

美國德保羅大學

De Paul University

自然醫學研究所

Naturopathic Medicine Research Institute

自然醫學博士論文

Doctor of Philosophy Natural Medicine Dissertation

探討微奈米氣泡臭氧水與氫水

對免疫細胞之影響

Study the Effects of Nano-bubble Ozone Water and

Hydrogen Water on Immune Cells

指導教授：謝天渝 博士 Dr. SHIEH, TIEN-YU

許心華 博士 Dr. HSU, HSIN-HUA

博士研究生：廖月照 LIAO, YUEH-CHAO

西元 2022 年 12 月 15 日

美國德保羅大學 自然醫學研究所 博士班

論文指導教授審定 簽名書

系所名稱：自然醫學研究所

論文題目：探討微奈米氣泡臭氧水與氫水對免疫  
細胞之影響

研究生：廖月照 LIAO, YUEH-CHAO

本論文業經指導教授審查完成，特此證明。

指導教授簽名：\_\_\_\_\_

指導教授簽名：\_\_\_\_\_

西元 2022 年 12 月 15 日

## 誌謝

我是廖月照，目前擔任歐群公司董事長，從事精密科技產業，平日熱心公益，廣結善緣。疫情期間深深感受到身心健康的重要，為了行善助人，擴大事業版圖，觸角伸及大健康產業，立志研發對人類健康最有助益，且能延年益壽的養生產品。微奈米氣泡氫水為本公司獨有的專利，微奈米氣泡臭氧水是運用由雲林科技大學郭佳儷教授專屬專利授權的技術，經由歐群科技研發團隊研發的產品，並與高雄醫學大學進行產學合作，與醫學系生化學科張基隆博士研發團隊共同研究。

感恩謝天渝博士和許心華博士在指導我進行博士論文的過程中，發現微奈米氣泡氫水技術保留水中的氫氣時間比一般氫水更長。並推薦高雄醫學大學張基隆教授為著名生化、營養保健及免疫學專家，由其研發團隊成員及我共同參與研究，透過實驗深入探討微奈米氣泡氫水與臭氧水對於調節免疫功能及細胞發炎相關作用及影響，本研究成果可提供未來在疾病預防如改善慢性病、癌症等，及做為預防治療評估的學理應用參考學理依據。

撰寫論文過程中，由衷感恩謝天渝教授和許心華教授的用心指導，使其符合美國德保羅大學《研究型》論文的架構與撰寫格式。

感恩張淵豪教授熱心指導電磁波感應技術的智能科技儀器之檢測與分析判斷，獲益良多。

感恩學長、學姊、學弟及學妹們長期以來和我共同學習、進修，互相交流討論學術專業的議題。

感恩先生林志成和兒子林鼎鈞的支精神鼓勵。

感恩歐群公司全體同仁的支持，在此一併致謝！

## 中文摘要

臭氧氣體常用於環境消毒，且臭氧(O<sub>3</sub>)也應用於自血療法(Autohemotherapy)其效果得到證實可改善多種症狀。但不可忽略臭氧(O<sub>3</sub>)本身仍具有的毒性，過量使用可能造成細胞傷害，所以進行安全性評估及其更進一步分析有其必要性。氫氣(H<sub>2</sub>)是自然界最輕的氣體，已有許多研究文獻證實飲用氫水或是吸入氫氣可以透過細胞第二訊息系統(Cellular second messenger system)和賀爾蒙調節(Hormonal regulation)的作用達到生物效用，但對免疫系統的作用仍有待研究釐清。本計畫使用歐群科技股份有限公司設備製造的微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)進行免疫細胞試驗，透過作用於先天性免疫單核球細胞株 THP-1 及後天性免疫 T 淋巴球細胞株 Jurkat 來釐清對免疫細胞存活率、抗氧化能力及免疫調節功效的影響。

研究結果顯示在微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 或微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 皆具有高度的生物安全性，不會影響 THP-1 及 Jurkat 細胞株的細胞存活率。且微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水作用於 THP-1 細胞株皆能有效降低細胞內活性氧氮物質(Reactive oxygen/nitrogen species, RONS)中的活性氧物質(ROS)、過氧化氫(Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及一氧化氮(Nitric oxide, NO)表現。當以脂多醣(Lipopolysaccharide,

LPS)誘導的 THP-1 細胞會提升活性氧物質(ROS)，但當加入微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水後皆能獲得抑制，顯示不論是微奈米氣泡臭氧水或是微奈米氣泡氫水都能保護單核球細胞免受氧化傷害。

在微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水的免疫調節功能中，臭氧水單獨作用可活化後天免疫 T 淋巴球細胞株 Jurkat 的 IL-2、IL-6 及 IL-12A mRNA 表現進而影響免疫調節功能。微奈米氣泡氫水則可活化先天免疫單核球細胞株 THP-1 的 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-10 mRNA 的表現，也可活化後天免疫 T 淋巴球細胞株 Jurkat 之 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-2 和 IL-12A mRNA 表現，顯示同時具有調節先天單核球細胞及後天免疫 T 淋巴球細胞的功能。

當以脂多醣(LPS)誘導活化單核細胞株 THP-1，發現微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水皆可降低細胞激素 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-2 mRNA 的表現，並提升 IL-6、IFN- $\gamma$  及 IL-10 mRNA 的表現。當經由佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)誘導活化 T 淋巴球細胞株 Jurkat 發現微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水皆可降低細胞激素 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-2 mRNA 的表現並提升 IL-12A mRNA 的表現，顯示微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水皆具有免疫調節功效。

本實驗結果證明微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水具有調節免疫功能，可提供未來在疾病預防及治療效用上的治療評估及學理依據。

**關鍵字：**微奈米氣泡臭氧水、微奈米氣泡氫水、單核球細胞、  
T 淋巴球細胞、免疫調節

## 英文摘要(Abstract)

Ozone gas ( $O_3$ ) is often used for environmental disinfection, in addition, it is also used in autohemotherapy to improve various symptoms which has been proven. Notably, the toxicity of ozone ( $O_3$ ) cannot be ignored, if excessive use might cause cell damage, so safety assessment and further evaluation seem to be necessary. Hydrogen ( $H_2$ ) is the lightest gas in nature. Many research documents have confirmed that drinking hydrogen water or inhaling hydrogen can achieve biological effects through the cellular second messenger system and hormone regulation. However, its effects on immune system remain unclear. This project used nano-bubble ozone water (nb- $O_3$ -water) and nano-bubble hydrogen water (nb- $H_2$ -water) produced by the equipment of Ocean Technologies Co., Ltd to explore both affection on survival and antioxidant capacity of the immune cells including innate immune monocyte cell line THP-1 and the acquired immune T lymphocyte cell line Jurkat.

Results showed that 1.2 ppm of nb- $O_3$ -water or 1,200 ppb of nb- $H_2$ -water were with high biological safety since both could not affect THP-1 and Jurkat cell lines cells' survival rate. Moreover, both nb- $O_3$ -water and nb- $H_2$ -water could effectively reduce the reactive oxygen and nitrogen species (Reactive oxygen/nitrogen species, RONS) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) as well as nitric oxide (NO) performance of the THP-1 cell line. As THP-1 cells treated with lipopolysaccharide (LPS) can increase reactive oxygen species (ROS), that could be inhibited by adding nb- $O_3$ -water or nb- $H_2$ -water suggesting both nb- $O_3$ -water and nb- $H_2$ -water could protect monocytes from oxidative damage.

In the respect of immunoregulation, nb-O<sub>3</sub>-water could activate the expression of IL-2, IL-6 and IL-12A mRNA of the acquired immune T lymphocyte cell line Jurkat by which participated in immune regulation. In the other side, nb-H<sub>2</sub>-water could activate the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 mRNA of innate immune mononuclear cell line THP-1, meanwhile, it also could activate IL-6 and TNF- $\alpha$ , IL-2 as well as IL-12A mRNA expression of acquired immune T lymphocyte cell line Jurka that suggests it could regulate both innate monocytes and acquired immune T lymphocytes.

In the LPS-treated THP-1 cells, both nb-O<sub>3</sub>-water and nb-H<sub>2</sub>-water could reduce the expression of cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-2 mRNA, whereas increase the expression of cytokines of IL-6、IFN- $\gamma$  and IL-10 mRNA. In the Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-treated T lymphocyte cell line Jurkat, both nb-O<sub>3</sub>-water and nb-H<sub>2</sub>-water could reduce the expression of cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-2 mRNA, whereas could increase the expression of IL-12A mRNA suggesting that both nb-O<sub>3</sub>-water and nb-H<sub>2</sub>-water have immune regulation effects.

The results of this study shows either nb-O<sub>3</sub>-water or nb-H<sub>2</sub>-water is with high security and can participates in immune regulation as adding to the immune cells. From this approach, it suggests nb-O<sub>3</sub>-water or nb-H<sub>2</sub>-water has the potential for therapeutic treatment which is valuable and required for further research.

**Keywords: Nano-bubble ozone water (nb-O<sub>3</sub>-water), Nano-bubble hydrogen water (nb-H<sub>2</sub>-water), Monocyte, T lymphocyte, Immune regulation**

# 目錄

誌謝.....	I
中文摘要.....	III
英文摘要(Abstract).....	VI
目錄.....	VIII
第一章 緒論.....	1
第一節 臭氧簡介.....	1
第二節 臭氧對疾病改善的機制.....	3
第三節 臭氧運用於醫療前的準備.....	10
第四節 氫分子簡介.....	11
第五節 氫分子對疾病改善的機制.....	14
第六節 氫水運用於醫療前的準備.....	27
第七節 免疫系統簡介.....	29
第八節 細胞激素.....	33
第二章 研究目的.....	41

第三章 研究方法及進行步驟.....	43
第四章 結果與討論.....	49
第一節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株存活率的影響.....	49
第二節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株的活性氧物質(ROS)、過氧化氫(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )及一氧化氮 (NO)含量的表現.....	51
第三節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水是否可抑制脂多 醣(LPS)所誘發的 THP-1 細胞株氧化壓力進而保護細胞提 升細胞存活率.....	55
第四節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株的超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化氫酶(Catalase)及麩 胱甘肽過氧化酶(GPx)之 mRNA 含量的表現.....	57
第五節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中扮演發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 之 mRNA 含量的表現影響.....	59
第六節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat	

細胞株中扮演活化後天免疫相關發炎的細胞激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$ 之 mRNA 含量的表現影響 .....	62
第七節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中抗發炎細胞激素 IL-10 之 mRNA 含量的表現影響 .....	64
第八節 以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$ 表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株的影響 .....	66
第九節 以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株調節後天免疫細胞激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$ 之表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株的影響 .....	69
第十節 以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株抗發炎細胞激素 IL-10 之表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株免疫調節的影響 .....	71
第十一節 以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$ 表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 T 淋巴細胞株免疫調節的影響 .....	73

第十二節 以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株扮演活化後天免疫發炎細胞激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$ 之表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 T 淋巴細胞株免疫調節的影響.....	75
第十三節 以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株抗發炎細胞激素 IL-10 之表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對淋巴細胞株免疫調節的影響.....	77
第五章 結論.....	79
參考文獻.....	81

# 第一章 緒論

## 第一節 臭氧簡介

臭氧(Ozone, O<sub>3</sub>)為一種氣體，於 19 世紀中被發現，是由三個氧原子組合而成的分子，以動態不穩定結構存在，該氣體無色、氣味有刺激性，在液態或固態時具有爆炸性，存在 20°C 環境溫度時的半衰期為 40 分鐘，存在 0°C 環境溫度時的半衰期約為 140 分鐘。臭氧(O<sub>3</sub>)被廣為熟知的基本功能是位於大氣層保護人類免受紫外線的輻射傷害，大氣中約有 90%的臭氧(O<sub>3</sub>)存在於離地面 15 ~ 50 公里之間的區域，也就是平流層，在平流層的較底層，也就是在離地面約 20~30 公里處，為臭氧(O<sub>3</sub>)濃度含量最高區域，即為臭氧層，含量約 50 ppm，它能吸收對人體有害的短波紫外線，減少其到達地球輻射量。

臭氧(O<sub>3</sub>)自 160 多年前開始被逐步使用於人類的生活環境及醫療中 (Elvis & Ekta, 2011)。1785 年，Van Mauren 是第一個識別出臭氧獨特氣味的人。1839 年，瑞士巴塞爾大學的德國化學家 Christian Friedrich Schonbein 在氧氣存在的情況下使用伏打電堆(Voltaic pile)發現了一種帶有電和刺激性氣味的氣體，並將其命名為臭氧，該詞源自希臘語 ozein，意為氣味(Altman, 2007, Bocci, 2011)。1860 年，瑞士化學家 Jacques-Louis Soret 隨後證明臭氧分子由三個氧原子組成(Altman, 2007)。

臭氧(O<sub>3</sub>)於 1856 年首次用於環境殺菌，隨後在 1860 年用於手術室消毒。也有一些研究顯示它具有提升抗氧化、抗發炎及調節免疫活性功能。臭氧(O<sub>3</sub>)的第一個醫療應用是在 1914 年至 1918 年第一次世界大戰期間治療德國士兵的創傷後壞疽(Bocci, 2011)。由於臭氧(O<sub>3</sub>)在此期間的預防特性，臭氧(O<sub>3</sub>)還用於當地醫療程序中的預防感染和控制傷口感染(Merin, Attias *et al.*, 2007)。物理學家 Joachim Hansler 發明了可靠的臭氧(O<sub>3</sub>)產生器，這為臭氧(O<sub>3</sub>)在醫療應用方面的帶來重大突破。如今，臭氧(O<sub>3</sub>)療法的效果雖已部分得到證實，但仍不可忽略它本身具有的毒性，尤其對抗氧化能力較為不足的組織及器官，特別是眼睛、鼻黏膜及肺部，容易引起黏膜刺激、視覺敏感、視力降低及哮喘等副作用，嚴重時可能導致肺氣腫和肺水腫，如何找出最安全及有效的臭氧濃度及使用方法，以達到有利於人體健康及疾病改善為目標，是各國研究人員都在極力努力的探討方向。

