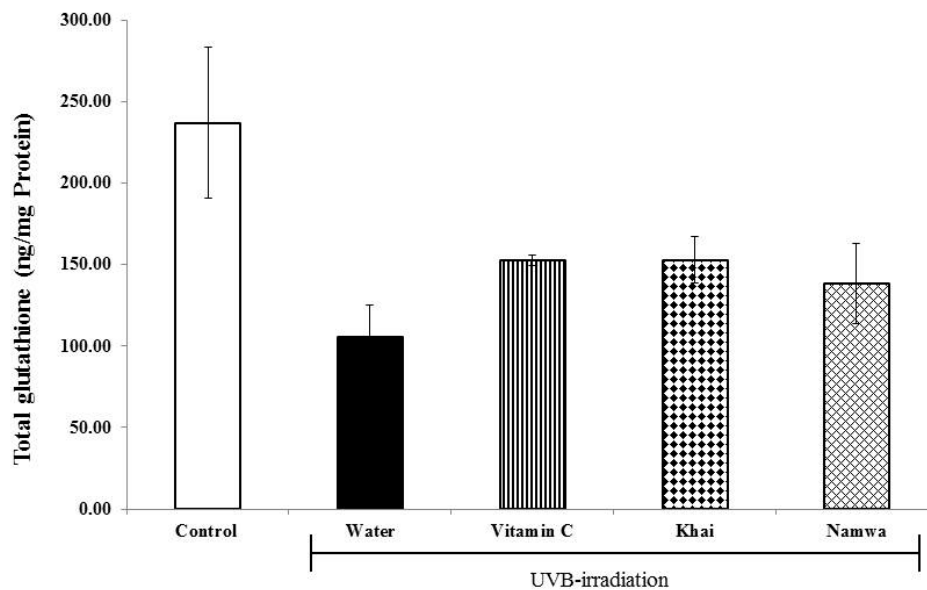
ปริมาณของกลูต้าไธโอนที่ผลิตขึ้นในผิวหนังหนูเม้าส์ที่ได้รับกล้วยไข่, กล้วยน้ำว้าবাদหรือ วิตามินซี ร่วมกับการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง ถูกวัดโดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณกลูต้าไธโอนของบริษัท Abcam ประเทศอังกฤษ

การวัดปริมาณกลูต้าไธโอนในผิวหนังหนูมีวิธีการดังนี้

1. การสกัดโปรตีนทั้งหมดจากผิวหนังหนูเม้าส์ ผิวหนังหนูเม้าส์ปริมาณ 100 มิลลิกรัมถูกล้างด้วย PBS และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนที่จะสกัดโปรตีนด้วย T-per น้ำยาสกัดโปรตีนจากผิวหนังปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเซลล์ถูกทำให้แตกด้วยเครื่อง Homogenizer ชั้นโปรตีนถูกแยกด้วยวิธี centrifugation ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที ชั้นโปรตีนถูกแยกใส่ eppendorf ใหม่เพื่อทำการวัดปริมาณกลูต้าไธโอน
2. ทำการทดลองตามคำแนะนำของชุดทดสอบโดยการเตรียมสารมาตรฐานกลูต้าไธโอนความเข้มข้น 0 μ M ถึง 5 μ M
3. เตรียม Thiol green indicator ความเข้มข้น 25 เท่า จาก 100 เท่า เพื่อเป็นตัวติดตามที่จำเพาะต่อกลูต้าไธโอน
4. หยอดตัวอย่าง, สารมาตรฐานกลูต้าไธโอน หรือน้ำยาสกัดโปรตีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงใน หลุม 96-well plate (Black plate clear bottom) จากนั้นหยอด Thiol green indicator ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทดลองที่มีตัวอย่าง บ่มให้พื้นแสงเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดแสง ฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่องไมโครเพลทฟลูออเรสเซนซ์ วิเคราะห์ปริมาณกลูต้าไธโอนในผิวหนังหนูเม้าส์ เทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูต้าไธโอน

ผลของการกินกล้วยไข่, กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซีอย่างต่อเนื่องร่วมกับการได้รับรังสียูวีบี ต่อ ปริมาณของกลูต้าไธโอนแสดงดังรูปที่ 45 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าหนูเม้าส์ที่ถูกฉายรังสียูวีบี ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ส่งผลให้ปริมาณกลูต้าไธโอน ซึ่งเป็น Antioxidant ภายในร่างกาย ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี แต่อย่างไรก็ตาม หนูเม้าส์ที่ได้รับกล้วยไข่ หรือ วิตามินซียังคงมีปริมาณกลูต้าไธโอนที่สูงกว่าหนูเม้าส์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งถูกฉายด้วยรังสียูวีบี ร่วมกับได้รับน้ำเปล่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า หนูเม้าส์ที่ได้รับกล้วยไข่มีการผลิตเอนไซม์ γ -GCS มาก จึงส่งผลให้ปริมาณกลูต้าไธโอนสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในทางตรงกันข้ามถึงแม้ว่าหนูเม้าส์ที่ได้รับวิตามินซีจะมีปริมาณเอนไซม์ γ -GCS น้อย แต่ปริมาณกลูต้าไธโอนยังคงสูงเทียบเท่ากับ

ไข่ อาจเนื่องมาจากร่างกายจะใช้วิตามินซีในการกำจัดอนุมูลอิสระ จึงทำให้ปริมาณกลูต้าไธโอนลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น



รูปที่ 45 ปริมาณกลูต้าไธโอนในผิวหนังหนูที่ได้รับกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซีร่วมกับการฉายรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง กลุ่มปกติ (Normal) คือหนูเมาส์ที่ไม่ได้รับรังสียูวีบี, ข) กลุ่ม control คือหนูเมาส์ที่ได้รับรังสียูวีบีพร้อมกับการกินน้ำเปล่า, ค) กลุ่ม positive control คือหนูเมาส์ที่ได้รับรังสียูวีบีและวิตามินซีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน, ง,จ) คือหนูเมาส์ที่ได้รับรังสียูวีบีพร้อมกับการกินกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้า 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักหนูต่อวัน กราฟแสดงปริมาณกลูต้าไธโอนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารกลูต้าไธโอน

2.11 ผลของการกินกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าต่อการแสดงออกของเอนไซม์ γ -GCS ระหว่างการได้รับรังสียูวีบี

ปริมาณของเอนไซม์ γ -GCS ในผิวหนังหนูที่กินกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้าร่วมกับการได้รับรังสียูวีบีเป็นเวลา 12 สัปดาห์

ปริมาณเอนไซม์ γ -GCS ที่ผลิตขึ้นในผิวหนังหนูเมาส์ที่ได้รับกล้วยไข่และกล้วยน้ำว้าบดร่วมกับการได้รับรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่อง สามารถวัดในเชิงเปรียบเทียบได้โดยใช้เทคนิค Western blot

การหาปริมาณเอนไซม์ γ -GCS โดยใช้ Western blot มีขั้นตอนดังนี้

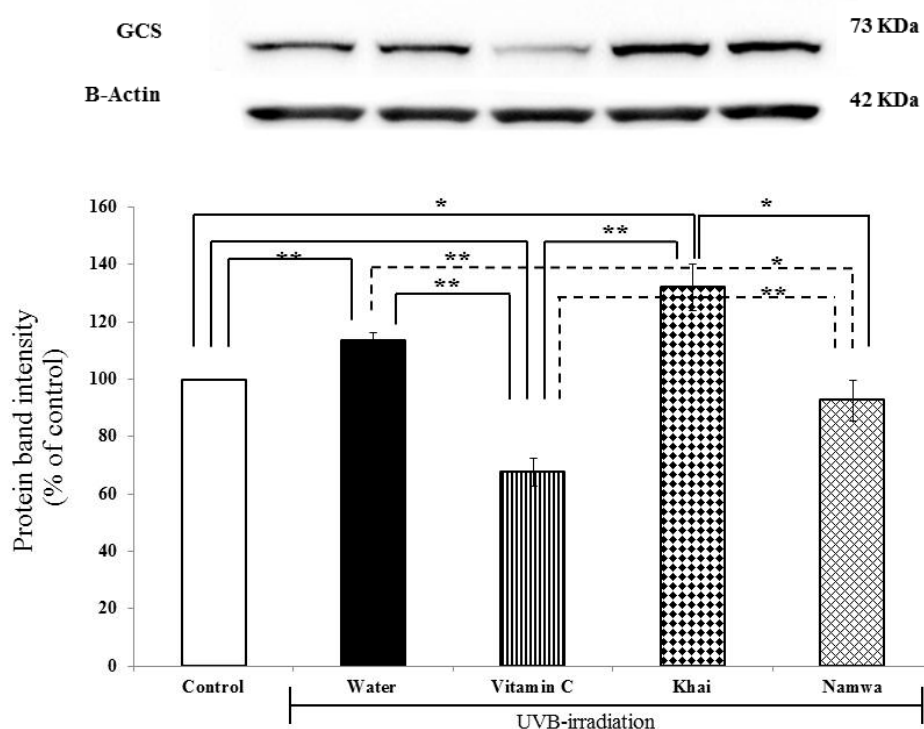
1. หลังจากครบ 12 สัปดาห์ของการศึกษา ผิวหนังหนูเมาส์บริเวณที่ถูกโกนขนถูกเก็บใน Cryotube และแช่ในถังลิกวิดไนโตรเจน

2. ผิวหนังหนูเมาส์ปริมาณ 100 มิลลิกรัมถูกล้างด้วย PBS และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ก่อนที่จะสกัดโปรตีนด้วย T-per น้ำยาสกัดโปรตีนจากผิวหนังปริมาตร 1 มิลลิตร และเซลล์ถูกทำให้แตกด้วยเครื่อง Homogenizer ชิ้นโปรตีนถูกแยกด้วยวิธี centrifugation ที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที ชิ้นโปรตีนถูกแยกใส่ eppendorf ใหม่เพื่อทำการวัดปริมาณเอนไซม์ γ -GCS

3. ทำการวัดปริมาณเอนไซม์ γ -GCS โดยใช้เทคนิค Western blot โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis ซึ่งใช้แยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลโดยที่ทำการควบคุมปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ให้เท่ากันในแต่ละครั้งของการแยก (50 ไมโครกรัม) ต่อมาโปรตีนจะถูก transfer ไปยัง nitrocellulose membrane แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการโดย primary antibody ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ γ -GCS และใช้ secondary antibody ที่มีความจำเพาะต่อ primary antibody เพื่อความจำเพาะและถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มของ band โปรตีนเอนไซม์ γ -GCS ด้วยวิธี chemiluminescent detection โปรตีน β -actin ถูกใช้เป็น Loading control

ผลของการกินกล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้าอย่างต่อเนื่องร่วมกับการได้รับรังสียูวีบี ต่อปริมาณเอนไซม์ γ -GCS แสดงดังรูปที่ 46 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าหนูเมาส์ที่กินกล้วยไข่ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีการผลิตเอนไซม์ γ -GCS เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุมและหนูเมาส์ในกลุ่มที่กินกล้วยน้ำว้าหรือวิตามินซี ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ในกล้วยไข่มีสารโพลีฟีนอลและเบต้าแคโรทีนสูงกว่ากล้วยน้ำว้า เนื่องจากสารกลุ่มดังกล่าวอาจจะมีความสามารถในการกระตุ้นให้เอนไซม์ γ -GCS มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น

ส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์ γ -GCS เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตปริมาณเอนไซม์ γ -GCS ในหนูเม้าส์กลุ่มควบคุมก็มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยซึ่งเป็นกลไกปกติของร่างกายที่ต้องผลิตเอนไซม์ γ -GCS เพื่อมาสังเคราะห์กลูต้าไธโอนเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระ แต่เนื่องจากเอนไซม์ γ -GCS เป็น rate limiting step เอนไซม์ จึงมีความสามารถในการผลิตออกมาได้อย่างจำกัด ในทางกลับกัน หนูเม้าส์ที่ได้รับวิตามินซีพบว่า ปริมาณของเอนไซม์ γ -GCS ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นไปได้ว่า เมื่อได้รับวิตามินซีอย่างเพียงพอและต่อเนื่องแล้ว ร่างกายก็ไม่จำเป็นต้องผลิตเอนไซม์ γ -GCS ออกมาเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดจากการได้รับรังสียูวี



รูปที่ 46 ปริมาณเอนไซม์ γ -GCS ในผิวหนังหนูที่ได้รับกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซีร่วมกับการฉายรังสียูวีอย่างต่อเนื่อง กลุ่มปกติ (Normal) คือหนูเม้าส์ที่ไม่ได้รับรังสียูวี, ข) กลุ่ม control คือหนูเม้าส์ที่ได้รับรังสียูวีร่วมกับการกินน้ำเปล่า, ค) กลุ่ม positive control คือหนูเม้าส์ที่ได้รับรังสียูวีและวิตามินซีความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อวัน, ง,จ) คือหนูเม้าส์ที่ได้รับรังสียูวีร่วมกับการกินกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้า 1 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักหนูต่อวัน กราฟแสดงปริมาณเอนไซม์ γ -GCS โดยปรับให้ค่าความเข้มของ band โปรตีนที่วัดได้จากหนูเม้าส์ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

สรุปผลการทดลองและอภิปรายผล

ปริมาณฟีนอลิกรวมในผลกล้วยสุก กล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้าโดยเฉลี่ยเท่ากับ 38.39 ± 1.39 และ 30.05 ± 0.5 มิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมกล้วยสดตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้ได้สกัดเบต้าแคโรทีน ซึ่งลักษณะของสารสกัดที่ได้มีสีเหลืองส้ม และวัดปริมาณเบต้าแคโรทีนที่สกัดได้ในกล้วยไข่เท่ากับ 56.57 ± 3.39 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัด แต่ไม่สามารถวัดได้ในกล้วยน้ำว้า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่าเบต้าแคโรทีนในกล้วยไข่สูงกว่าในกล้วยน้ำว้า[18] ความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระของกล้วย สารสกัดจากกล้วยทั้งสองชนิดที่สกัดโดย 50% เอทานอล ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เทียบกับวิตามินซี ผลที่ได้พบว่า วิตามินซี กล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้า มีความเข้มข้นสมมูลที่ทำให้เกิดประสิทธิภาพในการต้านการเกิดออกซิเดชัน โดย free radical scavenging เท่ากับร้อยละ 50 ของประสิทธิภาพสูงสุด เท่ากับ 0.013 ± 3.430 , 0.391 ± 0.130 และ 1.368 ± 0.130 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมา[7] จากนั้นจึงศึกษาผลของการป้องกันผิวหนังถูกทำลายจากรังสียูวีบีโดยการกินกล้วยทั้งสองชนิดอย่างต่อเนื่องในสัตว์ทดลอง

จากผลการศึกษาความหนาของผิวหนังชั้นอีพิเดอร์มิสของหนูเม้าส์ทั้ง 5 กลุ่มพบว่า หนูกลุ่มควบคุม (ไม่ถูกฉายรังสียูวีบี) มีความหนาของชั้นอีพิเดอร์มิสเฉลี่ยเท่ากับ 20.17 ± 3.00 ไมโครเมตร ในทางตรงกันข้ามหนูเม้าส์กลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่าร่วมกับการฉายยูวีบีนาน 12 สัปดาห์ มีความหนาของชั้นอีพิเดอร์มิสเท่ากับ 27.95 ± 3.85 ไมโครเมตร ซึ่งหนาขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หนูเม้าส์ที่ถูกป้องกันกล้วยวิตามินซี 50 มิลลิกรัมต่อวันและกล้วยไข่ร่วมกับการฉายรังสียูวีบีนาน 12 สัปดาห์ พบว่าความหนาของชั้นอีพิเดอร์มิสเท่ากับ 19.01 ± 1.66 และ 21.59 ± 2.04 ไมโครเมตร ตามลำดับ ส่วนหนูเม้าส์ที่ได้รับกล้วยน้ำว้าร่วมกับการฉายด้วยรังสียูวีบีนาน 12 สัปดาห์ มีความหนาของชั้นอีพิเดอร์มิสเท่ากับ 26.37 ± 1.94 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าผิวหนังชั้นเดอร์มิส (ชั้นหนังแท้) ของหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่าและกลุ่มที่ได้รับกล้วยน้ำว้าร่วมกับการฉายรังสียูวีบีมีการถูกทำลาย ซึ่งรวมไปถึงคอลลาเจนและอีลาสตินด้วย แต่การถูกทำลายในชั้นเดอร์มิสพบได้น้อยในกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีหรือกล้วยไข่ การถูกฉายด้วยยูวีบีซ้ำๆ จะกระตุ้นให้เซลล์ผิวหนังหลั่งสารเรติเคิล และกระตุ้นการหลั่งสารสื่ออักเสบเช่น IL-1, IL-6 and TNF- α นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงตัวเองของเซลล์คีราติโนไซต์ ทำให้ผิวหนังแห้ง หนา และไม่เรียบเนียน [19-20] ดังนั้นการได้รับสารแอนติออกซิแดนท์จากกล้วย จึงช่วยป้องกันผิวหนังถูกทำลายจากแสงยูวีบี

การทดสอบการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันโดยการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ Malondialdehyde (MDA) และ 4-Hydroxynonenal (4-HNE) ด้วยวิธี Immunofluorescence staining โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ พบว่า หนูเม้าส์กลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่ามีปริมาณ MDA สูงกว่าทุกกลุ่มโดยพบมากในชั้นอีพิเดอร์มิสและพบกระจายทั่วไปในชั้นเดอร์มิส ในเนื้อเยื่อผิวหนังหนูเม้าส์ที่ได้รับวิตามินซีและ

กล้วยไข่มีปริมาณ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่า ส่วนหนูที่ได้รับ กล้วยน้ำวามีปริมาณ MDA ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่า ผลการศึกษาปริมาณ 4-HNE พบว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกับ MDA โดยหนูเม้าส์ที่ได้รับน้ำเปล่า มีปริมาณ 4-HNE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ถูกฉายด้วยยูวีบี และการได้รับกล้วยไข่ กล้วยน้ำว้า หรือวิตามินซีสามารถยับยั้ง การเพิ่มขึ้นของ 4-HNE ในเนื้อเยื่อผิวหนังหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีบีอย่างมีนัยสำคัญ โดยปกติแล้ว ไขมันจะเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์และชั้นผิวหนัง และเป็นเป้าหมายสำคัญของแรดิเคิล ทำให้ ไขมันเกิดการแตกหักและถูกออกซิไดส์ ซึ่งนอกจากจะทำลายเซลล์ผิวหนังแล้วยังนำไปสู่การเกิดสารตัวกลางใน การทำลายผิวอีกด้วย[21-22] เบต้าแคโรทีนเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ที่สามารถกำจัดแรดิเคิล โดยเฉพาะ ในชั้นไขมัน หนูเม้าส์ที่ได้รับกล้วยไข่อย่างต่อเนื่องจึงมีปริมาณการเกิดลิพิดเพอร์ออกซิเดชันน้อยกว่ากลุ่มที่ ได้รับน้ำเปล่าและกล้วยน้ำว้า

ผลการศึกษาการกินวิตามินซี กล้วยไข่ หรือกล้วยน้ำว้าอย่างต่อเนื่องในการยับยั้งการเกิดโปรตีน ออกซิเดชันโดยวิธี Immunohistochemistry พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำเปล่าและถูกฉายด้วยรังสียูวีบี มี ปริมาณของหมู่คาร์บอนิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกระจายทั่วไปในชั้นเดอร์ มิส แต่การที่กินกล้วยไข่หรือวิตามินอย่างต่อเนื่องทำให้ปริมาณหมู่คาร์บอนิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน การกินกล้วยน้ำว้าพบว่ามีปริมาณคาร์บอนิลมีแนวโน้มที่ลดลงเช่นกัน

การศึกษากการผลิต MMP-1 ในเนื้อเยื่อผิวหนังหนูโดยวิธี Immunofluorescence staining พบว่า การที่หนูเม้าส์ถูกฉายด้วยรังสียูวีบีอย่างต่อเนื่องจะมีการผลิต MMP-1 ออกมามากในชั้นผิวหนังโดยเฉพาะ ชั้นเดอร์มিস ซึ่งอาจส่งผลให้ทำลายคอลลาเจนได้ ในทางตรงกันข้าม วิตามินซีมีบทบาทในการยับยั้งการ ผลิต MMP-1 ในชั้นผิวหนังหนูเม้าส์ที่ถูกฉายด้วยรังสียูวีบี ซึ่งสามารถป้องกันคอลลาเจนถูกทำลายด้วยยูวี บีได้ ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าการผลิต MMP-1 ในผิวหนังหนูที่ได้รับกล้วยไข่หรือกล้วยน้ำว้ามีแนวโน้ม ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มได้รับน้ำเปล่าเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้ ผลที่ได้เนื่องจากวิตามินซี เป็นแอนติออกซิ เดนซ์ที่มีโมเลกุลเล็ก และสามารถกำจัดแรดิเคิลได้อย่างรวดเร็ว จึงส่งผลต่อการแสดงออกของ MMP-1 ทำให้ MMP-1 ในหนูกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ

การถูกฉายด้วยรังสียูวีบีอย่างซ้ำๆเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ทำให้กลุ่มดำไฮโดรในผิวหนังลดลง อย่างมีนัยสำคัญ แต่การได้รับวิตามินซี กล้วยไข่ หรือกล้วยน้ำว้ามีแนวโน้มในการรักษาระดับกลุ่มดำไฮโดร ในผิวหนังได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาถึงการแสดงออกของเอนไซม์ γ -GCS ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการผลิตกลุ่มดำไฮโดร จากการศึกษพบว่า หนูที่ถูกฉายด้วยยูวีบีและได้รับเพียง น้ำเปล่าจะมีการแสดงออกของ γ -GCS สูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเป็นกลไกในร่างกายเพื่อปรับสมดุลให้ ระดับกลุ่มดำไฮโดรสูงขึ้นเพื่อกำจัดแรดิเคิล ส่วนหนูทดลองที่ได้รับกล้วยไข่จะมีการแสดงออกของ γ -GCS สูงสุด เนื่องจากในกล้วยไข่มีโพลีฟีนอลและเบต้าแคโรทีน ที่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ชนิด นี้ได้เพื่อกระตุ้นการผลิตกลุ่มดำไฮโดรมาป้องกันแรดิเคิลจากยูวีบี หนูที่ได้รับวิตามินซีจะมีการแสดงออกของ

γ -GCS ลดลงเนื่องจากวิตามินซีมีความสามารถในการกระตุ้น glutathione recycling แต่ไม่ได้กระตุ้นการผลิตกลูต้าไธโอนใหม่ ส่วนหนูที่ได้รับกลูต้าไธโอนมีการแสดงออกของ γ -GCS น้อยกว่ากลูต้าไธโอนเนื่องจากระดับโพลีฟีนอลและเบต้าแคโรทีนต่ำกว่ากลูต้าไธโอน[6, 24-25] ผลการศึกษาที่ได้พบว่าการกินกลูต้าไธโอน กลูต้าไธโอน หรือวิตามินซีอย่างต่อเนื่องมีประสิทธิภาพในป้องกันผิวหนังถูกทำลายในแง่กระตุ้นการผลิตกลูต้าไธโอน ป้องกันลิพิดเพอร์ออกซิเดชันและโปรตีนออกซิเดชัน และผลการศึกษาที่ได้ ได้แสดงในภาคผนวก ก โดยผลงานวิจัยนี้ได้เสนอไปยังวารสารวิชาการทางด้าน Molecular nutrition and food research

เอกสารอ้างอิง

1. Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms J, Hale A. Effect of red wine 581 ingestion on the antioxidant capacity of serum. Clin Chem. 1995; 41: 32–35.
2. Cao G, Booth SL, Sadowski JA, Prior RL. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. Am J Clin Nutr. 1998; 67: 1081–1087.
3. Nakagawa K, Ninomiya M, Okubo T, Aoi N, Juneja LR, Kim M, Yamanake K, Miyazawa T. Tea catechin supplementation increases antioxidant capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. J Agric Food Chem. 1999; 47: 3967–3973.
4. Kaume L, Howard LR, Devareddy L. The blackberry fruit: a review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. J Agric Food Chem. 2012; 60: 5716-5727.
5. Kim YJ. Antimelanogenic and antioxidation of gallic acid. Biol Pharm Bull. 2007; 30: 1052-1055.
6. Takeda S, Bando N, Yamanishi R. Ingested beta-carotene enhances glutathione level and up-regulates the activity of cysteine cathepsin in murine splenocytes. Biosci Biotechnol Biochem. 2008; 72: 1595-1600.
7. Viyoch J, Mahingsa K, Ingkaninan K. Effects of Thai *Musa* species on prevention of UVB-induced skin damage in mice. Food Chem Toxicol. 2012; 50: 4992-4301.
8. Sharma SD, Meeran SM, Katiyar SK. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-KB signaling in in vivo SKH-1 hairless mice. Mol Cancer Ther. 2007; 6: 995–1005.
9. Evans JA, Johnson EJ. The role of phytonutrients in skin health. Nutrients. 2010; 2: 903–928.
10. Nagata C, Nakamura K, Wada K, Oba S, Hayashi M, Takeda N, Yasuda K. Association

- of dietary fat, vegetables and antioxidant micronutrients with skin ageing in Japanese women. *Br J Nutr.*2010; 103: 1493–1498.
11. Satheannoppakao W, Aekplakorn W, Pradipasen M. Fruit and vegetable consumption and its recommended intake associated with sociodemographic factors: Thailand National Health Examination Survey III. *Public Health Nutr.*2009; 12: 2192-2198.
 12. Del Mar Verde Méndez C, Forster MP, Rodríguez-Delgado MÁ, Rodríguez - Rodríguez EM, Romero CD'. Content of free phenolic compounds in bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador. *Eur Food Res Technol.* 2003; 217: 287-290.
 13. Patthamakanokporn O, Puwastien P, Nitithamyong A, Sirichakwal PP. Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits. *J Food Composi Anal.*2008; 21: 241-248.
 14. ศิริธร ศิริอมรพรรณ. การวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในมะม่วง กัลล้วย มะละกอ. รายงานวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. พ.ศ. 2553
 15. โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน โดยพระราชประสงค์ในพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว. พันธุ์กล้วยในประเทศไทย. สืบค้นเมื่อวันที่ 25 กรกฎาคม 2559 จาก <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=30&chap=6&page=t30-6-infodetail05.html>
 16. โครงการเผยแพร่ข้อมูลชีวภาพและภูมิปัญญาท้องถิ่นที่สูง. Banana, cultivated banana. สืบค้นเมื่อวันที่ 25 กรกฎาคม 2559 จาก http://eherb.hrdi.or.th/search_result_details.php?herbariumID=986&name=Banana,%20Cultivated%20banana
 17. Lim, Y. Y., Lim, T. T. and Tee, J. J. (2007). Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food Chem*, 103(3), 1003-8.
 18. Charoensiri, R., Kongkachuichai, R., Suknicom, S. and Sungpuag, P. (2009). Beta-carotene, lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. *Food Chem*, 113(1), 202-7.
 19. Feldmeyer, L., Werner, S., French, L. E., Beer, H. D. (2010). Interleukin-1,

- inflammasomes and the skin. *European Journal of Cell Biology* 89 (2010) 638–644
20. Jans, J., Garinis, G. A., Schul, W., Oudenaren, A. V., Moorhouse, M., Smid, M., et al. (2006). Differential Role of Basal Keratinocytes in UV-Induced Immunosuppression and Skin Cancer. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, Nov. 2006, p. 8515–8526 Vol. 26, No. 22
21. Hanaa, A. H. MAE-A. (2012). Lipid Peroxidation End-Products as a Key of Oxidative Stress: Effect of Antioxidant on Their Production and Transfer of Free Radicals, Lipid peroxidation, In Dr. Angel Catala (Ed), *Biochemistry, genetics and Molecular biology*. pp. 63-88.
22. Ayala, A., Muñoz, M. F., and Argüelles, S. (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2014
23. Carlsen, H., Myhrstad, MC., Thoresen, M., Moskaug, J. O. and Blomhoff, R. (2003). Berry intake increases the activity of the gamma-glutamylcysteine synthetase promoter in transgenic reporter mice. *J Nutr*, 133(7), 2137-40.
24. Moskaug, J. O. , Carlsen, H., Myhrstad, M. C. and Blomhoff, R. (2005). Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am J Clin Nutr*, 81(1 Suppl), 277-83.
25. Masella, R., Di, B. R., Vari, R, Filesi, C. and Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr biochem*, 16(10), 577-86.

Output ที่ได้จากโครงการ

ผลสำเร็จของการวิจัยที่ได้รับ

1. เทคนิคและ วิธีการเลี้ยง ดูแลสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะหนูเมาส์ที่ใช้ในโครงการ ที่พัฒนาขึ้นและสามารถประยุกต์ใช้ในการทดลองโครงการอื่นๆ อาทิเช่น การศึกษากลไกการยับยั้งมะเร็งผิวหนังที่เหนี่ยวนำด้วย UV โดยสารสกัดจากสมุนไพรไทย, การศึกษาทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยาในสัตว์ทดลอง เป็นต้น
2. นายนนทพรพจน์ ลีราช นิสิตปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
3. เพื่อที่จะส่งผลงานวิจัยเพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับนานาชาติ Journal of Molecular nutrition and Food research (impact factor ปี 2016 เท่ากับ 4.603) ภาควิชา ก.

ภาคผนวก ก

เอกสารงานวิจัย (manuscript) สำหรับเผยแพร่

เพื่อที่จะตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Molecular nutrition and Food research

เอกสารงานวิจัย (manuscript) สำหรับเผยแพร่

The mechanisms underlying preventive effect of Thai banana on UVB-induced skin damage in mice

Nontaphat Leerach^{1,2}, Swanya Yakaew^{1,2}, Preeyawass Phimnuan^{1,2}, Wichuda Soimee^{1,2}, Witoo Luangbudnak³, Jarupa Viyoch^{1,2}

¹ Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

² Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

³ Department of Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Correspondence: [Jarupa Viyoch]

jarupav@nu.ac.th, jarupaviyoch4@yahoo.com.