## 第二節 臭氧對疾病改善的機制

已知臭氧(O<sub>3</sub>)接觸到人體並無法穿透皮膚及黏膜而進入細胞，而是在與體液接觸時，包含：血漿、淋巴液及尿液等，就會立即產生以下的反應： $O_3 + \text{Biomolecules} \rightarrow O_2 + O^{\cdot}$ ，顯示當臭氧(O<sub>3</sub>)一旦接觸到人體後將不再以臭氧(O<sub>3</sub>)而是以活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)的形式存在(Bocci, 2006b)。活性氧物質(ROS)是生物系統中最豐富的自由基，並且在細胞代謝過程中不斷地形成(Rajendran, Nandakumar *et al.*, 2014)。當細胞氧化程度低於細胞的還原能力時，活性氧物質(ROS)對正常生理代謝過程扮演重要的角色，例如：細胞分化、蛋白質磷酸化、轉錄因子活化、細胞凋亡、細胞免疫、類固醇生成和細胞抵禦微生物能力(Miller, Brzezinska-Slebodzinska *et al.*, 1993)。在正常情況下，自由基的產生與其清除機制之間存在生理平衡(Daif, 2012)。在病理情況下則會產生過量的活性氧物質(ROS)，並透過破壞細胞脂質、蛋白質和 DNA 導致生物活性受損、蛋白質結構改變和累積受損蛋白質在組織中(Henrotin, Bruckner *et al.*, 2003)。而被氧化的分子與非氧化的分子反應後，導致更多的氧化分子的產生，更進一步損害組織(Henrotin *et al.*, 2003)。氧化壓力最終將導致細胞死亡以及細胞內容物釋放到周圍環境中。

活性氧物質(ROS)可被生物體抗氧化防禦系統有效清除，在正常生理情況下，該系統含有將自由基解毒的酵素，如過氧化氫酶(Catalase,

CAT)、麩胱甘肽過氧化物酶(GSH-peroxidases, GPx)和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD) (Ighodaro & Akinloye, 2018)。超氧化物歧化酶(SOD)可以促進超氧化自由基  $O_2^{\cdot-}$  (Superoxide anion radical)轉化為過氧化氫  $H_2O_2$  (Hydrogen peroxide)，過氧化氫( $H_2O_2$ )接續被麩胱甘肽過氧化物酶(GPx)和過氧化氫酶(CAT)分解為水和氧氣，進而抑制活性氧物質(ROS)的積累(Herbette, Roeckel-Drevet *et al.*, 2007)。過氧化氫酶(CAT)是幾乎所有耗氧生物中最重要的抗氧化酵素之一，其可透過兩步驟反應將兩個過氧化氫( $H_2O_2$ )分子分解為一個氧分子(von Ossowski, Hausner *et al.*, 1993)和兩個水分子(Deisseroth & Dounce, 1970)。反應的第一步驟為透過還原一個過氧化氫( $H_2O_2$ )分子形成一種獨特的中間體，稱為化合 I，其為一種具有卟啉-陽離子自由基(Porphyrin-cation radical)的共價氧鐵基物質(Covalent oxyferryl species) (Ivancich, Jouve *et al.*, 1997, Lardinois, 1995)。在第二個反應步驟中，透過電子供應者，第二個過氧化氫( $H_2O_2$ )的雙電子轉移將化合 I 還原，並產生游離酶、氧分子和水分子(Deisseroth & Dounce, 1970)。

活性氧物質(ROS)常見的形式有：超氧化自由基( $O_2^{\cdot-}$ )，是人體內最多的自由基；過氧化氫( $H_2O_2$ )，由超氧化自由基( $O_2^{\cdot-}$ )代謝後所產生；氫氧自由基  $OH^{\cdot}$  (Hydroxyl radical)，是破壞力最強的自由基；脂質過氧化自由基  $LOO^{\cdot}$  (Lipid hydroxide)，則是自由基經破壞脂質後的產物，可

經由體內代謝或外物入侵產生。在體內微量的自由基產生可以預防及抵禦感染性疾病的發生，也能刺激損傷細胞死亡及提升細胞抗氧化物分泌和活化免疫系統等功能，但含量過高時會引發自由基連鎖反應，導致細胞內的蛋白質、碳水化合物、脂質和核酸等被氧化，導致 DNA 受損突變，使正常細胞喪失功用、癌症、慢性病變及老化等疾病的發生。

在生物體內，會與臭氧(O<sub>3</sub>)反應的物質優先順序分別為多元不飽和脂肪酸(Polyunsaturated fatty acids, PUFAs)、抗氧化劑(Antioxidants)，如：抗壞血酸(Ascorbic acid)和尿酸(Uric acid)、具有-SH 基團的硫醇化合物(Thiol compounds)，如：半胱胺酸(Cysteine)、麩胱甘肽(Glutathione, GSH)和白蛋白(Albumin)反應，並隨著臭氧劑量的提升，也可能會與碳水化合物(Carbohydrates)、酶(Enzymes)、DNA 和 RNA 反應(Bocci, 2006b)。上述這些分子通常扮演電子供應者的角色(Electron donor)而被臭氧(O<sub>3</sub>)氧化，主要常見的反應式為：



此反應將產出 1 莫爾(Mole)的過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和 2 莫爾的脂質氧化產物(Lipid oxidation products, LOP) (Pryor, Squadrito *et al.*, 1995)。

其中過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)屬於活性氧物質(ROS)的一種，為一種非自由基的氧化劑(Non-radical oxidant)，氧化作用溫和，不容易氧化脂質、蛋白質及 DNA 等，所以可作為臭氧在生物體內調節生理功能的重要信號

傳遞分子(Ozone messenger) (Halliwell, Clement *et al.*, 2000)，具有訊息傳遞及提升宿主防禦及免疫力的功能(Bocci, 2006b)；但過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)應避免與微量 Fe<sup>2+</sup> 共同存在，因為會透過 Fenton's reaction，將其催化成氫氧自由基(OH<sup>·</sup>)，對細胞造成傷害。反應式如下： $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$  (Halliwell *et al.*, 2000)。

多元不飽和脂肪酸經與臭氧(O<sub>3</sub>)氧化形成的脂質氧化產物(LOPs)包含：LOO<sup>·</sup> (Lipoperoxides)、LO<sup>·</sup> (Alkoxy radicals)、LOOH (Lipohydroperoxides)、HNE (4-Hydroxy-2,3 transnonenal) 和 MDA (Malondialdehyde)等，這些物質大量存在時會造成細胞毒性，但低濃度存在時則可誘發體內抗氧化性酵素超氧化物歧化酶(SOD)、麩胱甘肽過氧化物酶(GPx)、麩胱甘肽還原酶(GSH-reductase, GSH-Rd)和過氧化氫酶(CAT)的表現增加，達到緩解細胞老化，降低慢性及退化性疾病的發生(Halliwell *et al.*, 2000)。

將臭氧(O<sub>3</sub>)運用於醫療全身給藥常見的模式有靜脈內、動脈內、肌肉內、皮下、腹膜內注射，但由於氣體進行靜脈注射，存在引起氧栓塞的風險，所以目前被認為最可靠的方式是使用耐臭氧玻璃瓶進行「氧氣與臭氧的自血療法(O<sub>2</sub>-O<sub>3</sub> via auto-hemotherapy, O<sub>3</sub>-AHT)」，依據患者的體重，透過化學計量方式計算獲得精確的臭氧給予濃度後，以 G19 蝴蝶針從肘靜脈抽取血液透過真空抽取方式收集入臭氧玻璃瓶內，然後再

倒入精確體積的臭氧(O<sub>3</sub>)氣體後，輕輕混合以避免起泡，約 5~10 分鐘血液完成臭氧化後，再將此重新注入患者體內。血液是一種液體組織，大約由 55%的血漿和 45%的細胞(主要是紅血球)所組成，能夠協同降低最小臭氧劑量的強氧化特性。與肺泡內襯液(Bocci, 2006a)相比，血漿中含有豐富的親水性還原劑，如：尿酸(Uric acid；約 400 μM)、抗壞血酸(Ascorbic acid；約 50 μM)、少量麩胱甘肽(GSH；約 3.4 μM)以及約 570 μM 白蛋白(Albumin)，其分子具有第 34 位保護性半胱胺酸(Cysteine)殘基和 11 個親核基團(Aldini, Vistoli *et al.*, 2008)。此外，轉鐵蛋白(Transferrin)和血漿銅藍蛋白(Ceruloplasmin)可螯合過渡金屬(Fe<sup>2+</sup>和 Cu<sup>+</sup>)以抑制氧化反應。若不螯合過渡金屬，在過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)存在下，透過 Fenton's reaction，或在超氧化自由基(O<sub>2</sub><sup>-•</sup>)陰離子超氧化物存在下，透過 Haber-Weiss 反應，將催化氫氧自由基(OH<sup>•</sup>)的形成，造成細胞損傷。當臭氧與血液或其他體液接觸時，它會釋放活性氧物質(ROS)和脂質氧化產物(LOP)，這兩種物質都會引發生物反應(Bocci, 2006b, Sciorsci, Lillo *et al.*, 2020)。常見產生的活性氧物質是過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，它很容易從血漿轉移到細胞中，其作為活性氧物質(ROS)是一種天然氧化劑，以其非離子化形式，可以自由擴散到所有血球細胞中，促使大量生化反應的發生(Sies & Jones, 2020)。血漿和紅血球的細胞質水分之間的短暫和動態梯度的形成使氧化劑成為非常早期的反應物。細胞內部環境含有豐

富的麩胱甘肽(GSH)、硫氧化還原蛋白(Thioredoxin)、過氧化氫酶(CAT)和麩胱甘肽過氧化物酶(GPx)作為中和劑。臭氧化後血液中的活性氧物質(ROS)生物學是一個非常複雜的現象，而最近得知的活性硫物質(Reactive sulfur species)作為新的活性氧物質亦可能對人類健康問題扮演重要角色(Olson, 2020)。當過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)在細胞質中存在濃度高於醫學閾值濃度時，就可能同時激活紅血球、白血球和血小板，並激發它們生化代謝途徑進行，並促進更多的生物功能，如：抗菌、免疫活化和抗氧化作用。已被證實血球細胞經低劑量臭氧(O<sub>3</sub>)刺激後可提升 IL-2 (Interleukin-2)、IFN (Interferon)和降低 TNF (Tumor necrosis factor) (Larini, Bianchi *et al.*, 2003, Sciorsci *et al.*, 2020)，及藉由增加抗氧化性酵素超氧化物歧化酶(SOD)、麩胱甘肽過氧化物酶(GPx)、和過氧化氫酶(CAT)予以清除高濃度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 對細胞可能造成的傷害(Bocci, 2006b)，但若血球細胞經高劑量臭氧(O<sub>3</sub>)刺激則可能活化 NF-κB 路徑來促進發炎相關細胞激素 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 表現，導致炎症發生(Kafoury, Hernandez *et al.*, 2007, Sciorsci *et al.*, 2020)。

氧氣與臭氧在自血療法中所扮演的角色包含：

- 一、受到臭氧(O<sub>3</sub>)刺激的紅血球，其隨著醱解作用速率的增加，細胞內 ATP 也隨之增加，進而刺激檸檬酸循環(Citric acid cycle)反應，並透過 2,3-雙磷酸甘油酸磷酸酶(2,3-Bisphosphoglycerate

phosphatase)催化產生 3-磷酸甘油酸(3-Phosphoglycerate)，伴隨  
氧合血紅素解離曲線的變化，增加氧氣輸送至組織(Scassellati,  
Ciani *et al.*, 2020)。

二、在單核細胞中，臭氧(O<sub>3</sub>)透過調節轉錄因子 NF-κB 刺激免疫反  
應，重新活化受到抑制的免疫系統(Consoli, Sorrenti *et al.*, 2021,  
Togi, Togi *et al.*, 2021)

三、在血小板中，臭氧(O<sub>3</sub>)會刺激生長因子分泌，對患有無法癒合  
的慢性傷口的患者非常有幫助(Valacchi & Bocci, 1999)。

### 第三節 臭氧運用於醫療前的準備

透過上述介紹可得知，如果想將臭氧(O<sub>3</sub>)運用於醫療，避免臭氧(O<sub>3</sub>)過量使用造成細胞傷害，至少須要做到以下三項準備(Bocci, 2006b)：

- 一、具備精密且穩定性高的臭氧製造機，並能精確測量臭氧產出濃度。
- 二、透過科學且精確方式計算治療用的 O<sub>3</sub> 使用劑量。

目前已成功運用於醫療的臭氧濃度為，當臭氧氣體濃度為 30 µg/ml 時，採以 225 ml 的臭氧氣體混合入 225 ml 血液，將血液進行臭氧化，最終將血液重新輸入回病患體內時，所投予的臭氧總劑量為 6.75 mg。

- 三、確保使用的臭氧是最佳劑量，不會對其他細胞及組織造成傷害。

有鑑於臭氧的自血療法普遍被使用，本計畫分析歐群科技股份有限公司所開發的微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)，對於血液中免疫細胞裡的單核球(Monocyte)及 T 淋巴球(T lymphoblast)細胞株 THP-1 及 Jurkat 安全使用劑量，並評估它對提升血球細胞免疫活性、抗氧化及抗發炎能力的影響，藉以提供本產品運用於生物體前的生物安全性及功效性的評估。

## 第四節 氫分子簡介

氫分子(Molecular hydrogen, dihydrogen, H<sub>2</sub>)是自然界最輕的氣體，具有電中性和非極性，可以快速穿透細胞膜及穿過血腦屏障(Blood-brain barrier) (Jiang, Niu *et al.*, 2019)。氫氣被認為是不活躍的，於正常體溫環境中氫氣在非催化的生物條件下，不與任何生物化合物發生反應，包括氧氣。另也因為哺乳動物細胞缺乏功能性氫化酶基因(Hydrogenase genes)，故氫氣被認為在哺乳動物中是無活性反應的(Yagi & Higuchi, 2013)。因為氫氣的分子量很輕，一般則認為氫氣的溶解度非常低，相較於氧分子(O<sub>2</sub>)在常溫下的溶解度約為 25 mg/L，氫的溶解度為 1.6 mg/L，而計算氫、氧分子量比為 1:16，這比值與溶解度比值是相近的，表示氫分子的溶解度與氧分子相似。

在標準環境溫度和壓力下，飲用 1 公升飽和氫水可測得血液中氫濃度達 10~20 μM，但氫分子在體內滯留的時間短，通常不超過 1 小時 (Mikami, Tano *et al.*, 2019)。此外，吸入 1~4% (v/v) 氫氣體時血液中的氫濃度約為 8~32 μM，而氫分子的分佈會因不同的器官有所差異 (Fukuda, Asoh *et al.*, 2007, Yamamoto, Homma *et al.*, 2019)，儘管氫沒有達到特定組織所需的氫濃度，氫仍可以進行細胞第二信使系統(Cellular second messenger system)和賀爾蒙調節(Hormonal regulation)的作用。

在純化學體系中(Pure chemical system)，氫氣(約 1%，v/v)可以抑制亞油酸(Linoleic acid)的自由基鏈鎖反應式(Free radical chain reaction)的自我氧化反應，而純 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC)是一種主要的磷脂，無論在有無氫氣環境下也會自動氧化，但氫氣會改變了無細胞系統中自我氧化的磷脂種類化學生產模式。以細胞培養模式中利用綜合微陣列基因分析(Comprehensive microarray analysis)結果得知氫氣具修飾自由基鏈鎖反應式的依賴性自我氧化磷脂種類 (Free radical-dependent generation of oxidized phospholipid mediators)並抑制鈣離子( $\text{Ca}^{2+}$ )信號傳導的各種基因的表現 (Iuchi, Imoto *et al.*, 2016)。

氫分子( $\text{H}_2$ )已被認為是我們體內的惰性和非功能性分子(Inert and nonfunctional molecule)。相關研究證明氫分子( $\text{H}_2$ )與細胞中的羥基自由基(Hydroxyl radical)等強氧化劑發生反應作為有益人體健康的概念，並提出其在預防和治療應用方面的潛力。氫分子( $\text{H}_2$ )具有許多優勢，可發揮廣泛的作用，例如氫分子( $\text{H}_2$ )迅速擴散到組織和細胞中，並且足夠溫和，既不會干擾代謝氧化還原反應，也不會影響具信號活性氧(Signaling reactive oxygen species)，此外氫分子( $\text{H}_2$ )通過調節各種基因表達來間接減少氧化壓力，達到抗發炎和抗細胞凋亡的作用，並能刺激能量代謝。

而氫分子(H<sub>2</sub>)似乎不同於傳統藥物，其療效好且無不良反應，氫氣在臨床上具有治療多種疾病的潛力(Ohta, 2014)。

## 第五節 氫分子對疾病改善的機制

已有許多研究證實氫分子(H<sub>2</sub>)可透過氫氣、氫水及氫鹽水等三種類型運用於生物體進行疾病的預防及治療，目前證實具有抗發炎(Anti-inflammatory)、抗凋亡(Anti-apoptosis)、抗過敏作用(Anti-allergic effects)、調節細胞死亡和自噬(Autophagy)及促進能量代謝的作用，深具治療和預防的潛力(Ohta, 2011)。文獻指出已發表超過 15,000 篇關於氫分子醫學和生物學研究，即使在較高濃度下長時間使用氫分子(H<sub>2</sub>)，也沒有觀察到不良反應(Cole, Raza *et al.*, 2019)。相關醫療功效如下：

在細胞實驗中觀察到，老鼠 RAW264.7 巨噬細胞培養於含 0.6 mM 的含氫培養液具有抑制細胞凋亡 (Apoptosis)、抑制內質網壓力 (Endoplasmic reticulum stress, ERS)與活化核因子紅細胞 2 相關因子[The nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2, Nrf2]的抗氧化作用來抑制氧化壓力(Oxidative stress) (Song, Zong *et al.*, 2015)。

### 一、細胞凋亡(Apoptosis)

Apoptosis (a-po-toe-sis)這個名詞的希臘文原義是枯萎的花朵及其花瓣的掉落，1972 年由 Kerr 等科學家對於細胞死亡的特殊型態描述(Kerr, Wyllie *et al.*, 1972)，直到 1999 年 Horvitz 等人才從線蟲(*Caenorhabditis elegans*)研究中發現，原本 1,090 個體細胞到

發育成成蟲時只剩 959 個細胞，其中有 131 個細胞進行凋亡又稱為程式性細胞死亡(Programmed cell death) (Horvitz, 1999)，由基因分析發現這些死亡過程由 egl-1、ced-3、ced-4 與 ced-9 等四個基因調控，當 egl-1、ced-3、ced-4 失去功能時，線蟲細胞中該死亡的 131 個細胞即可逃脫死亡的命運，意味著當 egl-1、ced-3、ced-4 著三個基因與凋亡有密切相關，相對的 ced-9 失去功能會在早期發育時線蟲就會死亡，所以 ced-9 扮演著抑制細胞死亡的角色。在不同物種間細胞死亡的機制是具有高度保留性的，以脊椎動物而言在型態的形成(Morphogenesis)、重塑過程(Remodeling)、再生過程(Regeneration)都需凋亡作用的參與，一旦凋亡作用失去功能，不僅會導致發育不正常、甚至和疾病的產生有密切相關，例如癌症、退化性疾病等。

## 二、內質網壓力(Endoplasmic reticulum stress, ERS)

內質網(ER)是一種大型的膜封閉細胞器，存在於所有真核生物(Eukaryotes)中，進行細胞膜和分泌型蛋白的折疊(Folding)、脂質(Lipid)和固醇類(Sterols)合成以及游離鈣的儲存場所。在生理壓力，如增加分泌的負荷時，或是病理反應，例如內質網中不能正確折疊的突變蛋白的存在，會導致蛋白質折疊需求與內質網蛋白質折疊能力之間的不平衡，從而引起內質網壓力(ER stress)。為了

感知和反應內質網壓力，真核細胞演化出一套信號傳導路徑，稱為未折疊蛋白反應(Unfolded protein response, UPR)。最常見的未折疊蛋白反應(UPR)是由一群跨膜 ER 常駐蛋白(Resident proteins)組成，包括肌醇需要蛋白 1 (Inositol-requiring protein 1, IRE1)、PKR 樣內質網激酶(PKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)和激活轉錄因子-6 (Activating transcription factor-6, ATF-6)，這些蛋白質會突出到 ER 腔中的結構區域，它可以感知 ER 壓力，並與胞質有效結構區域(Cytosolic effector domains)耦合(Couple)。當 ER 折疊蛋白質的能力變得飽和時，就會發生內質網壓力(ER stress)。內質網壓力 (ER stress) 可能由損害蛋白質糖基化 (Protein glycosylation) 或形成二硫鍵(Disulfide bond formation)所引起，也可經由進入分泌途徑(Secretory pathway)的蛋白質的過度表達或突變引起。最終，來自這些壓力感應蛋白的信號可以保護細胞，或是促進細胞死亡，以避免細胞內有過多錯誤蛋白形成造成傷害 (Lin, Walter *et al.*, 2008)。

### 三、核因子紅細胞 2 相關因子[The nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2, Nrf2]

Nrf2 是一種新興的細胞抗氧化物質調節劑。Nrf2 控制一系列抗氧化反應元件依賴性基因的基礎和誘導表達，以調節氧化物

暴露的生理和病理生理反應，Nrf2 通過多種機制調節抗氧化防禦系統，活性氧化物包括活性氧物質(ROS)，例如  $O_2^{\cdot-}$ 、 $H_2O_2$ 、 $\cdot OH$ 、 $RO_2^{\cdot}$ 、 $RO^{\cdot}$ 、 $^1O_2$ )和活性氮物質(RNS)，例如  $\cdot NO$ 、 $\cdot NO_2$  和  $ONOO^-$ ，這些活性物質通常是由於暴露於有毒或病理性損傷所誘導產生的，但是可以被龐大的的抗氧化系統所平衡，以維持細胞內的氧化還原型態，主要的抗氧化物質包括：

(一)、低分子抗氧化劑：還原型麩胱甘肽(GSH)、維生素 C 和 E、膽紅素(Bilirubin)和尿酸鹽(Urate)等。

(二)、非酵素型的抗氧化蛋白：硫氧還蛋白(Thioredoxin, Trx)、麩氧還蛋白 (Glutaredoxin, Grx) 和金屬硫蛋白 (Metallothioneins, MTs)等。

(三)、酵素型的抗氧化蛋白：超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶(Catalase)、過氧化物酶(Peroxiredoxin, Prx)和麩胱甘肽過氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPx)等。

這些抗氧化物質作用機制包括：

(一)、通過 SOD、Prx 和 GPx 誘導超氧化物(Superoxide)和過氧化物(Peroxides)的分解代謝。

- (二)、氧化性輔因子和蛋白質的再生，其中 GSSG 被 GSR 還原，Trxox 被 TrxR 還原，Prx-SO<sub>2</sub>H 被 Srx 還原。
- (三)、還原因子的合成，即 GCLC 和 GCLM 合成 GSH，G6PDH 和 6PGD 合成 NADPH。
- (四)、增加抗氧化蛋白 Trx 的表現和 Trx 抑制劑 TXNIP 的表現。
- (五)、增加氧化還原平衡，通過 xCT 轉運絲胺酸(Cysteine)/麩胺酸(Glutamate)。
- (六)、MT1、MT2 和鐵蛋白的金屬螯合作用。
- (七)、誘導壓力反應蛋白表現，如血基質氧化酶(Heme oxygenase-1, HO-1)。

此外，Nrf2 具有抗發炎作用，以化學試劑誘導的 Nrf2 缺陷病理學中通常可觀察到發炎症狀，在 Nrf2 基因缺失的小鼠身上也可發現在多個組織中出現年齡依賴性自體免疫發炎損傷現象。Nrf2 對發炎反應的抑制與 NF-κB 路徑的抑制和抑制促發炎細胞激素產生有關(Ma, 2013)。

#### 四、氧化壓力(Oxidative stress)

需氧環境下的生物個體會無法避免的產生氧化物質(Oxidant)，這是因為細胞需要能量 ATP 來維持正常生理功能，細胞必須藉由粒線體透過氧化磷酸化(Oxidative phosphorylation)作用產生 30 ~ 32 個 ATP，氧化磷酸化是經由 NADH 提供電子進行電子傳遞鏈的產生的過程，電子傳遞的同時會有 1~5%的電子去攻擊氧分子，造成未配對電子氧分子產生，此時的氧分子稱為超氧陰離子( $O_2^{\cdot-}$ )，它是屬於最早期的自由基(Free radical)並可以隨著後續反應轉化成下列各種型式的活性物質， $O_2^{\cdot-}$ 再經由細胞內抗氧化酵素-超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)催化成過氧化氫(Hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )，而  $H_2O_2$  則需由過氧化氫分解酶(Catalase)作用還原成水和氧，當  $H_2O_2$  和過渡金屬如二價鐵離子( $Fe^{2+}$ )進行 Fenton reaction 產生高度活性的 Hydroxyl radicals ( $\cdot OH$ )再去傷害 DNA、蛋白質與脂肪。除了粒線體外細胞內產生活性氧物質的來源還有 Cytochrome P-450、Cytoplasmatic oxidase、Xanthine oxidase、Microsomes 與 Peroxisome、Membrane NADPH oxidase 等酵素催化反應時釋出活性氧物質、外在環境如紫外線的照射、游離輻射照射、抽煙、攝食油炸食物等都會產生大量的自由基。

在動物實驗中，2007 年國際權威期刊 *Nature Medicine* 文獻指出 0.6 mM 氫分子可以選擇性地降低大鼠腎上腺髓質嗜鉻細胞瘤(PC12 細胞) 內羥基自由基(Hydroxyl radicals,  $\cdot\text{OH}$ )所誘導的氧化傷害，達到抗氧化作用，大鼠試驗也發現吸入 2%氫氣可以保護腦缺氧後血液再灌注所引發的傷害，故被認為具臨床運用價值(Ohsawa, Ishikawa *et al.*, 2007)。

大腦的耗氧量是非常高的，約佔總耗氧量(休息時)的 20%，但大腦內的抗氧化物質含量則相對的較低(Rice-Evans & Burdon, 1993)，故腦部比其他器官更容易受到氧化壓力的刺激，此外神經元細胞屬於後有絲分裂細胞(Postmitotic cells)，多年來積累氧化損傷，而活性氧物質(ROS)被認為是神經退行性疾病如帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, AD)、亨廷頓舞蹈病(Huntington's disease)和多發性硬化症(Multiple sclerosis)病因的重要機制，故活性氧物質(ROS)誘導的粒線體損傷尤其與帕金森病、阿茲海默氏症和其他神經退行性疾病的發生有關(Lin & Beal, 2006)。

氧化壓力(Oxidative stress)和發炎(Inflammation)是帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, AD)和其他神經退行性疾病的主要原因。許多研究發現，氫分子( $\text{H}_2$ )治療可能有助於緩解神經退行性疾病和改善老年人的生活品質。黑質和黑質紋狀體通路(Substantia nigra and nigrostriatal pathway)中的多巴胺能神經元