Keywords: Lipid peroxidation/ *Musa AA* group/ *Musa ABB* group/ Protein oxidation/ UVB-induced skin damage

Abbreviations: **BSA**, Bovine serum albumin; **DAB**, 3,3'-Diaminobenzidine; **DNPT**, 2,4-Dinitrophenylhydrazine; **γ-GCS**, Gamma-Glutamylsysteine synthetase; **GSH**, Glutathione; **4-HNE**, 4-Hydroxynonenal; **HRP**, horseradish peroxidase; **MAPK**, Mitogen-activated protein kinases; **MDA**, Malondialdehyde; **MMP-1**, Matrix metalloproteinase-1; **Nrf-2**, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; **ROS**, Reactive oxygen species; **TBS**, Tris-buffered saline; **UVB**, Ultraviolet B

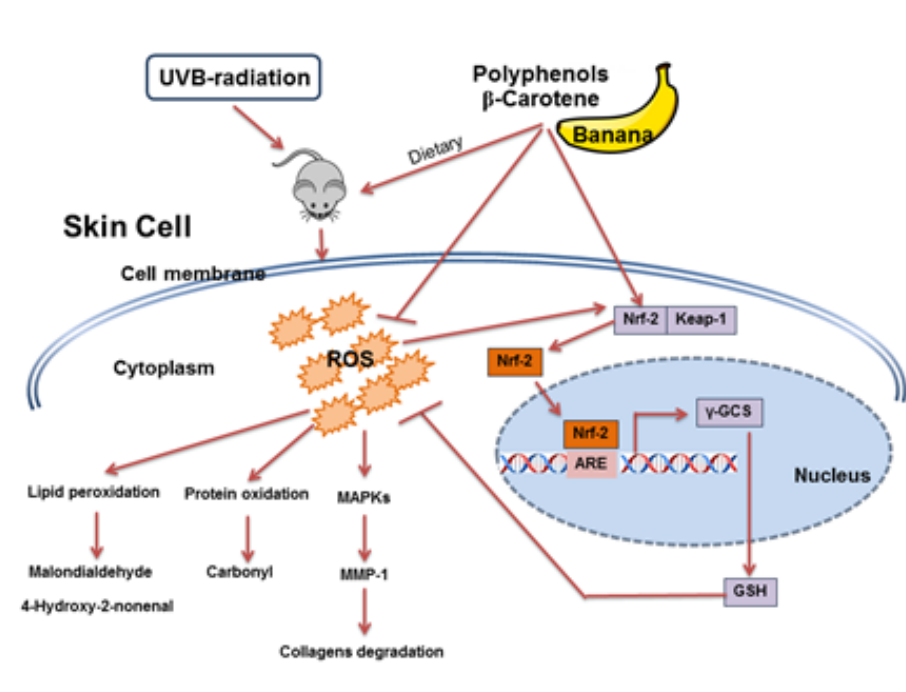
Abstract

Scope: A chronic UVB exposure causes skin damage and cancer. In this study, we investigated the effects of Thai banana (*Musa AA* group or Khai Kampheang Phet and *Musa ABB* group or Namwa Mali Ong) consumption on prevention of UVB-induced skin damage in male ICR mice.

Methods and results: Animals were orally administered Khai or Namwa's fruit pulps at dose of 1 mg/g body weight/day for 12 weeks. Another group was orally administered 50 mg/day L-ascorbic acid, a potent antioxidant. Simultaneously, the shaved backs of animals were irradiated with UVB for 12 weeks. The intensity dose of UVB-exposure was increased from 54 mJ/cm² per exposure at week 1 to 126 mJ/cm² at week 12. A significant increasing in skin thickness, lipid peroxidation and protein oxidation end products, and expression of MMP-1 were observed in UVB-irradiated mouse skin. The diminishing in accumulation of oxidation end products was found in skin of UVB-irradiated mice receiving Khai. This phenomenon occurred along with lowering MMP-1 expression, inhibiting epidermal thickening and inducing γ -GCS expression.

Conclusion: The dietary intake Thai banana (Khai Kampheang Phet) could prevent skin damage from chronic UVB exposure by enhancements γ -GCS expression and lowering the oxidation end products.

Graphic Abstract



1 Introduction

The development of skin disorders including premature aging and cancers can be developed from skin damaged from excessive UV exposure. UV radiation, especially UVB has been reported its harmful effects on skin [1-2]. It is almost completely absorbed by epidermis and penetrates to the upper layer-of the dermis [3] destroy DNA and product free radicals including reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species [4]. Free radicals generate DNA and protein crosslinking and oxidize the functional groups of the biological macromolecules, such as DNA, proteins and lipids in the skin [5] accelerating skin disorders. The oxidation end products, for instance, are malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) and protein carbonyls. A reactive aldehyde from lipid peroxidation, MDA and 4-HNE can further interact with other biological molecules, and protein-bound carbonyls play a key role in degenerative process [6-8]. Free radicals also activate the release of inflammatory cytokines and mediate cytokines binding to their receptors, thus induction the expression of collagenases, such as matrix metalloproteinase-1 (MMP-1). However, free radicals can activate cell signalings for promoting cellular repair mechanisms [9,10]. For an example, free radicals stimulate signaling pathways for enhancing the expression of glutathione (GSH) involving in cellular defense mechanism against free radicals [11,12]. Moreover, skin contains endogenous substances which have capacity to reduce oxidized elements. Such substances, for instance include L-ascorbic and α -tocopherol [13]. Nevertheless, an overproduction of free radicals resulting from excessive exposure to external stimuli including UVB can overcome the defense mechanism and capacity of endogenous antioxidants, leading to skin disorders characterized by inflammation, dermal connective tissue degradation and abnormal accumulation of the oxidized products.

As described above, to prevent or delay the onset of skin disorders, therefore, a regular intake of food to help to maintain the defense function and/or antioxidant capacity of skin has been suggested [14,15]. Fruits and vegetables are included as the enormous sources of dietary antioxidants as they

contain several kinds of vitamins and phenolic compounds with free radical scavenging activity [16, 17]. Several studies show that antioxidants in these sources are bioavailable after ingestion [18, 19], and the plant antioxidants also increase expression of endogenous antioxidant substances, such as glutathione [20, 21], leading to lower incidence of oxidation- related diseases [22].

As far as we know, there have been very few studies revealing the effects of banana consumption on prevention of UVB-induced skin disorders. From our previous study we found that oral administration of *M. suerier* or AA group or Khai in Thai (1 mg/g body weight/day) or L-ascorbic acid (50 mg/day) could prevent a loss of dermal connective tissue and reduction in level of glutathione in mouse skin after chronic exposure to UVB radiation. Oral administration of *M. sapientum* or ABB group or Namwa did not markedly affect in this prevention. According to these results, we hypothesized that the prevention in UVB-induced skin damage of Khai may result from actions of some antioxidant compounds including phenolics and β -carotene contained, leading to lowering in accumulation of MDA, 4-HNE and protein carbonyls in the UVB-irradiated skin. In addition, the preventive effect may also cause from promoting self-defensive mechanism via inducing the expression of antioxidant response molecules, such as γ -Glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS), a rate limiting step enzyme for GSH synthesis. To prove this hypothesis, in the present study, comparison of phenolics and β -carotene content in banana varieties, Khai (Kam Phaeng Phet) and Namwa (Mali-Ong) was performed. Next, we observed epidermal thickening, accumulation of MDA, 4-HNE, protein carbonyls and MMP-1, in skin of mice exposed to chronic UVB radiation, and the effect of banana fruit pulp consumption to attenuate the accumulation of these oxidized molecules and MMP-1. Moreover, the expression of γ -GCS in mouse skin exposed to UVB was observed to clarify the ability of natural antioxidants in banana to enhance the defensive mechanism in the skin. We also study the effect on L-ascorbic consumption to compare *in vivo* antioxidant capacity between synthetic L-ascorbic acid and natural antioxidants contained in the banana fruit.

2 Materials and Methods

2.1 Collection of banana fruits

Ripen fruit pulp of bananas (*Musa AA group*, Khai Kamphaeng Phet in Thai) and *Musa ABB group*, Namwa Mali Ong in Thai) without brown or dark spot were collected from local market in Phitsanulok province, Thailand during February to May (summer season). Fresh fruits were used in this study.

2.2 Determination of total phenolic content

The fresh pulps from ripen Khai and Namwa bananas were peeled and blended. Thirty grams of the blended pulp were mixed with 50% ethanol up to 100 mL. The obtained mixture was stirred and kept form light for 10 min [23,24]. After centrifuged at 14,000 rpm at 4°C for 5 min, the collected supernatants (samples) were used for determining total phenolic content and antioxidant activity. The total phenolic content of the samples were measured by the Folin–Ciocalteu reagent assay [25]. This assay was carried out in 96-well plate. A 20 µl of samples were mixed with 130 µl of deionized water and 10 µl of Folin ciocaltue's reagent, respectively. Then 100 µl of sodium bicarbonate (7%Na₂CO₃) was added. After incubation at room temperature for 30 min, the absorbance values of the samples were measured at 750 nm with a microplate reader (BioStack Ready, BioTek Instruments, Vermont, USA). For a blank solution, the sample solution was replaced with ethanol for acting as a blank solution. Results were exhibited in gallic acid equivalents (mg GAE per 100 g of the dried fruit pulps). The determination was run in triplicate (n = 3).

2.3 Determination of β-carotene content

The pulps from ripen Khai and Namwa bananas were peeled and lyophilized to remove water before β-carotene extraction. The reflux extraction technique was used to extract β-carotene from the dried bananas [17]. Five grams of the dried bananas were placed in a soxhlet chamber. A 50 ml of

ethanol (AR grade, LabScan Asia Co., Ltd., Bangkok, Thailand) containing 2 M potassium hydroxide (KOH, Ajax Finechem Pty., LTD, Auckland, New Zealand) and 10 ml of 10% (w/v) L-ascorbic acid (POCH, Sowinskiogo, Poland) were acted as the extraction solution. The extraction solution was refluxed in a boiling water bath. After 60 min of the reflux process, the resultant extract was cooled to room temperature and further partitioned with 70 mL of hexane. The yellowish-hexane layer was transferred to a separating funnel containing 50 mL of 5% (w/v) KOH solution. One hundred mL of 10% (w/v) sodium chloride (NaCl, Ajax Finechem Pty., LTD, Auckland, New Zealand) was added into the funnel. KOH and NaCl were used to remove alkaline particles. The upper layer of the two-layer solution was then collected and evaporated in a rotary evaporator under vacuum in a 37°C. The residue was dried with nitrogen gas, and the dried samples were dissolved in methanol determining β -carotene content. A β -carotene standard (95%, SLBG6787V, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in methanol was prepared in various concentrations in range of 100-700 $\mu\text{g/mL}$ [26]. The absorbance values of the standard and sample solutions were measured at 450 nm by using a microplate reader. The amount of β -carotene content in the sample (mg per 100 g of the fresh fruits) was calculated by integrating the absorbance using a calibration curve constructed from standard β -carotene. The experiment was run in triplicated ($n = 3$).