(Dopaminergic neurons)病變是帕金森病(Parkinson's disease, PD)的特徵，其主要影響運動系統。帕金森病(Parkinson's disease, PD)中的黑質顯現出增加氧化的蛋白質、脂質和 DNA 含量，以及減少內源性抗氧化物質(如麩胱甘肽, Glutathione)。帕金森病(Parkinson's disease, PD)的發病率隨著年齡的增長而急劇上升，從 50 至 59 歲之間的每 100,000 人每年增加 17.4 人，到 70 至 79 歲之間的每 100,000 人每年增加 93.1 人，一生中患該病的風險為 1.5%。已知神經毒素 6-羥基多巴胺(6-OHDA)和 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)透過生成 ROS 破壞神經元，可做為誘導帕金森病(Parkinson's disease, PD)的動物模型(Liberatore, Jackson-Lewis *et al.*, 1999)。由文獻資料得知，分子氫(Molecular hydrogen)用的抗氧化劑作用在減少羥基自由基(Hydroxyl radicals)，而不減少其他的活性氧和氮物質(Reactive oxygen and nitrogen species)。在帕金森病中，粒線體功能障礙和相關的氧化壓力是黑質中多巴胺能細胞流失(Dopaminergic cell loss)的主要原因。

以立體定位手術(Stereotactic surgery)注射神經毒素 6-羥基多巴胺(6-OHDA)之前或之後以氫氣濃度超過 0.4 mM (相當於室溫下的 50%飽和氫水)可減輕帕金森病(Parkinson's disease, PD)大鼠動物模式中的黑質紋狀體變性(Nigrostriatal degeneration)，此外手術後第 3、7、14、21 和 28 天以腹腔注射 5.0 mg/kg 甲基苯丙胺(Methamphetamine)誘導的行為

分析(Behavioral analysis)觀察及黑質(Substantia nigra)和紋狀體(Striatum)的酪氨酸羥化酶(Tyrosine hydroxylase)染色結果顯示氫氣能抑制多巴胺能神經元的流失，此研究結果顯示氫水能延緩帕金森病的發生和發展(Fu, Ito *et al.*, 2009)。

日本學者 Matsumoto 等人研究文獻顯示，飲用氫水的帕金森病(Parkinson's disease, PD)小鼠會增加中胃飢餓素(Ghrelin)的 mRNA 表達和分泌，飢餓素(Ghrelin)是一種刺激生長激素促分泌素(Growth hormone secretagogue)調控生長激素(Growth hormone)釋放和食物攝入能力，但此激素卻受到  $\beta 1$  腎上腺素抑制劑( $\beta 1$ -adrenoceptor blocker)所拮抗，故氫水的神經保護作用會被 D-Lys3 GHRP-6 或 Atenolol 所抑制，因此，氫氣在帕金森病(Parkinson's disease, PD)小鼠中的神經保護作用是通過增加飢餓素(Ghrelin)來達到保護效果，此研究結果證明補充氫氣的保護作用可以作為改善疾病的新策略(Matsumoto, Yamafuji *et al.*, 2013)。

衰老(Aging)被認為是阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, AD)的主要風險因素。錯誤折疊的蛋白，例如澱粉樣蛋白  $\beta$  (Amyloid  $\beta$ )和 Tau，在衰老的大腦中積累氧化壓力和發炎引發的損傷，進而導致能量衰竭(Energy failure and)和突觸失去功能(Synaptic dysfunction)。在 Sprague-Dawley (SD)雄性大鼠的腦室內注射  $A\beta$  1-42 (10  $\mu$ L)溶解於富氫鹽水 (5 ml/kg)，其中富氫鹽水濃度維持在 0.6 mmol/L，注射 10 天後，發現  $A\beta$

1-42 注射後腦組織 IL-1 $\beta$ 、8-OH-dG、JNK 和 NF- $\kappa$ B 含量皆有增加，而富氫鹽水處理後則可以下降其表現。此外也發現富氫鹽水可能通過抑制 c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)和 NF- $\kappa$ B 的活化來預防澱粉樣蛋白  $\beta$  (Amyloid  $\beta$ )沉澱所誘導的神經發炎反應和氧化壓力的傷害(Wang, Li *et al.*, 2011)。

將 Sprague-Dawley (SD)大鼠進行大腦動脈閉塞(Permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)誘導產生永久性腦缺血，再透過腹腔注射氫鹽水後，發現顯著減少閉塞體積並改善神經行為，且增加內源性抗氧化酶，例如：超氧化物歧化酶(SOD)和過氧化氫酶(CAT)的活性，並降低氧化產物，例如：8-iso-Prostaglandin F2 alpha (8-iso-PGF2 $\alpha$ )、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)和發炎相關細胞激素例如：腫瘤壞死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha, TNF- $\alpha$ )和 High mobility group box-1 protein (HMGB1)的含量，顯示含氫鹽水對永久性局部病灶腦缺血發揮神經保護作用，可藉由減少氧化壓力和發炎現象達到保護，故有潛能做為中風患者的有效治療略(Li, Dong *et al.*, 2012)。

先前研究發現 Nrf2 可以調節血基質氧化酶(Heme oxygenase, HO-1)的表現，血基質氧化酶(HO-1)分解代謝血紅素(Heme)生一氧化碳(Carbon monoxide)、游離亞鐵離子(Free ferrous ions)和膽綠素(Biliverdin)，其轉錄受 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)調節，因此血紅

素氧化酶(HO-1)參與細胞防禦對抗氧化壓力的傷害功能，故推測血基質氧化酶(HO-1)可能是神經保護的治療標的。血基質氧化酶(HO-1)突變與阿茲海默氏症(Alzheimer's disease, AD)和帕金森病(Parkinson's disease, PD)的高風險相關，在高氧環境下吸入 2% 氫氣可顯著改善血氧濃度、減少發炎症反應並誘導血基質氧化酶(HO-1)表達來改善高氧性肺損傷，顯示吸入氫氣可減少移植引起的肺損傷和誘導血基質氧化酶(HO-1)表現(Kawamura, Wakabayashi *et al.*, 2013)。

氫分子(H<sub>2</sub>)是一種無致突變性的抗氧化和抗發炎物質具預防潛力，以懷孕的 ICR 小鼠在胚胎第 17 天腹腔注射脂多醣(LPS)，建立產前發炎引發胎兒腦損傷模型，給予母鼠飲用氫水(HW)後可以降低胎兒大腦中促發炎細胞激素(Pro-inflammatory cytokines)、氧化損傷(Oxidative damage)和微膠質細胞(Microglial)活化的情形，顯示氫分子(H<sub>2</sub>)預防與具有抑制產前胎兒腦損傷發炎的效益(Imai, Kotani *et al.*, 2016)。

先前研究報告指出小腸移植(Small intestinal transplantation, SITx)期間的缺血/再灌注(Ischemia/reperfusion, I/R)損傷經常導致併發症，包括運動障礙(Dysmotility)、發炎(Inflammation)和器官衰竭(Organ failure)，如在圍手術期(Perioperative period)吸入 2% 的氫氣，可以抑制發炎症物質 CCL2、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表現，減少嗜中性粒細胞(Neutrophil)聚集。吸入氫氣可顯著改善腸道移植損傷，並通過其抗化作用預防遠端

器官發炎反應，在圍手術期給予氫氣可能是一種有效且臨床適用的腸道缺血/再灌注損傷治療策(Buchholz, Kaczorowski *et al.*, 2008)。

以瘦體素受體變異(Leptin receptor mutation)之 *db/db* 小鼠(為基因改造肥胖鼠)飲用氫水 14 天後，分析肝組織基因變化，發現增加 Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )基因的表達，使纖維細胞生長因子 21 (Fibroblast growth factor 21, FGF21)的表達增加，促進能量消耗，調解脂肪酸和類固醇代謝的 Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )路徑，以改善 *db/db* 小鼠的肥胖和糖尿病，調改善血漿甘油三酯的含量、延長壽命(Kamimura, Ichimiya *et al.*, 2016)。

C57BL/6 小鼠在飲用 0.075 ~ 0.125 mM 飽和氫水或皮下注射含氫的生理食鹽水，發現可以改善由鏈脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)誘導的第一型糖尿病現象，包括降低肌肉組織表現葡萄糖轉運子 4 (Glucose transporter-4, Glut4)及降低血糖的等功效(Amitani, Asakawa *et al.*, 2013)。

以 30 位第二型糖尿病患者每天飲用 900 ml 氫水，共 8 週，發現血漿中氧化態低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein, Ox-LDL)和游離脂肪酸濃度降低、增加脂聯素(Adiponectin)及細胞外超氧化物歧化酶(Extracellular-superoxide dismutase, EcSOD)，在 6 名葡萄糖耐受不良患者中的 4 名，飲用氫水後可使口服葡萄糖耐量試驗正常，顯示補充氫水

可能具有預防第二型糖尿病和胰島素抗性的功效(Kajiyama, Hasegawa *et al.*, 2008)。

C57BL/6 小鼠經皮下注射 GalN (800 mg/kg body weight) 合併脂多醣 (Lipopolysaccharide, LPS) (20 µg/kg body weight)、四氯化碳 (Carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) (4 ml/kg body weight) 或 二乙亞硝酸胺 (Diethylnitrosamine, DEN) (100 mg/kg body weight) 誘導肝損傷與肝硬化模式，再注射 8 ml/kg 氫鹽水進入腹腔可以預防肝損傷，也可以抑制肝硬化和代償性肝細胞增殖(Zhang, Sun *et al.*, 2011)。

以 Low-density lipoprotein receptor-knockout (LDLR<sup>-/-</sup>) 鼠餵食高脂飲食，在皮下注射氫鹽水(低劑量 0.5 ml/kg/day 或是高劑量 5 ml/kg/day)，28 天後，發現血漿中氧化態低密度脂蛋白(Ox-LDL)濃度及主動脈(Aorta)組織的活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)下降等抑制動脈粥狀硬化現象(Song *et al.*, 2015)。

## 第六節 氫水運用於醫療前的準備

透過上述可知眾多的細胞及動物文獻已證實氫氣在改善生物體健康的效益。但如何安全的運用於臨床達到改善人類的健康，仍需更多的實驗測試，以確保運用的安全性，透過上述描述也可得知氫分子運用於醫療，常見的三大使用途徑為：

### 一、吸入氫氣(H<sub>2</sub>)

主要作用部位為上呼吸道，但目前臨床上使用吸入氫氣方式被認為較危險且不方便，因當氫氣(H<sub>2</sub>)濃度高於 4.7%則有自燃的危險(Sun, Chen *et al.*, 2011)。

### 二、飲用氫水(H<sub>2</sub>-water, HW)

主要作用部位消化代謝器官，且臨床使用上受限於僅能運用在自主吞嚥能力正常的患者。

### 三、注射氫鹽水(H<sub>2</sub>-rich saline, HS)

可透過局部注射方式廣泛的運用在各種組織及器官，包含皮下注射及腹腔注射等，所以更適合臨床應用。氫溶解於鹽水製備方式為：高壓 0.4 MPa 下將 H<sub>2</sub> 氣體溶解入生理食鹽水達 6 小時，使其達到超飽和狀態，之後將飽和氫鹽水經  $\gamma$  射線照射後滅菌，

儲存於鋁製袋內，大氣壓力下 4°C 保存，利用氣相層析儀分析氫  
濃度，平均可得濃度為 0.85 mmol/l。

雖然相較於臭氧水，氫水普遍被認為具要較高度的生物安全性，但  
若要提升其於臨床上應用的廣泛性，不僅透過吸入或飲用方式，而甚至  
可藉由腹腔注射、靜脈注射或皮下注射等方式達到更全面的治療運用，  
就應該更進一步進行分析其直接作用於細胞的安全性及有效性。

本計畫擬分析歐群科技股份有限公司所開發的微奈米氣泡氫水(nb-  
H<sub>2</sub>-water)，對於血液中免疫細胞裡的單核球(Monocyte)及 T 淋巴球(T  
lymphoblast)細胞株 THP-1 及 Jurkat 安全使用劑量，並評估它對提升血  
球細胞免疫活性、抗氧化及抗發炎能力的影響，藉以提供本產品運用於  
生物體前的生物安全性及功效性的評估。

## 第七節 免疫系統簡介

免疫系統(Immune system)的功能在於保護身體、對抗感染及疾病，它是一個高度整合且複雜的宿主防禦系統，包括了許多生物結構，從單個細胞到整體器官，以及許多複雜的生物反應過程。這些細胞、化學物質和生物作用過程可以保護皮膚、呼吸道、腸道和其它組織免受外來危害物質、病毒、細菌、真菌、寄生蟲及毒素的侵害。在人類和大多數其它脊椎動物中，免疫系統由分層防禦組成，這些防禦對特定病原體或腫瘤細胞具有更高的特異性(Maggini, Pierre *et al.*, 2018)。

人體免疫系統的分層防禦會依其反應時間及參與免疫細胞的不同，主要可分成兩個系統包括先天免疫系統(Innate immunity system)和後天性免疫系統(Adaptive immunity system)。

先天免疫系統(Innate immunity system)是抵禦入侵病原體的第一道防線。它是一種獨立於非特異性抗原的防禦機制，由宿主立即或在遇到抗原後數小時內反應。先天免疫反應沒有免疫記憶，因此，身體將來暴露於相同的病原體，它就無法識別或記憶相同的病原體。先天免疫有四種類型的防禦屏障(Turvey & Broide, 2010)，如下說明：

### 一、物理屏障(皮膚和黏膜)

在人類中，皮膚和黏膜是抵禦病原體的第一道防線，當被感染或病變破壞時，皮膚中的先天免疫機制幾乎立即開始

激活。

## 二、化學屏障(溫度、低 pH 值和化學介質)

以各種生化產物對抗外來病原體以保護人體健康。包括溫度、低 pH 值、化學物質(溶菌酶、干擾素、補體)等。

## 三、吞噬/內吞屏障(Phagocytic/endocytic barriers)

各種細胞以內吞作用分解外來大分子。微生物侵入宿主體內，在血液、淋巴循環系統及內臟器官內會被具有吞噬能力的嗜中性球(Neutrophil)、單核球(Monocyte)、網狀內皮系統中的巨噬細胞(Macrophage)、樹突細胞(Dendritic cell)，以及肥大細胞(Mast cell)、嗜酸性球(Basophil)及自然殺手細胞(Natural killer cell)等，將微生物消滅。