2.4 Animal treatment

The study protocol was approved by Naresuan University Animals Ethics Committee (Approval No. NU-AE570513). Male ICR mice (4 weeks old) in the weight range 25-30 g were purchased from National Laboratory Animal Centre (Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand), and housed *ad libitum* for 1 week in a temperature-controlled room at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and $55 \pm 10\%$ relative humidity before experiment at center for animal research Naresuan University. The mice hair was shaved by applied 8% sodium sulphide x-hydrate on the dorsal region of $4 \times 4 \text{ cm}^2$. The hair then was removed with wet cotton without skin damaging. Twenty five mice were randomly separated in to

5 groups (5 mice per group). Two groups of mice were received freshly blended bananas (Khai or Namwa) at doses of 1 mg/g body weight/day every day for 12 weeks by using feeding tube and their skins were irradiated with UVB. The other two groups were orally administered 50 mg of L-ascorbic acid, that was freshly prepared in an aqueous solution once a day or RO water through feeding tube, and their skins were irradiated with UVB. The last group of mice was non-irradiated -UVB (control). The selected dose of the blended banana fruits and L-ascorbic was followed our previous study [24]. The mice were weighed daily before administration.

2.5 UVB irradiation

The protocol of UVB irradiation was followed our previous study [24] with some modifications. In brief, mice were anesthetized with ketamine (40 mg/kg) and xylazine (2 mg/kg) before irradiation. UVB from fluorescence sunlamps (FL8BLB, Toshiba, Japan) emitting rays between 275-305 nm was exposed to shaved back region of mice. The distance of lamp-to-skin is 30 cm. The frequency of irradiation is set at 3 times a week (Monday, Wednesday and Friday). Mice were irradiated with UVB once a day (during 08.30-11.00) after the oral administration of the blended banana fruits, L-ascorbic acid or RO water for 1 h. The irradiation period was performed by varies to control the UVB energy applied to each mouse. To prevent skin burn after UVB irradiation, dose of UVB was subsequently increased. The initial dose of UVB started with 54 mJ/cm² at weeks 1–4, and then it is increased to 72 mJ/cm² at weeks 5–7, 108 mJ/cm² at weeks 8–10 and 126 mJ/cm² at weeks 11–12 respectively.

2.6 Histology and measurement of epidermal thickness

After finished 12 week, the mice were terminated. Pentobarbital over dose (100mg/kg) was given. The shaved back skin regions (approximately 3x3 cm²) were then quickly removed, fixed in pre-labeled base molds containing tissue-tek (Sakura Finetek USA, Inc., California, USA) and then frozen. To observe epidermal thickness and dermal layer arrangement, the skin tissues were

transversely sectioned at 8 mm in thicknesses, placed on poly-L-lysine coated slides and stained with hematoxylin–eosin respectively. The epidermal thicknesses were measured using the AXIO software (Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, UK).

2.7 Immunofluorescence staining

To detect lipid peroxidation end products including Malondialdehyde (MDA) and 4-Hydroxynonenal (HNE) and collagenase, Matrix Metalloproteinase (MMP-1) in the collected skin tissue, the sectioned skin tissues were placed on poly-L-lysine coated slides, fixed in cold methanol for 15 min and washed with PBS. Tissues were permeabilized by treating with 0.2% Triton-X in 1X Tris buffered saline (1X TBS) for 10 min and washed twice. Nonspecific target of antibody was blocked by incubated the permeabilized tissues in 5% bovine serum albumin (BSA) with 0.1% Triton-X in TBS for 30 min. After blocking, the tissues were incubated at 4 °C overnight in a humidified chamber with rabbit-anti-MDA polyclonal (ab6463, Abcam), rabbit-anti-4-HNE polyclonal (ab46545, Abcam) or rabbit-anti-MMP1 polyclonal 1:200 dilution (ab137332, Abcam) primary antibodies diluted with 1% BSA in TBS. Then, the tissue were washed three times with TBS and incubated with goat-anti-rabbit polyclonal antibodies conjugated with FITC (ab6717, Abcam) or Cy5® (ab6564, Abcam) 1:100 dilution diluted with 1% BSA in TBS. The tissues were wash again with TBS and then were treated with Fluoromount (Diagnostic BioSystems, California, USA) and covered by cover-slip before visualization under a fluorescence microscope (Axio Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, UK). Fluorescence intensity was analyzed by Image J program free program (The National Institutes of Health (NIH)).

2.8 Immunohistochemistry staining

To detect protein carbonyl adducted protein, the sectioned skin tissues were placed on poly-L-lysine coated slides and fixed with methacarn solution [30 mL of methanol, 15 mL of chloroform and

5 mL of glacial acetic acid] for 30 min at room temperature (RT). OxyIHC™ Oxidative Stress Detection Kit (S7450, MERCK, Darmstadt, Germany) composing of Wash Buffer, Antigen Retrieval Buffer, Blocking Buffer, Primary Antibody, DAB-A, DAB-B, Antibody Diluent, Biotinylated Secondary Antibody, Streptavidin conjugated HRP, Hematoxylin, and DNPH Solution, was used. Tissues were retrieved with antigen retrieval buffer, incubated in a streamer for 20 min. After, were washed two times with washing buffer and incubated with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution for 30 minutes in a humidified chamber at room temperature. Nonspecific antigens were blocked by using blocking buffer. After blocking, the tissue samples were incubated with anti-DNP primary antibody overnight in a humidified chamber at 4°C. After washing, the tissue samples were incubated with biotinylated secondary antibody for 30 min and washed again. The endogenous peroxidase in tissue samples were quenched by treating with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes. The tissue samples were washed and incubated with streptavidin conjugated HRP for 30 min subsequently. Then, the samples were incubated with substrate DAB [3,3' diaminobenzidine] to develop the brown color products of substrate and enzyme-conjugated antibody, and subsequently stained with hematoxylin, dehydrated and mounted with mounting media before observation under light microscope. (Axio Observer Z1, Carl Zeiss Microscopy Ltd., Cambridge, UK).

2.9 Western blot analysis

Total protein was extracted from the collected skin tissue using T-per protein extraction (QC214313, Thermo scientific, Illinois, USA). The obtained protein solutions was loaded on (total protein, 50 µg per lane) 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) (Cat. 161-0301, Bio-rad laboratories, Inc., USA) and transferred (PierceG2 Fast blotter, Thermo scientific, Inc., Illinois, USA) onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Pall Corporation, Florida, USA). The membrane was incubated in a TBS-T buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20] containing 5% skim milk (VL-321563-126, Merck, Darmstadt, Germany) overnight at in

refrigerator. After washing, the membrane was incubated with anti-GCLC (anti- γ -GCS) polyclonal antibody (ab41463, Abcam plc., Cambridge, UK) in TBS-T with 5% skim milk (1:1000) or anti- β -actin monoclonal antibody (A5441, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in TBS-T with 5% skim milk (1:2000). After incubated, the membranes were further incubated with goat anti-rabbit-HRP conjugated secondary antibody (Millipore, Massachusetts, USA) in TBS-T with 5% skim milk (1:2000) for 1 hr. Afterward, the blots were exposed to 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate, and the signals were visualized and analyzed with a Chemi-Doc™ XRS+system and the Image Lab™ Software (BIO-RAD, California, USA), respectively. The signal intensity of β -actin was used as a loading control.

2.10 Statistical analysis

The data are compared for each condition by Student's unpaired *t*-test. All quantitative data are expressed as means of samples for each treatment. $p < 0.05$ are considered significant.

3 Results and Discussion

3.1 Total phenolic and β -carotene contents of Khai and Namwa

Only a few studies have revealed the nutrient composition in fresh fruit pulp of Thai banana. There have been reported that Khai variety has more contents of total phenols, vitamin E and β -carotene than other varieties [17, 24, 28]. In this study we compared total phenolic and β -carotene contents between two varieties of bananas, *Musa AA* group (Khai Kamphaeng Phet) and *Musa ABB* group (Namwa Mali Ong). We found that Khai Kamphaeng Phet contained higher content of total phenolic (38.39 ± 1.39 mg GAE per 100 g of fresh fruit pulp) as in comparisons with Namwa Mali Ong (30.05 ± 0.50 mg GAE per 100 g of fresh fruit pulp). For β -carotene content, according to the extraction and analysis methods used in our study, β -carotene in Namwa Mali Ong could not be detected whereas high β -carotene (79.20 ± 4.76 μ g per mg extract) was found in Khai Kamphaeng

Phet. To eliminate the impact of the different water content in a fresh fruit between two varieties, we also compared total phenolic and β -carotene in the lyophilized fruit pulps and found that Khai (137.11 ± 4.96 mg GAE for phenolic and 282.85 ± 16.95 μ g per 100 g of dried fruit pulp for β -carotene) contained both groups of compounds higher than that of Namwa (89.43 ± 1.79 mg GAE for phenolic per 100 g of dried fruit pulp).

As we known phytochemicals such as flavonoids, carotenoids and polyphenols are natural antioxidants that play an important role in preventing organ damages causing from an accumulation of damaged molecules in cells and organs. Such damages molecules result from the reaction between generated free radicals and cell components such as DNA, proteins and lipids. In general, human organs including skin have endogenous defensive molecules to inhibit or delay free radical activities [13,14]. However, excessive exposures to extrinsic factors such as UVB generate over production of free radicals and drive the phenomenon of the imbalance between activity of endogenous defensive molecules and that of generated free radicals in the skin [14, 29]. Continuous administration of phytochemicals with antioxidant activity, therefore, is suggested to be a possible way to enhance antioxidant capacity and improve defensive mechanisms in the skin repeatedly exposed to UVB [24]. According to higher phenolic content of Khai, we hypothesized that consumption of Khai might show higher preventive effect than Namwa on UVB-induced accumulation of damaged molecules. Moreover, as lipid is a main structure of cell that serves as an excellent target of free radicals attack [30] and β -carotene is carotenoids that prevent free radical attack in lipid part of cellular membrane [31], consumption Khai with high β -carotene content might also lead to a low accumulation of oxidized lipid molecules in the skin.