## 四、發炎屏障(Inflammatory barrier)

當健康組織受到物理/化學刺激或細菌、病毒或毒素侵入時，為了對抗外來物，皆會引起發炎反應，而產生局部的紅、腫、熱、痛及全身性發燒等發炎反應。在受到感染時，在感染處會引起大量免疫細胞和分子的聚集，並造成急性發炎反應，同時形成一種防止感染擴散的物理屏障，並幫助受損組織的癒合，也可以透過產生化學因子來促進血管擴張、聚集嗜中性球和吞噬細胞。

## 後天性免疫系統(Adaptive immunity system)

後天性免疫又稱為適應性免疫，其特點是記憶能力，它使宿主能夠在隨後暴露於抗原時產生更快速和有效的免疫反應，當外來抗原首次入侵時，宿主體內會自動產生屬於這個外來物的抗體，啟動具有專一性的保護作用，當下次遇到相同抗原入侵時，免疫系統就可以發揮其記憶的特性，產生強大且快速的免疫反應去攻擊和清除此抗原，而依據不同媒介及清除不同的微生物，可區分為細胞免疫反應(Cell-mediated immunity)及體液性免疫反應(Humoral immunity) (Bonilla & Oettgen, 2010)。

### 一、細胞免疫反應(Cell-mediated immunity)

主要由 T 淋巴細胞(T lymphocyte)所調控，發生在被感染的細胞中。這個病原體的抗原會表現在細胞表面或是在抗原呈現細胞上。T 淋巴細胞佔淋巴球的 70 ~ 80 %，其中輔助型 T 細胞(Helper T cell)的表面抗原標誌為  $CD_4^+$ ；毒殺型 T 細胞(Cytotoxic T cell)的表面抗原標誌為  $CD_8^+$ 。輔助型 T 細胞會透過釋放細胞激素去活化 T 細胞使其結合在被感染細胞的 MHC 抗原複合物上，並誘導 T 細胞分化為毒殺型 T 細胞，而這個被感染的細胞接下來會進入裂解作用(Lysis) (Gabrilovich & Nagaraj, 2009)。

## 二、體液免疫反應(Humoral immunity)

是一種抗體介導的反應，當在體內檢測到外來物質(抗原)時就會發生這種反應。這種機制主要由 B 淋巴細胞(B lymphocyte)負責，B 淋巴細胞是一種在檢測到特定抗原後會產生抗體的免疫細胞，佔淋巴球 10~15%，可以由表面抗體結合外來抗原或細胞激素的刺激而被活化成漿細胞(Plasma cell)，而漿細胞可以產生五種不同類型的抗體(Antibodies, Ab)，來完成體液免疫，漿細胞所產生的抗體為免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)，共有五種，包括 IgG、IgA、IgE、IgM 及 IgD，其各有不同的免疫作用，可與抗原產生凝集(Agglutination)、沉澱(Precipitation)、中和(Neutralization)及裂解(Lysis)反應，將外來微生物消滅。

## 第八節 細胞激素

細胞激素(Cytokines)為一種化學介質，可調節免疫細胞平衡並協調不同免疫反應的訊息傳遞路徑。其為一種低分子量(約為 6 ~ 70 kDa)的可溶性蛋白質，由多種細胞，包含：淋巴細胞(Lymphocyte)、巨噬細胞(Macrophage)、自然殺手細胞(Natural killer cell)、肥大細胞(Mast cell)和基質細胞(Stromal cell)所分泌。它們可誘導免疫反應的發生並作為免疫系統訊號傳輸網絡的重要介質(Kulbe, Chakravarty *et al.*, 2012, O'Shea & Murray, 2008)。細胞激素負責動態調節免疫細胞的成熟、生長和反應能力，對於生物體健康與否扮演重要決定因素(Burska, Boissinot *et al.*, 2014, Kabel, 2014, Neurath, 2014)。

一種細胞激素可由不同的細胞類型分泌，並可以作用於多種細胞類型，產生各種生物活性(Sprague & Khalil, 2009)。血清、血液、糞便、唾液和汗液等各種生物體液中細胞激素水平的變化，為各種疾病的診斷、分期和預後提供了有價值的資訊。舉例來說，細胞激素風暴的發生，致使細胞激素異常或增加將導致器官衰竭和死亡。一個共識是“細胞激素風暴症候群(Cytokine storm syndrome)”是導致 2019 年新冠狀病毒(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)危重病例預後不良的原因(Mehta, McAuley *et al.*, 2020, Moore & June, 2020)。因此，細胞激素水平被認為是評估疾病的重要指標。細胞激素的訊息傳遞路徑網絡包括多個調節檢

查點，通常涉及回饋抑制作用(Feedback inhibition)；這個過程使組織回復到相對靜止的非發炎性免疫耐受狀態(Immunotolerance)。然而，促發炎細胞激素(Proinflammatory cytokines)會提醒免疫系統注意潛在感染或危險的存在，但失調的細胞激素會導致免疫病理學。細胞激素的準確定量在臨床環境中提供了有價值的資訊，以監測患者的免疫狀態和調整不同疾病的治療，包括氣喘(Asthma) (Berry, Hargadon *et al.*, 2006)、動脈粥狀硬化(Atherosclerosis) (Ohta, Wada *et al.*, 2005)、癌症(Cancer) (Massague, 2008)、憂鬱症(Depression) (Dowlati, Herrmann *et al.*, 2010)、心臟病 (Guilherme, Cury *et al.*, 2004)、後天免疫缺乏症候群(Acquired immune deficiency syndrome, AIDS) (Brockman, Kwon *et al.*, 2009)、腎損傷(Sanz, Sanchez-Nino *et al.*, 2011)、敗血症(Bozza, Salluh *et al.*, 2007)、類風濕性關節炎(McInnes & Schett, 2007)和其他慢性疾病(Barnes, 2003)。

細胞激素可分為許多類型，包含：腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factors, TNFs)、介白素(Interleukins, ILs)、淋巴激素(Lymphokines)、單核球激素(Monokines)、干擾素(Interferons, IFNs)、群落刺激因子(Colony stimulating factors, CSFs)和轉化生長因子(Transforming growth factors, TGFs)。

根據細胞來源，細胞激素可分為第一型細胞激素及第二型細胞激素。

### 第一型細胞激素

由 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>第一型輔助性 T 細胞(T-helper 1 cell, Th1 cell)所分泌，包含：  
IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\beta$ 。

### 第二型細胞激素

由 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>第二型輔助性 T 細胞(T-helper 2 cell, Th2 cell)所產生，包含：  
IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 和 IL-13 (Sprague & Khalil, 2009)。根據細胞激素的作用，也可分為促發炎或抗發炎特性(Sprague & Khalil, 2009)。

促發炎細胞激素包含：IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12、TNF- $\alpha$  和干擾素 (IFN)，可促進發炎反應並傾向於刺激免疫活性細胞(Immunocompetent cell)。促發炎細胞激素具有的免疫特性有利於宿主及時抵抗環境中或皮膚和腸道內源性菌群的細菌和其他微生物的入侵(Dinarello, 2000)。巨噬細胞釋放的促發炎性細胞激素對於抵禦感染非常重要(Cheng, Yan *et al.*, 2014)。巨噬細胞是宿主防禦細菌感染的第一道防線，在適應性免疫反應的啟動中扮演重要角色，會受到細菌產物的刺激並釋放多種促發炎細胞激素，包括 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、IL-18、IFN- $\alpha/\gamma$  和 TNF- $\alpha$ 。而這些細胞激素也直接誘導巨噬細胞的發炎活性：IL-1，包含：IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ，表現在各種組織和細胞，尤其是在淋巴器官的巨噬細胞中，包括

胸腺(Thymus)、脾臟(Spleen)、淋巴結(Lymph node)、培氏斑塊(Peyer's patch)和骨髓(Bone marrow)。具有強烈的促發炎活性，可直接抑制體外細胞生長並活化細胞毒殺作用，在宿主對外源性和內源性有害刺激的反應中扮演主要角色(Gabay, Lamacchia *et al.*, 2010)。

### 介白素-1 $\beta$ (Interleukins, IL-1 $\beta$ )

介白素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )作為免疫反應的放大器(Dinarello, 2014)，具有強大的熱原活性(Pyrogenic activity)，被廣泛認為可有效啟動先天免疫反應和塑造適應性免疫反應以解決急性發炎症狀(Garlanda, Dinarello *et al.*, 2013)。然而，IL-1 $\beta$  作為有益處的免疫調節者觀點受到了以下的挑戰：文獻指出，發炎小體(Inflammasomes)中的新增功能的突變(Gain-of-function mutations)會導致 IL-1 $\beta$  產生過多，導致自體免疫(Autoimmune) (Cordero, Alcocer-Gomez *et al.*, 2018) 並引起自身發炎症疾病 (Autoinflammatory diseases) (Dinarello, 2014)。此外，在慢性發炎症狀的情況下，持續的 IL-1 $\beta$  分泌可能透過不同的機制促進腫瘤生長和增殖 (Garlanda *et al.*, 2013)。

### 介白素-6 (Interleukins, IL-6)

介白素-6 (IL-6)被認為是免疫和發炎反應的主要調節者，對於調節 B 細胞和 T 細胞反應以及協調先天免疫系統和適應性免疫系統的活動

非常重要。先前的研究指出了細胞激素 IL-6 的大量生物學功能，確立了 IL-6 作為多效細胞激素並且參與生物體健康的維持和疾病的發生 (Hunter & Jones, 2015)。一般來說，IL-6 可維持生物體恆定功能，包含免疫細胞增殖和分化、代謝功能，以及由於免疫活性失調引起的促發炎反應。因此，針對 IL-6 做標靶治療時，需保留 IL-6 的恆定功能以避免嚴重的長期副作用至關重要。相比之下，IL-6 的促發炎活性通常與增加和/或持續地蛋白質表現和活性相關，需要被抑制以有效控制疾病。抗 IL-6 治療已在許多人類發炎症性疾病中執行，如：類風濕性關節炎 (Rheumatoid arthritis) (Garbers, Heink *et al.*, 2018)。

#### 介白素-12 (Interleukins, IL-12)

介白素-12 (IL-12) 可增強 T 細胞反應並且誘導許多其他激素的分泌，包括 IL-2、TNF- $\alpha$  和顆粒細胞-巨噬細胞集落刺激因子 (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) (Trinchieri, 2003)。而介白素-12 (IL-12) 誘發 IL-2 可參與活化 T 細胞產生 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$ ，IL-2 還可以增強自然殺手細胞 (Natural killer cells, NK cells) 的細胞溶解活性 (Lenardo, 1991, Sakaguchi, Yamaguchi *et al.*, 2008)。因此，IL-2 在治療方面用於刺激活化免疫系統 (Smith & Humphries, 2009)。文獻指出，IL-2 在調節型 T 細胞的分化和存活中扮演重要角色，從而確保了它們在控制免疫反應中的重要性 (Malek, Yu *et al.*, 2008)。

## 干擾素(Interferons, IFN)

干擾素(IFN)是由宿主淋巴細胞為對抗病原體而分泌的糖蛋白細胞激素。IFN 透過與受體相互作用，活化訊息傳遞及轉錄活化蛋白(Signal transducer and activator of transcription, STAT)訊號複合物活化免疫細胞，進而清除生物體中的病原體或腫瘤細胞。IFN $\gamma$  主要由活化的第一型輔助性 T 細胞(Th1)和自然殺手細胞(NK cell)細胞產生，較小程度上由巨噬細胞、樹突狀細胞(Dendritic cells, DC)和 B 細胞產生(Darwich, Coma *et al.*, 2009, Schoenborn & Wilson, 2007)。IFN $\gamma$  可直接執行抗腫瘤免疫反應(Dunn, Koebel *et al.*, 2006, Parker, Rautela *et al.*, 2016)，透過(1)直接抑制腫瘤細胞增殖，同時增加主要組織相容性複合物(Major histocompatibility complex, MHC)表達、抗原呈現，進而增加抗原性和細胞死亡；(2)增強腫瘤浸潤性免疫細胞，包含：Th1 細胞、毒殺型 T 細胞(Cytotoxic T cell, CTL)和巨噬細胞的功能來抑制腫瘤；(3)抑制調節型 T 細胞(Regulatory T cell, Treg)細胞功能；(4)調節基質細胞功能，改變細胞代謝並抑制血管生成。IFN- $\gamma$  是先天性抗病毒反應的重要成員，文獻指出，感染第 2 型單純疱疹病毒(Herpes simplex virus 2, HSV-2)的情況下，不產生 IFN- $\gamma$  會導致病毒複製增加和存活率降低(Thapa, Kuziel *et al.*, 2007)。事實上，IFN- $\gamma$  已被證明可誘導周圍細胞產生 NO，其為一種有效的病毒複製抑制劑(Karupiah, Xie *et al.*, 1993)。具有抗病毒功能的 IFN-

$\gamma$  對抗原呈現細胞(Antigen presenting cells, APC)的影響主要透過增強適應性抗病毒反應的刺激，以清除感染並產生記憶作為未來感染的保障 (Goldszmid, Caspar *et al.*, 2012)。IFN- $\gamma$  為推進 Th1 反應的重要分子，在 T 細胞啟動過程中增強抗原呈現過程，幫助宿主對抗病毒感染。