3.2 Effect of banana consumption on epidermal thickness of UVB-irradiated mouse skin

Chronic UVB exposure causes skin damages and dermal connective tissue disarrangement that are known as photodamage. After repeated exposure to UVB, free radicals such as ROS are generated. Afterward, skin cells, particularly keratinocytes respond to ROS by secreting inflammatory mediators such as IL-1, IL-6 and TNF- α , leading to keratinocytes hyperdifferentiation and skin inflammation. These can contribute to premature skin aging and cancer [32]. Epidermal hyperplasia and/or thickening, therefore, are marked as skin disorder signs. In the present study, epidermal thickness was measured and compared between groups. The significant increase in epidermal thickness was observed in groups of UV-irradiated mice receiving water ($27.95 \pm 3.85 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) and Namwa Malin Ong ($26.37 \pm 1.94 \mu\text{m}$, $p < 0.05$) after treatments for 12 weeks as compared to non UVB irradiated group (control, $20.17 \pm 3.00 \mu\text{m}$). In addition, connective tissue damage from chronic UVB exposure was markedly found in these two groups. The epidermal thickening and connective tissue damage in skin of UVB-irradiated mice was lowered by oral administration of L-ascorbic ($19.01 \pm 1.66 \mu\text{m}$) or Khai Kamphaeng Phet ($21.59 \pm 2.04 \mu\text{m}$), (Figure 1). The resultant data suggest that daily consumption of Khai Kamphaeng Phet or L-ascorbic acid provides the beneficial effects on prevention of skin epidermal thickening and damage from chronic UVB exposure. Such beneficial effects might result from natural antioxidants in Khai and a great antioxidant activity of L-ascorbic acid. Actually, the phenolic compounds have lower antioxidant activity than L-ascorbic acid. Nevertheless, some studies report that continuous consumption of natural antioxidants such as phenolics can prevent premature aging or UV-induced skin damage [33,34]. Scavenging of ROS by antioxidants would not only prevent ROS-cellular component reaction, but also decrease inflammatory cytokine production in the UVB-irradiated skin, consequently preventing UVB-induced epidermal and dermal alterations.

3.3 Effect of banana consumption on lipid peroxidation in UVB-irradiated mouse skin

Lipids including saturated and unsaturated fatty acids are a vital cellular component in a skin layer. The excellent substrates for lipid peroxidation are polyunsaturated fatty acid. Malondialdehyde (MDA) and 4-Hydroxynonenal (4-HNE) are lipid peroxidation end products that are diffusible to distant organs. They played a vital role by adducting cellular components such as proteins, thus leading to malfunction of adducted proteins and development of various diseases [30].

Immunofluorescence staining of skin tissues for examinations of MDA and 4-HNE are shown in Figure 2 and 3, respectively. After exposure to UVB radiation for 12 weeks, as comparison to non UVB-irradiated group (control), an intensity of staining of both end products was significantly higher ($p < 0.05$) in group of UVB-irradiated mice with receiving water. The localization of the end products was markedly found in the epidermal region, where lipids are abundant in its outermost layer. On the other hand, diary oral administration of Khai Kamphaeng Phet or L-ascorbic acid significantly inhibits the increasing of MDA and 4-HNE in UVB-irradiated mouse skin (Figure 2A and 2C). In comparison between two varieties of bananas, Khai Kamphaeng Phet showed the potential in MDA and 4-HNE inhibition much better than Namwa Mali Ong. High content of β -carotene, a lipid soluble antioxidant in Khai might play a role in scavenging of radicals in lipid parts of skin and preventing the generation of lipid peroxidation end products. Concerning on L-ascorbic acid, its rapid antioxidant activity might minimize the further reaction or chain reaction occurring between ROS and cellular components, consequently lowering the accumulation of peroxidation end products. Moreover, it has been reported that L-ascorbic administration can inhibit lipid peroxidation in the skin of mice exposed to γ -radiation, probably via enhancement of glutathione peroxidase activity to detoxify lipid peroxides in the skin tissue [29].

3.4 Effect of banana consumption on protein oxidation in UVB-irradiated mouse skin

Proteins are known to be considerable targets for oxidative modification. The oxidative reaction or oxidative cleavage of amino acid lysine, arginine, proline and threonine residues leads to protein carbonyl formation [8]. Besides, during lipid peroxidation or reducing sugars reaction, protein may produce carbonyl group through reactions with aldehydes (4-hydroxy-2-nonenal, malondialdehyde) [35].

After chronic exposure to UVB for 12 weeks, carbonyl content was found to increase significantly in UVB-irradiated mice receiving water comparing to non UVB irradiated group (Figure 3A and 3B). In contrast, oral consumption of Khai Kamphaeng Phet or L-ascorbic acid significantly inhibited the UVB radiation-induced increase in carbonyl content. Such inhibition was not significant in Namwa Mali Ong receiving group. The obtained results relate to the results from the study in lipid peroxidation end products, MDA and 4-HNE. Again, consumption of high phenolic content in Khai and high antioxidant activity of L-ascorbic might prevent accumulation of oxidation end products in UVB-irradiated skin. For Namwa receiving group, more accumulation of carbonyl product as compared to Khai receiving group might be from lower content of natural antioxidants but higher content in carbohydrate and sugar in fruit pulp [36].

3.5 Effect of banana consumption on MMP-1 expression in UVB-irradiated mouse skin

Basically, MMP-1 is a collagenase that majorly produces by dermal fibroblasts and degrades type I collagen deposited in dermal layer. An active form of MMP-1 is a secreted form [37]. Over expression of the secreted MMP-1 results in fragmented collagen fibril, consequently losing biomechanical properties in skin (refs). One of a vital stimulator of MMP-1 expression and secretion is UV radiation [38], and several studies reveal that phenolics and L-ascorbic can suppress the production and secretion of MMP-1 by UV-irradiated fibroblasts through blocking ROS-receptor and/or

cytokine-receptor downstream pathway such as mitogen-activated protein kinase or MAPK pathway [39,40].

In the present study we found that the repeated exposure to UVB radiation dramatically increased MMP-1 in the mice skin, particularly in the dermal layer (Figure 4A and 4B). Consumption of banana (Khai or Namwa) or L-ascorbic potential inhibit over expression of MMP-1 induced by chronic UVB exposure but significant inhibition was found only in group of mice receiving L-ascorbic acid. In previous study we reported that oral administration of Khai or L-ascorbic acid prevented declining in elasticity and type I collagen in UVB-induced mouse skin damage [24]. We hypothesized that such prevention might, at least partially, result from inhibiting over expression of MMP-1 through diminishing amount of ROS to activate cell receptor involving in MMP-1 expression. However, further study to identify the active and/or secreted form of MMP-1 should be performed to clarify the preventive effect of banana or L-ascorbic consumption on MMP-1 activity in the UVB-irradiated mouse skin.

3.6 Effects of bananas consumption on γ -Glutamyl cysteine synthetase enzyme expression in UVB-irradiated mouse skin

γ -Glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) is a rate limiting step enzyme for glutathione (GSH) synthesis. Glutathione exist intracellularly in either an oxidized (GSSG) or reduced (GSH) state. GSH, coupled with glutathione peroxidase detoxifies peroxides by acting as an electron donor in the reduction reaction, producing GSSG as an end product. The reduction of GSSG is catalyzed by glutathione reductase (GR) in a process that requires NADPH. Maintaining a glutathione level is critical for survival and function of cell, and the correlation between impaired GSH level and

degenerative diseases has been shown [41]. Moreover, there has been reported indicating high MMP-1 induction in fibroblasts with low glutathione level [42].

Several studies have shown that phytochemicals such as β -carotene and polyphenols have positive effects on glutathione synthesis system. Our previous study reported that total glutathione level in mice skin repeatedly exposed to UVB significantly decreased as comparison to non UVB-irradiated skin, and oral administration of Khai or L-ascorbic acid inhibited decrease in glutathione level. Such inhibition was not observed in Namwa administration group. In this reason, in the present study, we investigated γ -GCS expression in UVB-irradiated mouse skin. As shown in Figure 5, as comparison to non UVB-irradiated skin, a small but significant increase in the expression of γ -GCS was found in the repeatedly UVB-exposed skin. This might result from a defensive system of skin protection by producing more glutathione to counteract ROS overproduced from chronic UVB exposure. This hypothesis bases on the previous reports indicating enhancement of expressions of antioxidant response element genes including Nrf-2, a γ -GCS gene transcription factor by accumulated ROS [43]. Nevertheless, over generation of ROS could overwhelm such defensive system, resulting in low level of glutathione and premature skin damage in UVB-irradiated skin. For group of mice receiving banana, a great increase in level of γ -GCS expression was observed in UVB-irradiated skin of mice receiving Khai Kamphang Phet as comparison to skin of non UVB-irradiated group. As phenolics and β -carotene in Khai could scavenge free radicals and also activate Nrf-2 [21,22] to induce γ -GCS expression, resulting in restoration of normal level of glutathione expression in UVB-irradiated skin. A long term consumption of Khai, thus prevented skin damage and accumulation of oxidized lipid and protein end products. This prevention was not occurred in Namwa receiving group.

Concerning the L-ascorbic receiving group, we found a low expression of γ -GCS in UVB-irradiated skin. In general, L-ascorbic acid is a potent antioxidant that rapidly eliminates free radicals and promotes glutathione recycling in cells but does not induce the expression of γ -GCS [44,45]. L-ascorbic acid can reduce an oxidized glutathione by rapid activating GR activity. The synergistic activity in antioxidant and glutathione recycling of L-ascorbic acid, therefore, promoted preventing in skin damage from chronic UVB exposure. Additionally, from the obtained results we can conclude that Khai and L-ascorbic acid has different mechanism(s) in preventing skin damage from UVB.

4 Concluding remarks

[Start by stating your main findings and explain their meaning and importance. Relate or parallel your findings to the existing literature. You may acknowledge the limitations of your study, and make suggestions for further research. In a short paragraph, write the conclusions you have drawn from your study. This should be the “take-home message.”]

Mouse skin exposure to chronic UVB radiation resulted in dermal connective tissue damage, and high accumulation of lipid peroxidation and protein oxidation end products in skin. Moreover, higher expression of MMP-1 and lower expression of γ -GCS, an enzyme for glutathione synthesis was observed, as comparison to non UVB-irradiate mouse skin. The diminishing in accumulation of protein and lipid peroxidation end products was found in skin of UVB-irradiated mice receiving Khai Kamphaeng Phet. This phenomenon occurred along with lowering MMP-1 expression, inhibiting epidermal thickening and inducing γ -GCS expression and was possibly due to the antioxidant action and/or the actions at cellular level of phenolics and β -carotene abundantly found in Khai. The preventions in dermal skin damage, enhancement of MMP-1 expression, accumulation of oxidation

products and epidermal thickening was also found in the group of mice receiving L-ascorbic acid. However, these preventive effects were not due to γ -GCS induction but from potent antioxidant and glutathione recycling activities.

Author contributions: JV was responsible for the research concept, supervised the study and provided a discussion of the manuscript. NL performed the experiments, carried out animals study, interpretation of finding and manuscript preparation. SY, PP and WS were carried out animals care. WL was responsible for material support. JV and NL critically reviewed contents. All authors read and approved final version for publication.

Conflict of interest: On behalf of all authors, the authors have declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thanks Thailand Research Fund (TRF) for financial support (Number BRG5780013) for this study. We also would like to acknowledge Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University and Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) for their facility support. We are grateful for Naresuan University for graduate student scholarship. In addition, we also thank Dr. C. Norman Scholfield for his discussion.