### 腫瘤壞死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factors, TNF- $\alpha$ )

腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )為對多種細胞類型具有多效性作用的細胞激素，被認為是發炎反應的主要調節因子，並且參與一些發炎和自體免疫疾病的發病機制(Bradley, 2008)。在結構上，TNF- $\alpha$  是由 157 個胺基酸組成的同源三聚體蛋白，主要由活化的巨噬細胞、T 細胞和自然殺手細胞所分泌(Horiuchi, Mitoma *et al.*, 2010)。可誘發一系列不同的發炎分子，包含其他細胞激素和趨化激素(Chemokines)。在生理學上，TNF- $\alpha$  是正常免疫反應的重要組成部分。TNF- $\alpha$  可以調節免疫系統的活化；然而，TNF- $\alpha$  的不當或過量產生可能有害並可能導致疾病。類風濕性關節炎(Choy & Panayi, 2001)、發炎性腸道疾病(Inflammatory bowel disease, IBD) (Adegbola, Sahnun *et al.*, 2018)、乾癬性關節炎(Psoriatic arthritis, PsA)和乾癬(Psoriasis, PS) (Celis, Cuervo *et al.*, 2019) 均由異常分泌的 TNF- $\alpha$  所導致。因此，TNF- $\alpha$  被認為是病理發展的關鍵因素。

另一方面，IL-4、IL-6、IL-10、IL-11、IL-13、IL-1 受體拮抗劑(IL-1 receptor antagonist, IL-1RA)和 TGF- $\beta$  等抗發炎細胞激素可抑制免疫細胞分泌促發炎細胞激素進而抑制發炎反應(Boshtam, Asgary *et al.*, 2017)，例如 IL-6 則具有促發炎和抗發炎特性的多效細胞激素，一種細胞激素可能由不同的細胞所分泌，並根據環境的不同具有促發炎或抗發炎活性，從而引發多種免疫反應(Monastero & Pentyala, 2017)。因此，促發炎細胞激素和抗發炎細胞激素之間的動態和不斷變化的平衡在調節宿主免疫系統的反應扮演重要角色。

## 第二章 研究目的

本計畫擬使用歐群科技股份有限公司提供的微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)進行對免疫細胞活性影響分析試驗，因目前已有文獻證實臭氧或是氫分子對疾病治療有效，但在免疫系統中扮演的角色尚未被探討。故本計畫以人類單核球細胞株 THP-1 (Human acute monocytic leukemia cell line)及人類 T 淋巴球白血病細胞株 Jurkat (Human acute T lymphocyte leukemia cell line)進行以下實驗分析：

### 一、細胞存活率分析

釐清微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)對 THP-1 及 Jurkat 細胞株存活率的影響，並釐清可安全使用劑量。

### 二、細胞內氧化物分析

包含活性氧物質(ROS)、一氧化氮(NO)、過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)含量及抗氧化物超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化氫酶(Catalase)、麩胱甘肽過氧化酶(GPx)活性分析，藉以評估對氧化壓力(Oxidative stress)的影響。

### 三、細胞內發炎細胞激素分析

當免疫細胞被活化時會產生大量發炎性細胞激素 (Inflammatory cytokines)，於是我們擬分析細胞內發炎及抗發炎細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$  和 IL-10 分泌情形來驗證單核球細胞及 T 淋巴球細胞在微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)處理下對先天及後天免疫系統的影響。

### 四、細胞分裂素(Mitogen)誘導免疫細胞發炎時，微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)對免疫調節的影響

藉由脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)誘導 THP-1 細胞株活化或佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)誘導 Jurkat 細胞株活化後，評估此時免疫細胞株細胞內發炎及抗發炎細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$  和 IL-10 分泌情形。

企望本計畫研究結果可以提供微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)對免疫系統影響的學理依據，並提供未來在未來疾病預防及治療的學理依據效用評估。

### 第三章 研究方法及進行步驟

#### 一、微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)或微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)來源

本計畫試驗採用的微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)或微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)乃由歐群科技股份有限公司研發的「微奈米氣泡臭氧殺菌水設備」及「微奈米氣泡氫水機」所製成。

#### 二、細胞培養(Cell culture)

本計畫使用人類單核球細胞株 THP-1 (Human acute monocytic leukemia cell line)及人類 T 淋巴球白血病細胞株 Jurkat (Human acute T lymphocyte leukemia cell line)做為評估微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水作用於先天免疫單核球細胞及後天免疫淋巴細胞功能調節所扮演的角色。培養方法如下說明：

##### (一)、人類單核球細胞株 THP-1 細胞株的培養

THP-1 細胞株購自台灣食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute ; BCRC Number : 60430)，此細胞株源自於一名患有急性單核細胞白血病(Acute monocytic leukemia)的1歲男童周邊血液，常被用來作為單核球研究用。培養於 RPMI 1640 medium (含 2 mM L-Glutamine、10% Fetal bovine serum、4.5 g/L Glucose、

10 mM HEPES、1.0 mM Sodium pyruvate 及 0.05 mM 2-Mercaptoethanol) 中，並置於 37°C 培養箱中培養。

## (二)、人類 T 淋巴球白血病細胞株 Jurkat 細胞株的培養

Jurkat 細胞株購自台灣食品工業發展研究所(Food Industry Research and Development Institute ; BCRC Number : 60424)，此細胞株 Jurkat-Clone E6-1，為 Jurkat-FHCRC 的衍生株，源自於一名 14 歲男孩的周邊血液。Jurkat 培養於 RPMI 1640 medium (含 2 mM L-Glutamine、10% Fetal bovine serum、4.5 g/L Glucose、10 mM HEPES 及 1.0 mM Sodium pyruvate) 中，並置於 37°C 培養箱中培養。

## 三、細胞存活率分析(Enhanced Cell Counting Kit 8, WST-8 / CCK8)

利用淡黃色之 WST8 (Water soluble tetrazolium 8) 水溶液，受到活細胞內去氫酶(Dehydrogenase)的一連串氧化還原反應後，會被還原成橘色水溶性之 Formazan，因此活細胞的數目與橘色 Formazan 所呈現之顏色深淺成正比關係，可藉由偵測 Formazan 之吸光值(波長 450 nm)大小來統計活細胞增殖多寡，進而分析細胞的存活比例。實驗方法如下：

THP-1 或 Jurkat 細胞株以  $5 \times 10^3/100 \mu\text{l/well}$  密度培養在 96 well plate 中，以不同濃度的微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水於 37°C 單獨作用 24 小時後，將 10  $\mu\text{l}$  的 WST8 溶液與細胞液混合均勻，於 37°C 培養箱，避光

反應 1~4 小時後，藉由 96 孔盤分光光度計(96-well plate photometer)在 450 nm 波長下讀取其吸光值，計算細胞存活率，探討其安全作用劑量，以供往後實驗採用劑量之依據。

#### 四、分析氧化壓力(Oxidative stress)的表現

本重點擬探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水單獨作用於 THP-1 或 Jurkat 細胞株時是否可抑制的細胞內氧化壓力產生，或以細胞分裂素誘導 THP-1 或 Jurkat 細胞株氧化壓力產生後，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水所扮演的保護角色，透過偵測活性氧氮物質 (Reactive oxygen/nitrogen species, RONS) 中的活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS)、一氧化氮(Nitric oxide, NO)及過氧化氫(Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)表現量來進行評估。並進一步透過分析抗氧化酶(Antioxidant enzyme)如超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、過氧化氫酶(Catalase)與麩胱甘肽過氧化酶(Glutathione peroxidase, GPx)表現，來釐清微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水作用於免疫細胞是否具有抗氧化的角色。實驗方法如下：

THP-1 或 Jurkat 細胞株以  $2 \times 10^6/5\text{ml}$  密度培養在 TPP tissue culture tube 中，以不同濃度的微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水於 37°C 單獨作用，或是以微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水預先作用 1 小時，再加細胞分裂素(Mitogens)誘導 THP-1 或 Jurkat 細胞株氧化壓力產生，評估微奈米

氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水於免疫細胞抗氧化所扮演的角色。

### (一)、 偵測細胞內活性氧物質(ROS)的含量

利用 DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)進入細胞後會被細胞中 Esterase 作用形成 2',7'-Dichlorofluorescein 反應，當細胞內有自由基存在時，多量的自由基會和 2',7'-Dichlorofluorescein 反應，將原本不具螢光反應的 2',7'-Dichlorofluorescein 反應成可以產生螢光反應的化合物。利用流式細胞儀以 FL-1 (Filter-1; 525 nm Bandpass Filter)參數分析細胞螢光強度，再利用 FCSalyzer version 0.9.22 軟體分析相對於控制組的螢光強度百分比。

### (二)、 偵測細胞內一氧化氮(Nitric oxide, NO)的含量

利用 NO 特異性螢光染劑 4-Amino-5-methylamino-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DAF-FM)偵測細胞內 NO 含量，利用流式細胞儀以 FL-1 (Filter-1; 525 nm Bandpass Filter)參數分析細胞螢光強度，再利用 FCSalyzer version 0.9.22 軟體分析相對於控制組的螢光強度百分比。

### (三)、 偵測細胞內過氧化氫(Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的含量

利用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 特異性螢光染劑 Mitochondria peroxy yellow 1 (MitoPY1) 偵測細胞內 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量，利用流式細胞儀以 FL-1 (Filter-1; 525 nm Bandpass Filter)參數分析細胞螢光強度，再利用 FCSalyzer version 0.9.22

軟體分析相對於控制組的螢光強度百分比。

#### **(四)、即時定量聚合酶連鎖反應(Real-Time Quantitative PCR, qPCR)**

**分析抗氧化基因:超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化氫酶(Catalase)**

**及麩胱甘肽過氧化酶(GPx)之 mRNA 表現**

定量 PCR 是指利用 SYBR Green 螢光探針靈敏地分析 PCR 產物含量，再根據可偵測到最低螢光量時的 PCR 循環數即為 Ct 值(Cycle of threshold)，並利用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  公式，算出目標基因(Target gene) mRNA 的表現量，此法較傳統 PCR 靈敏度高且有效節省實驗時間。取 100 ng cDNA 加入 200 nM Forward primer、200 nM Reverse primer、d.d.H<sub>2</sub>O 及 1×SYBR Green Master Mix，混合均勻，最後總體積為 25 μl，放置螢光定量 PCR 熱反應循環機，反應條件：Stage I：50°C，2 分鐘；95°C，10 分鐘；Stage II：95°C，15 秒；60°C，1 分鐘；共 40 循環。以 RPS18 (Ribosomal Protein S18)作為 House-keeping gene。

#### **五、偵測發炎性激素(Inflammatory cytokines)的表現**

故本重點擬探討微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水對單核球細胞及 T 淋巴球細胞內發炎及抗發炎細胞激素 IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-2、IL-12、IFN-γ 和 IL-10 分泌影響，並藉由脂多醣(Lipopolysaccharide, LPS)誘導 THP-1 細胞株活化或佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(Phorbol 12-

myristate 13-acetate, PMA)誘導 Jurkat 細胞株活化後，評估此時免疫細胞株細胞內發炎及抗發炎細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12、IFN- $\gamma$  和 IL-10 分泌情形。實驗方法如下：

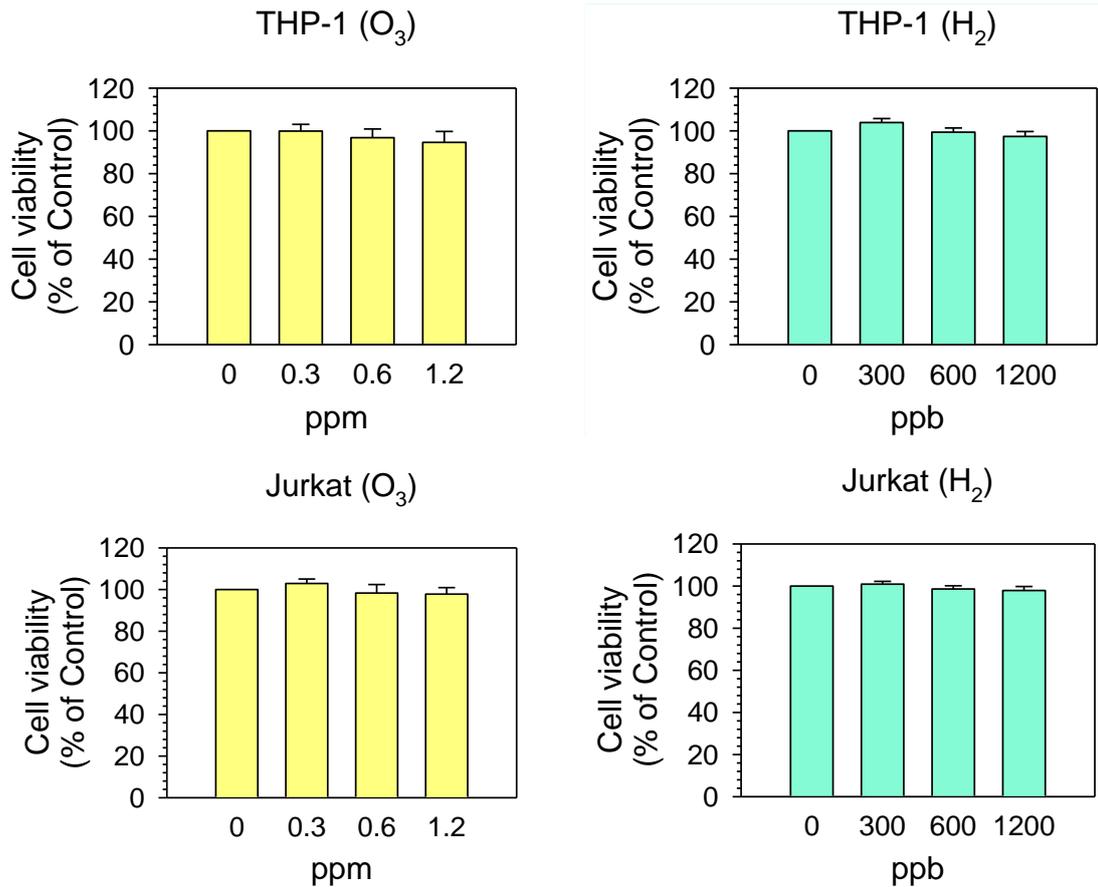
THP-1 或 Jurkat 細胞株以  $2 \times 10^6/5\text{ml}$  密度培養在 TPP tissue culture tube 中，以不同濃度的微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水於 37°C 單獨作用，或是以微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水預先作用 1 小時候，再加脂多糖(LPS)或佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 THP-1 或 Jurkat 細胞株發炎相關細胞激素產生，藉以評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水於免疫細胞抗發炎所扮演的角色。以即時定量聚合酶連鎖反應(Real-Time Quantitative PCR, qPCR)分析發炎細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-12 和 IFN- $\gamma$  之 mRNA 表現。[詳見研究方法及進行步驟之四、(四)]。