5 References

- [1] Hachiya, A., Sriwiriyanont, P., Fujimura, T., Ohuchi, A. et al., Mechanistic Effects of Long-Term Ultraviolet B Irradiation Induce Epidermal and Dermal Changes in Human Skin Xenografts. *Am. J. Pathol*, 2009, 174, 401-413.
- [2] Watson, M., Holman, M. D., Maguire-Eisen, M. et al., Ultraviolet radiation exposure and its impact on skin cancer risk. *Semin. Oncol. Nurs.* 2016, (In press).

- [3] D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. and Scott, T. UV Radiation and the Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, *14*, 12222-12248.
- [4] Rastogi, R. P., Richa, Tyagi, B. M. and Sinha, P. R. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *J. Nucleic. Acids.* 2010, *2010*, 592980.
- [5] Bandyopadhyay, U., Das, D. and Banerjee, K. R. Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Curr. Sci.* 1999, *77*, 658-666
- [6] Barrera, G. Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy. *ISRN. Oncol.* 2012, *2012*, 137289.
- [7] Zhong, H. and Yin, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox. Biol.* 2015, *4*, 193–199.
- [8] Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. and Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta.* 2003, *329*, 23–38.
- [9] Heck, E. D., Gerecke, R. D., Vetrano, M. A. and Laskin, D. J. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004, *195*, 288– 297
- [10] Xu, Y. and Fisher, J. G. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. *J. Dermatol. Sci.* 2005, *1*, S1-S8.
- [11] Lu, S. C. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects. Med.* 2009, *30*, 42–59.
- [12] Nguyen, T., Nioi, P. and Pickett, C. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* 2009, *284*, 13291–13295.
- [13] Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W. and Packer, L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J. Invest Dermatol.* 1994, *102*, 122 -124.

- [14] Pandel, R., Poljšak, B., Godic, A., Dahmane, R. Skin Photoaging and the Role of Antioxidants in Its Prevention. *ISRN. Dermatol.* 2013, 2013, 930164.
- [15] Lovo, B., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 2010, 4, 118–126.
- [16] Archivio, D. M., Filesi, C., Benedetto, D. R., Gargiulo, R. et al., Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 2007, 43, 348-361.
- [17] Charoensiri, R., Kongkachuichai, R., Suknicom, S. and Sungpuag, P. Beta-carotene, lycopene, and alpha-tocopherol contents of selected Thai fruits. *Food. Chem.* 2009, 113, 202–207.
- [18] Cao, G., Booth, S. L., Sadowski, J. A. and Prior, R. L. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 68, 1081-1087.
- [19] Kaume, L., Howard, R. L., and Devareddy, L. The Blackberry Fruit: A Review on Its Composition and Chemistry, Metabolism and Bioavailability, and Health Benefits. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 5716–5727.
- [20] Masella, R., Benedetto, D. R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* 2005, 16, 577–586.
- [21] Takeda, S., Bando, N. and Yamanishi, R. Ingested - Carotene Enhances Glutathione Level and up-Regulates the Activity of Cysteine Cathepsin in Murine Splenocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008, 72, 1595-1600.
- [22] Pandey, B. K. and Rizvi, I. S. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009, 2, 270-278.

- [23] Lim, Y. Y., Lim, T. T. and Tee, J. J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. *Food. Chem.* 2007, *103*, 1003-1008.
- [24] Viyoch, J., Mahingsa, K. and Ingkaninan, K. Effects of Thai Musa species on prevention of UVB-induced skin damage in mice. *Food. Chem. Toxicol.* 2012, *50*, 4292–4301.
- [25] Singleton, L. V., Orthofer, R. and Lamuela-Raventó, M. R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 1999, *299*, 152-178.
- [26] Sanusi, A. R. and Adebisi, E. A. Beta carotene content of commonly consumed foods and soups in Nigeria. *Pak. J. Nutr.* 2009, *8*, 1512-1516.
- [27] Sitthisuanjik, K. and Sriruksa, K. Comparative study on antioxidant activity, Total phenolic contents and physicochemical properties of banana flours. *J. Agric. Sci.* 2013, *44*, 213-216.
- [28] Youryon, P. and Sopapvanich, S. Quality and bioactive compounds of ripe 'Kluai NamWa' and Kluai Khai' bananas during storage. *Int. Food. Res. J.* 2016, *23*, 1027-1032.
- [29] McArdle, F., Rhodes, E. L., Parslew, R. and Jack, C, I, A. et al., UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. *Free. Radic. Biol. Med.* 2002, *33*, 1355–1362.
- [30] Alaya, A., Muñoz, F. A. and Argüelles, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, *2014*, 360438.
- [31] Burton, G. W. and Ingold, K. U. Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* 1984, *224*, 569-573.

- [32] Jans, J., Garinis, A. G., Schul, W., Oudenaren, V. A. et al., Differential Role of Basal Keratinocytes in UV-Induced Immunosuppression and Skin Cancer. *Mol. Cell. Biol.* 2006, 26, 8515–8526.
- [33] Pérez-Sánchez, A., Catalan B. E., Caturla, N., Castillo, J. et al., Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2014, 136, 12–18.
- [34] Cha, W. J., Piao, J. M., Kim, C. K., Yao, W. C. et al., The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Biomol Ther. (seoul)*. 2014, 22, 136-142
- [35] Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M. et al., Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007, 1773, 93–104.
- [36] Vatanasuchart, N., Niyomwit, B. and Narasri, W. Resistant Starch, Physicochemical and Structural Properties of Bananas from Different Cultivars with an Effect of Ripening and Processing. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)*. 2012, 46, 461 – 472.
- [37] Xia, W., Hammerberg, C., Li, Y. and He, T. et al., Expression of catalytically active matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts induces collagen fragmentation and functional alterations that resemble aged human skin. *Aging. Cell.* 2013, 12, 661–671.
- [38] Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, C. K. and Bhagavathula, N. et al., Matrix Metalloproteinase-1 is the Major Collagenolytic Enzyme Responsible for Collagen Damage in UV-irradiated Human Skin. *Photochem. Photobiol.* 2003, 78, 43–48.

- [39] Kim, E. J., Shin, H. M. and Chung, H. J. Epigallocatechin-3-gallate prevents heat shock-induced MMP-1 expression by inhibiting AP-1 activity in human dermal fibroblasts. *Arch. Dermatol. Res.* 2013, 305, 595–602.
- [40] Radhiga, T., Agilan, B., Muzaffer, U. and Karthikeyan, R. et al., Phytochemicals as Modulators of Ultraviolet-B Radiation Induced Cellular and Molecular Events: A Review. *J. Radiat. Cancer. Res.* 2016, 7, 2-12.
- [41] Townsend, M. D., Tew, D. K. and Tapiero, H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.* 2003, 57, 145–155.
- [42] Yin, L., Morita, A. and Tsuji, T. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2001, 17, 178–183.
- [43] Bryan, K. H., Olayanju, A., Goldring, E. C. and Park, K. B. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.* 2013, 85, 705–717.
- [44] Telang, S. P. Vitamin C in dermatology. *Indian. Dermatol. Online. J.* 2013, 4, 143–146.
- [45] Montecinos, V., Guzman, P., Barra, V., Villagran M. et al., Vitamin C Is an Essential Antioxidant That Enhances Survival of Oxidatively Stressed Human Vascular Endothelial Cells in the Presence of a Vast Molar Excess of Glutathione. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 15506–15515.

Figure legends.

Figure 1. Light micrograph (at magnification, 40X) of tissue stained with haematoxylin and eosin to show the effect of orally administered of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on skin thickness and skin damage in chronic UVB-irradiated mice

Figure 1A. The effect of orally administered of fresh ripe Khai, Namwa and L-ascorbic acid on epidermis thickness in chronic UVB-irradiated mice. Each bar represents the mean $\pm$ SEM for 5 mice. Student's *t*-test indicates statistically significant differences between groups. (**p* < 0.05), (***p* < 0.01)

Figure 2. The effect of orally administered of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on Lipid peroxidation end products (MDA and 4-HNE) in UVB-induced mice skin

Figure 2A. Fluorescence intensity of immunofluorescence staining of skin tissue (percentage of control group). The effect of orally administered of fresh ripe Khai, Namwa and L-ascorbic acid on Malondialdehyde in chronic UVB irradiated mouse skin. Each bar represents the mean $\pm$ SEM for 5 mice. Student's *t*-test indicates statistically significant differences between groups. (**p* < 0.05), (***p* < 0.01)

Figure 2B. Light micrograph (at magnification, 40X) of tissue stained with Anti-MDA reveal with Cy5 2nd antibody to show the normal mouse (A) and the orally with water on skin thickness in chronic UVB-irradiated mice

Figure 2C. Fluorescence intensity of immunofluorescence staining of skin tissue (percentage of control group). The effect of orally administered of fresh ripe Khai, Namwa and L-ascorbic acid on 4-hydroxynonenal in chronic UVB-irradiated mouse skin. Each bar represents the mean $\pm$ SEM for 5 mice. Student's *t*-test indicates statistically significant differences between groups. (**p* < 0.05), (***p* < 0.01)

Figure 2D. Light micrograph (at magnification, 40X) of tissue stained with Anti-4-HNE reveal with FITC 2nd antibody to show the normal mouse (A) and the orally with water on skin thickness in chronic UVB-irradiated mice

Figure 3. The effect of orally administered of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on Protein oxidation end product (Carbonyl) in UVB-induced mice skin

Figure 3A. The intensity of immunohistochemistry staining of skin tissue (percentage of control

group). The effect of orally administration of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on carbonyl adducted protein in chronic UVB irradiated mouse skin. Each bar represents the mean $\pm$ SEM for 5 mice. Student's *t*-test indicates statistically significant differences between groups. (**p* < 0.05), (***p* < 0.01)

Figure 3B. Light micrograph (at magnification, 40X) of tissue stained with Anti-DNP 2nd antibody to

show the normal mouse (A) and the orally with water on skin thickness in chronic UVB-irradiated mice

Figure 4. The effect of orally administered of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on MMP-1

production in UVB-induced mice skin

Figure 4A. Fluorescence intensity of immunofluorescence staining of skin tissue (percentage of

control group). The effect of orally administration of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on Matrixmetalloprotenase-1 (MMP-1) in chronic UVB-irradiated mice skin. Each bar represents the mean $\pm$ SEM for 5 mice. Student's *t*-test indicates statistically significant differences between groups. (**p* < 0.05), (***p* < 0.01)

Figure 4B. Light micrograph (at magnification, 40X) of tissue stained with Anti-MMP-1 reveal with

FITC 2nd antibody to show the normal mouse (A) and the orally with water on skin thickness in chronic UVB-irradiated mice.