## 第四章 結果與討論

### 第一節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株存活率的影響

本論文先釐清歐群公司所開發的微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水製造機所產製的微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)於體外細胞試驗中的安全作用劑量，首先分析微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水單獨作用下對 THP-1 及 Jurkat 細胞株的細胞存活率影響，藉以篩選適合的濃度用以評估損害或保護機制。

結果顯示 THP-1 或 Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 0.3、0.6 和 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 300、600 和 1,200 ppb 作用 24 小時後，以 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 試劑套組分析細胞存活率。結果顯示即使是高濃度的微奈米氣泡臭氧水或是微奈米氣泡氫水也不會對 THP-1 或 Jurkat 細胞株造成生存毒性(圖一)，顯示良好的細胞安全性，故選擇最高濃度微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 作為後續實驗觀察。



圖一、微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株存活率的影響。

THP-1 或 Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 0.3、0.6 和 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 300、600 和 1,200 ppb 作用 24 小時後，以 CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 試劑套組分析細胞存活率。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean ± SD, n=3)。

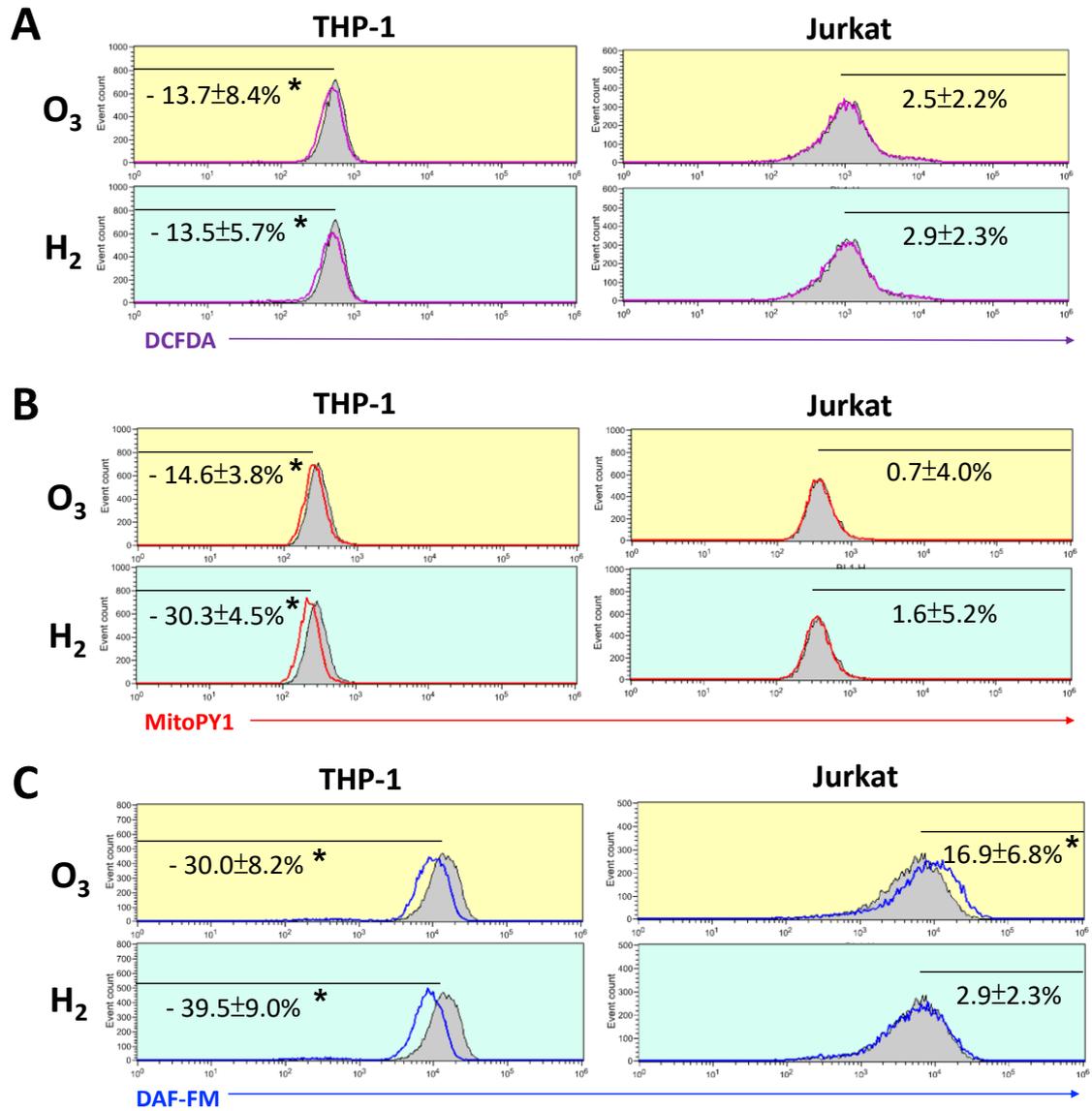
## 第二節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株的活性氧物質(ROS)、過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)及一氧化氮(NO)含量的表現

活性氧氮物質(Reactive oxygen/nitrogen species, RONS)常見的形式有：超氧化自由基 O<sub>2</sub><sup>-</sup>(Superoxide anion radical)、過氧化氫 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Hydrogen peroxide)、氫氧自由基 OH·(Hydroxyl radical)及一氧化氮 NO(Nitric oxide)，這些物質在細胞內含量適當時具有調整免疫，過高時則會引發自由基連鎖反應，使細胞內的蛋白質、碳水化合物、脂質和核酸等被氧化，導致 DNA 受損突變，使正常細胞喪失功用、癌症、慢性病變及老化等疾病的發生。為釐清微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水對於免疫細胞內活性氧氮物質表現量的影響，所以利用下述三種螢光染劑進行分析。

首先利用 DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)偵測細胞內 ROS 表現，結果顯示 THP-1 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 3 小時後，ROS 表現呈統計意義下降，Jurkat 細胞株則不受影響(圖二、A)。利用 Mitochondria peroxy yellow 1 (MitoPY1) 偵測細胞內 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量，結果顯示 THP-1 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 3 小時後，H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 表現呈統計意義下降，Jurkat 細胞株則不受影響(圖二、B)。

利用 4-Amino-5-methylamino-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DAF-FM) 偵測細胞內 NO 含量，結果顯示 THP-1 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 3 小時後， $H_2O_2$  表現呈統計意義下降，Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水刺激下 NO 含量成統計意義增加，但微奈米氣泡氫水刺激下則不受影響(圖二、C)。

本實驗結果證實了高濃度的微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水不但不會影響免疫細胞存活率，也不會顯著提升免疫細胞活性氧氮物質表現，生物體長期飲用下應具有一定的安全性。



圖二、探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株的細胞活性氧物質 (ROS)、過氧化氫 (Hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 及一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 含量的表現。

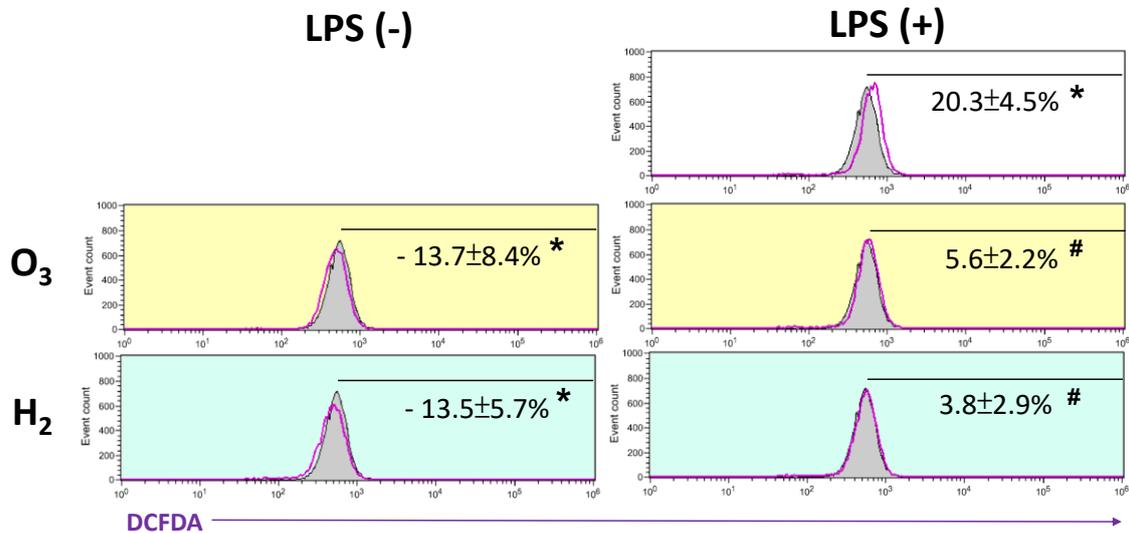
THP-1 或 Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 3 小時後，(A) ROS 的表現，利用 DCFDA 染色，以流式細胞分析儀測定，灰色直方圖為未加藥處理的控制組，紫線為加藥組；(B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的影響，利用 MitoPY1 染色，以流式細胞分析儀測定，灰色直方圖為未加藥處理的控制組，紅線為加藥組；(C) NO 的影響，利用 DAF-FM 染色，以流式細胞分析儀測定，灰色直方圖為未加藥處理的控制組，藍線為加藥組。流式細胞分析儀測定結果以 FCSalyzer v.0.9.20-alpha 分析並繪圖(mean ± SD, n=3)，圖中呈現數值為相對於控制組螢光強度百分比。\*：p < 0.05 與控制組比較。

### 第三節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水是否可抑制脂多醣(LPS)所誘發的 THP-1 細胞株氧化壓力進而保護細胞提升細胞存活率

由上述實驗結果可觀察到，不論是微奈米氣泡臭氧水或是微奈米氣泡氫水，作用於 THP-1 細胞株時，皆可觀察到具有統計意義的降低細胞中活性氧物質 ROS、 $H_2O_2$  及 NO 表現，所以我們利用脂多醣(LPS)，為一種革蘭氏陰性細菌外膜的主要組成部分，具有內毒素，可引起強烈免疫反應，藉此誘發 THP-1 細胞株氧化壓力 ROS 提升，並評估微奈米氣泡臭氧水或是微奈米氣泡氫水是否能有效清除脂多醣所誘發的氧化傷害。

實驗結果顯示，單獨微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 刺激下能降低 13%左右的 THP-1 細胞株氧化壓力 ROS 表現，脂多醣(LPS) 50 ng/ml 刺激下將誘導 THP-1 細胞株氧化壓力 ROS 提升 20.3%，此增加的情況在加入微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 或微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 預先保護 1 小時後，分別呈現統計意義下降至 5.6%及 3.8%(圖三)，顯示不論是微奈米氣泡臭氧水或是微奈米氣泡氫水皆具有抗氧化活性，能降低細菌性感染時免疫單核細胞內 ROS 表現，避免過高氧化壓力對細胞造成的傷害。

## THP-1



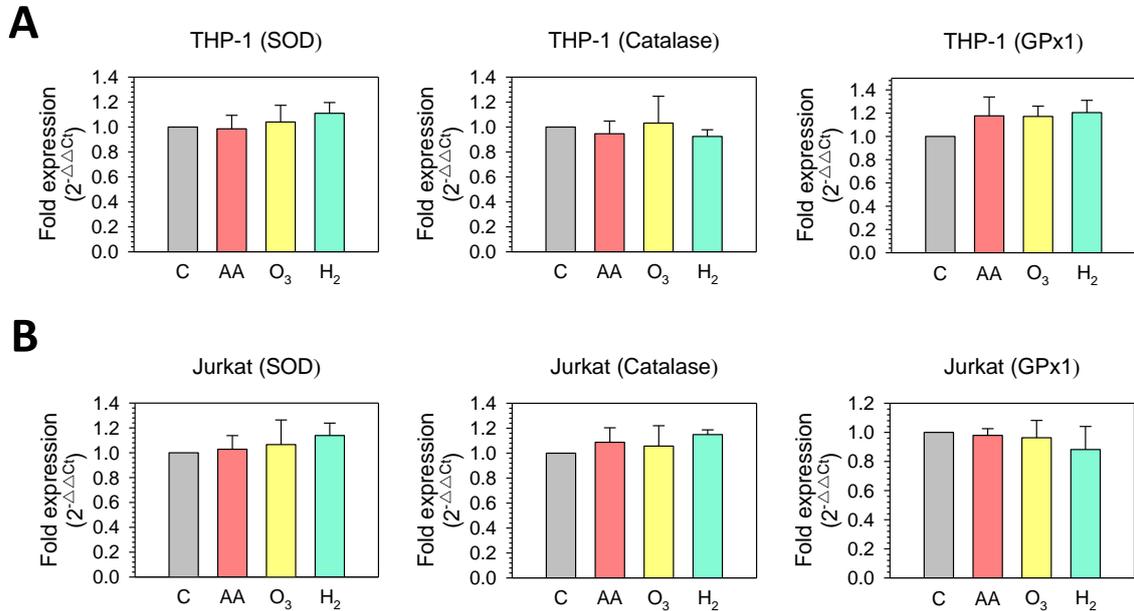
圖三、探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水是否可抑制脂多醣 (Lipopoly-saccharide, LPS) 所誘發的 THP-1 細胞株氧化壓力進而保護細胞提升細胞存活率。