Figure 5. The effect of orally administration of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on γ -

Glutamyl cysteine synthetase (γ -GCS) expression in chronic UVB-irradiated mice.

Figure 5 Intensity of normalized γ -GCS protein level from western blot technique. The effect of orally

administration of fresh ripe Khai, Namwa and L-Ascorbic acid on γ -GCS level in chronic UVB irradiated mice. Each bar represents the mean $\pm$ SEM for 5 mice. Student's *t*-test indicates statistically significant differences between groups. (**p* < 0.05), (***p* < 0.01)

Figure 1.

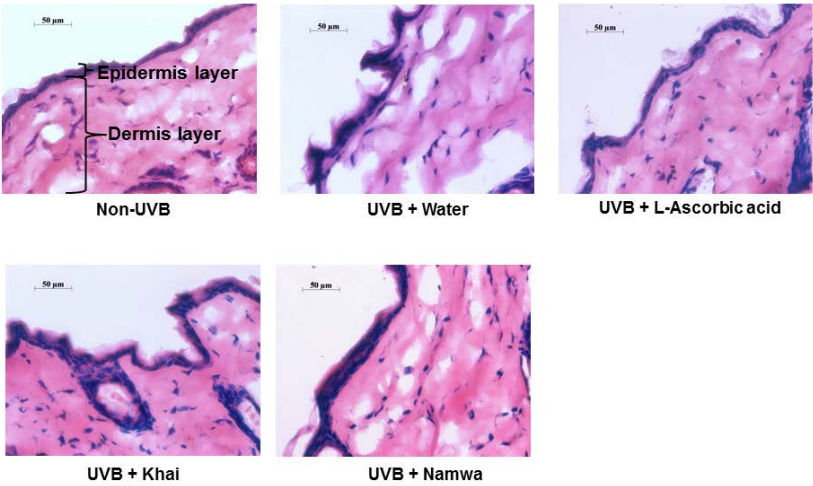


Figure 1A.

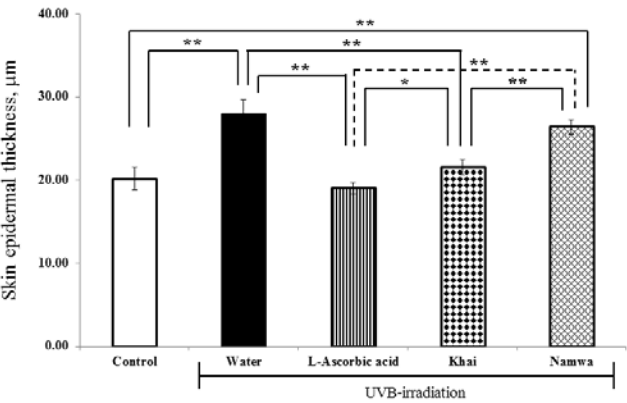


Figure 2A

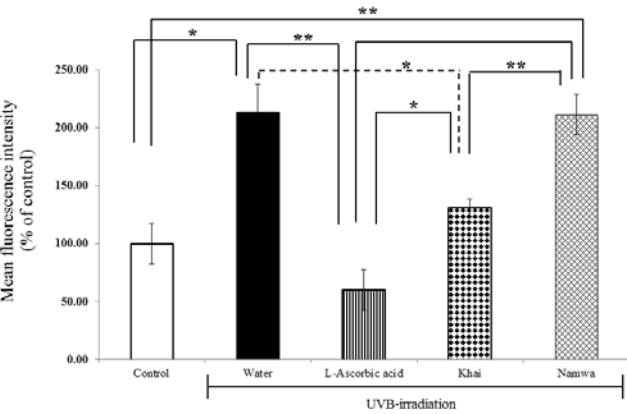


Figure 2B

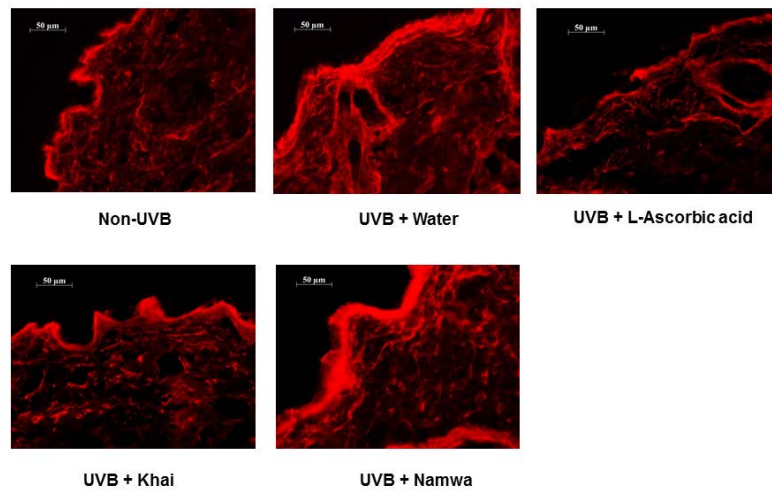


Figure 2C

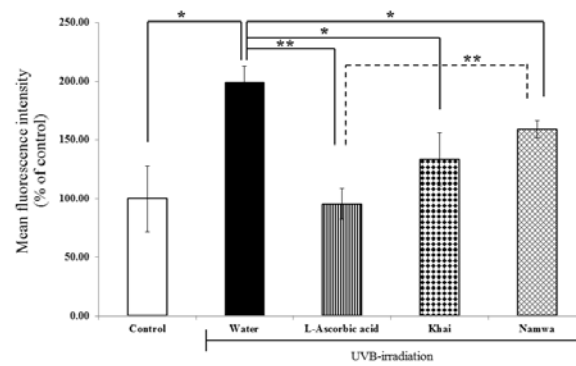


Figure 2D

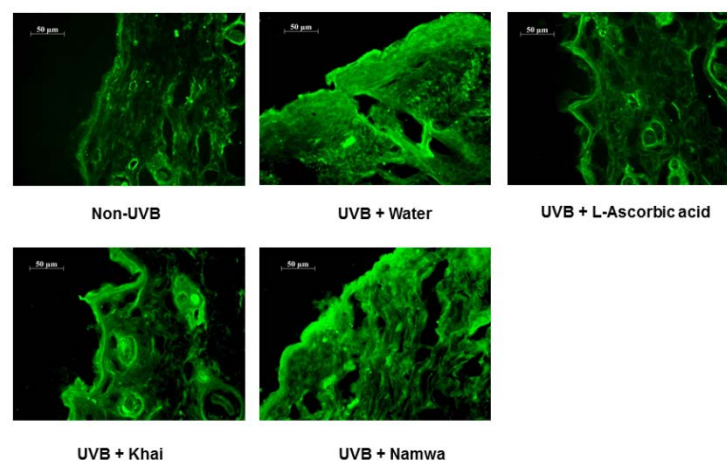


Figure 3A

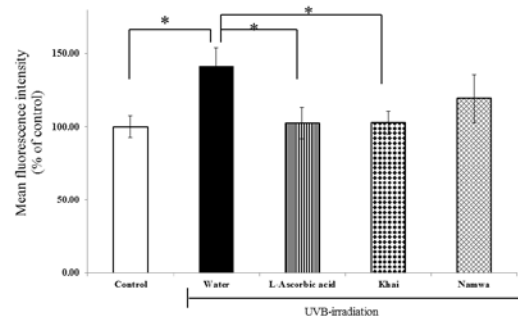


Figure 3B

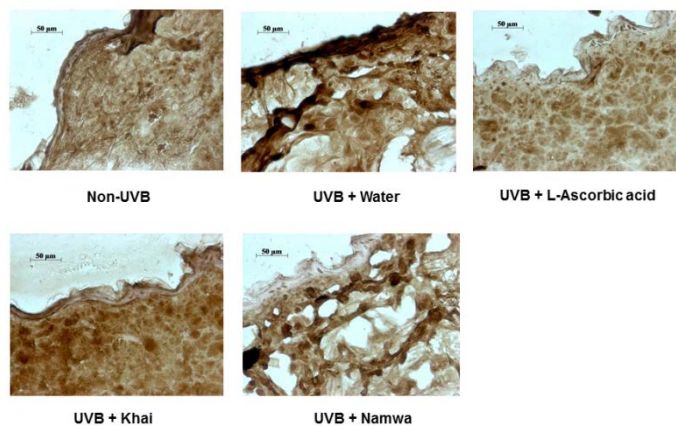


Figure 4A

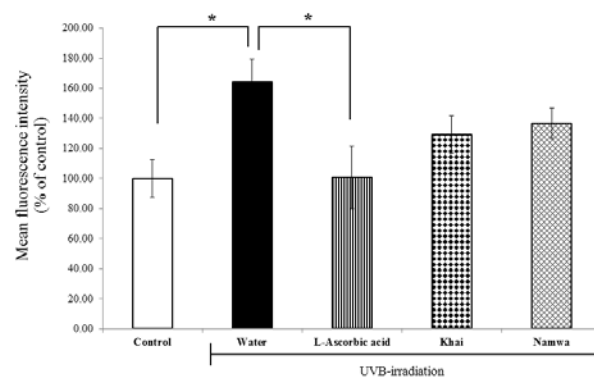


Figure 4B

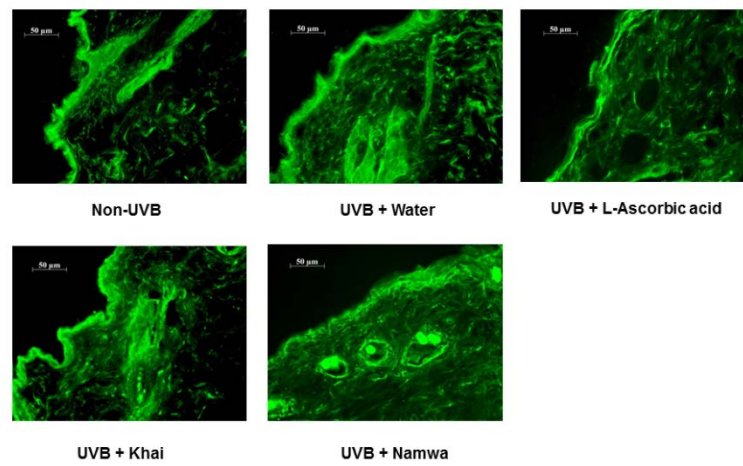


Figure 5.