THP-1 細胞株經微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 作用 1 小時後，再加入脂多醣(LPS) 50 ng/ml 作用 3 小時，利用 DCFDA 染色分析細胞中 ROS 的表現，以流式細胞分析儀測定，灰色直方圖為未加藥處理的控制組，紫線為加藥組。流式細胞分析儀測定結果以 FCSalyzer v.0.9.20-alpha 分析並繪圖(mean ± SD, n=3)，圖中呈現數值為相對於控制組螢光強度百分比。\*:  $p < 0.05$  與控制組比較；#:  $p < 0.05$  與 LPS 組比較。

#### 第四節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株的超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化氫酶(Catalase)及麩胱甘肽過氧化酶(GPx)之 mRNA 含量的表現

已知抗氧化酵素如超氧化物歧化酶(Superoxidase dismutase, SOD)、過氧化氫酶(Catalase)與麩胱甘肽過氧化酶(Glutathione peroxidase-1, GPx1)具有清除活性氧物質的能力，藉由偵測其表現評估微奈米氣泡臭氧水或是微奈米氣泡氫水是否透過影響這些抗氧化酵素表現達到清除活性氧物質。

利用 Real-Time PCR 分析上述抗氧化基因表現，結果顯示不論是 THP-1 或 Jurkat 細胞株在經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 6 小時後，皆未能分析到超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化氫酶(Catalase)及麩胱甘肽過氧化酶(GPx)之 mRNA 表現增加(圖四)，顯示微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水並非透過直接影響轉錄作用(Transcription)來啟動抗氧化活性。



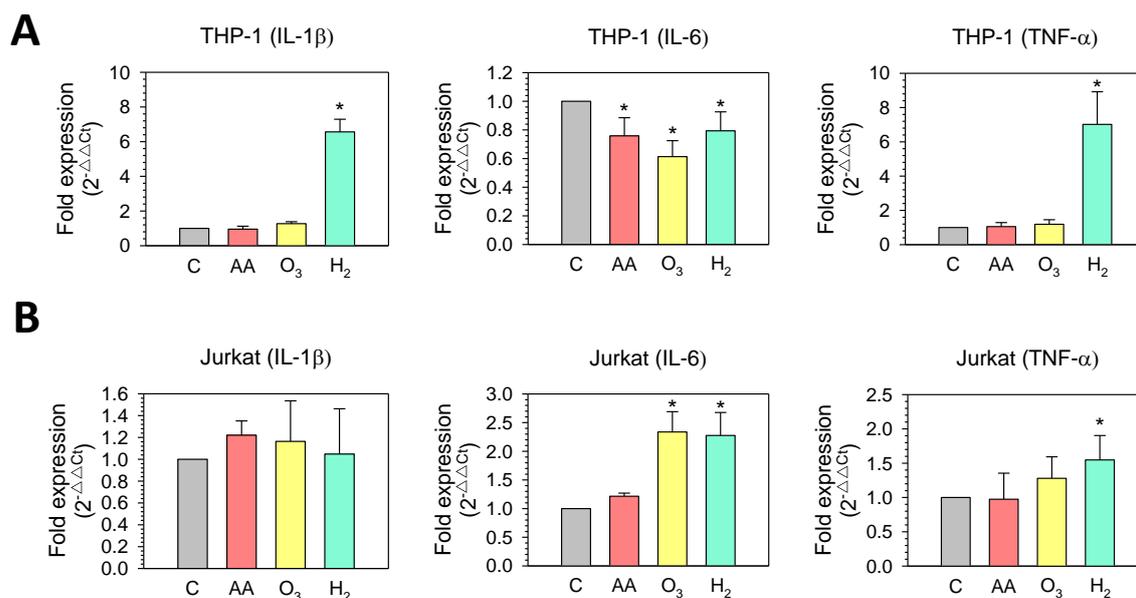
圖四、探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株的超氧化物歧化酶(SOD)、過氧化氫酶(Catalase)及麩胱甘肽過氧化酶(GPx)之 mRNA 表現含量的表現。

(A) THP-1 及(B) Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 6 小時後，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 SOD、Catalase 及 GPx 之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean  $\pm$  SD, n=3)。AA : 50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid。

## 第五節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中扮演發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 之 mRNA 含量的表現影響

免疫細胞在受到細菌及病毒感染時會提升發炎細胞激素 IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ )、IL-6 (Interleukin-6)和 TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ )等的表現，為免疫細胞發炎初期率先被活化的細胞激素，具有活化後天免疫 T 淋巴細胞(T lymphocyte)、B 淋巴細胞(B lymphocyte)及提升血管內皮細胞通透性等功能，能喚醒及招募更多的免疫細胞移行到感染部位，對於早期的免疫活化扮演至關重要的角色。其中 IL-1 $\beta$  的表現增加可陸續活化自然殺手細胞(NK cell)、T 淋巴細胞及 B 淋巴細胞；TNF- $\alpha$  則可活化單核球(Monocyte)分化為巨噬細胞(Macrophage)，並提升吞噬活性等功能；相較於 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ ，IL-6 除了扮演發炎性細胞激素角色，可刺激 B 淋巴細胞分化(B-cell differentiation)為成熟的漿細胞(Plasma cells)及促進免疫球蛋白(Immunoglobulins)的分泌合成外，亦扮演抗發炎的角色，能在免疫活化的晚期適度的抑制 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的合成(Borish & Steinke, 2003, Opal & DePalo, 2000)。

利用 Real-Time PCR 分析上述發炎細胞激素基因表現，結果顯示微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 可顯著刺激 THP-1 細胞株的細胞激素 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  表現增加(圖五、A)，也可刺激 Jurkat 細胞株 IL-6 和 TNF- $\alpha$  表現增加(圖五、B)，相較下微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 僅較顯著刺激 Jurkat 細胞株 IL-6 表現增加及但部分抑制 THP-1 細胞株 IL-6 表現(圖五、B)。此部分的實驗結果顯示微奈米氣泡氫水具有相當優異活化初期免疫調節功能，臭氧水則僅參與部分免疫調節角色。



圖五、探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中扮演發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  之 mRNA 含量的表現影響。

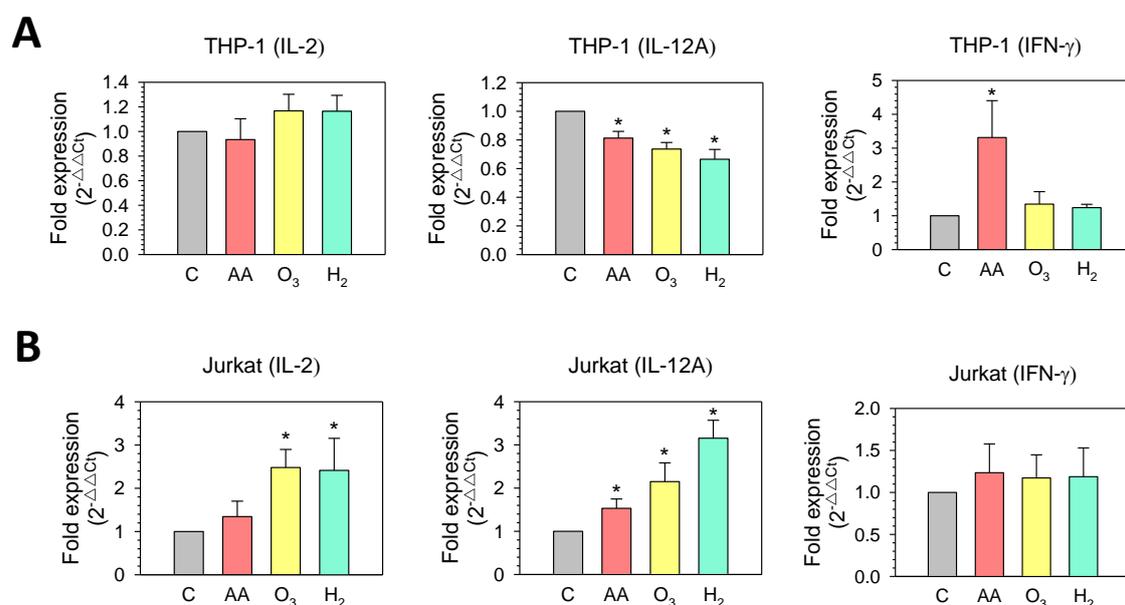
(A) THP-1 及(B) Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 6 小時後，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean  $\pm$  SD, n=3)。\*: $p < 0.05$  與控制組比較。C: Control; AA : 50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid。

## 第六節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中扮演活化後天免疫相關發炎的細胞激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$ 之 mRNA 含量的表現影響

後天免疫相關細胞激素的表現，將能持續活化後天免疫反應，以協助先天免疫細胞進行持續的免疫防護，IL-12A (Interleukin-12A) 主要由單核細胞/巨噬細胞、多核嗜中性球(Polymorphonuclear neutrophil, PMN)、T 和 B 淋巴細胞及樹突狀細胞(Dendritic cell)所分泌，藉此調節自然殺手細胞(Natural killer cells, NK cell)的增殖、毒殺活性及細胞激素的分泌(Borish & Steinke, 2003)，也能活化初始 T 細胞(Naive T cell)分化為輔助型 T 細胞 1 (T helper 1, Th1)，而被活化的輔助型 T 細胞 1 (Th1)同時會釋放 IL-2 (Interleukin-2)及干擾素  $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )，其中 IL-2 具有活化自然殺手細胞、B 淋巴細胞、毒殺型 T 細胞(Cytotoxic T cell, Tc)和巨噬細胞等功能，IFN- $\gamma$  則具有提升自然殺手細胞(NK cell)及毒殺 T 淋巴細胞(Tc)的抗菌及抗病毒活性等功能(Borish & Steinke, 2003)。

利用 Real-Time PCR 分析上述細胞激素基因表現，結果顯示微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 雖未能活化 THP-1 細胞株 IL-12A 表現(圖六、A)，但皆呈統計意義的活化 Jurkat 細胞株 IL-12A 表現，並同時伴隨 IL-2 表現提升(圖六、B)，而 IFN- $\gamma$  表現則不受影響，相較下維生素 C (Ascorbic acid, AA)則主要藉由直接刺激 THP-1

的 IFN- $\gamma$  表現增加，達到調節後天免疫功能(圖六、A)，顯示在調節後天免疫系統中微奈米氣泡臭氧水、微奈米氣泡氫水與維生素 C 應可扮演相輔相成的角色。



圖六、探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中扮演活化後天免疫相關發炎的細胞激素 IL-2、IL-12 和 IFN- $\gamma$  之 mRNA 含量的表現影響。

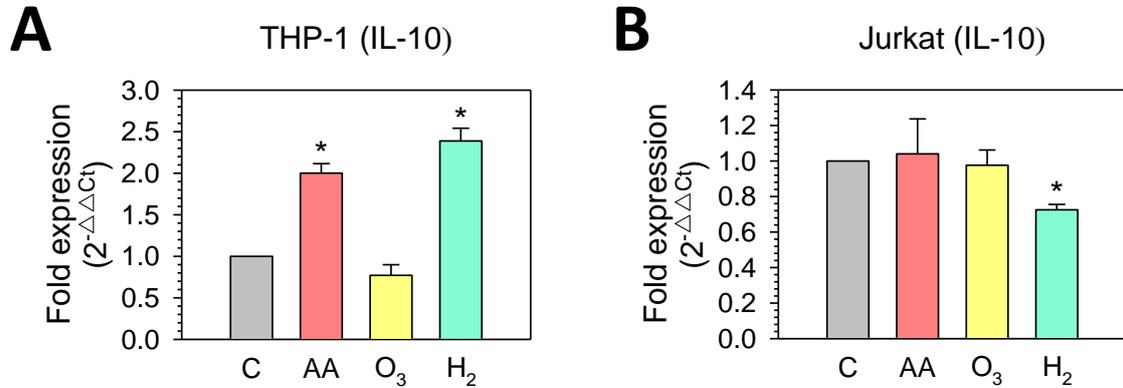
(A) THP-1 及(B) Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 6 小時後，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$  之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean  $\pm$  SD, n=3)。\*:  $p < 0.05$  與控制組比較。C: Control; AA: 50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid。

## 第七節 探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中抗發炎細胞激素 IL-10 之 mRNA 含量的表現影響

IL-10 (Interleukin-10) 為一種抗發炎細胞激素 (Anti-inflammatory cytokine)，可由單核細胞/巨噬細胞、肥大細胞 (Mast cell)、T 淋巴細胞及 B 淋巴細胞所分泌，在免疫系統處於嚴重發炎時，可藉由 IL-10 分泌來調控及抑制過度發炎反應，可透過作用於輔助型 T 淋巴細胞 1 (Th1) 抑制 IFN- $\gamma$ 、IL-2 表現，透過作用於輔助型 T 淋巴細胞 2 (Th2) 抑制 IL-4 及 IL-5 表現，透過作用於單核細胞/巨噬細胞抑制 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12 和 TNF- $\alpha$  表現，透過作用於自然殺手細胞抑制 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  表現，以避免細胞激素風暴 (Cytokine storm) 所導致的致命可能性 (Opal & DePalo, 2000)；此外 IL-10 也能夠抑制嗜酸性球 (Eosinophil) 存活及 IL-4 所誘導的 IgE 抗體的合成，藉此達到抑制過度的過敏性發炎反應 (Allergic inflammation) (Opal & DePalo, 2000)。

利用 Real-Time PCR 分析 IL-10 基因表現，結果顯示微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 能具統計意義提升 THP-1 細胞株 2.5 倍的 IL-10 合成率 (圖六、A)，但卻些微抑制 Jurkat 細胞株 IL-10 表現 (圖六、B)，而微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 則不具有調節 IL-10 表現的功效 (圖六、A-B)。整體結果可觀察到，微奈米氣泡氫水與維生素 C (Ascorbic acid, AA) 具有相似

的活化抗發炎相關細胞激素 IL-10 表現的功效。



圖七、探討微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 THP-1 或 Jurkat 細胞株中扮演抗發炎相關細胞激素 IL-10 之 mRNA 含量的表現影響。

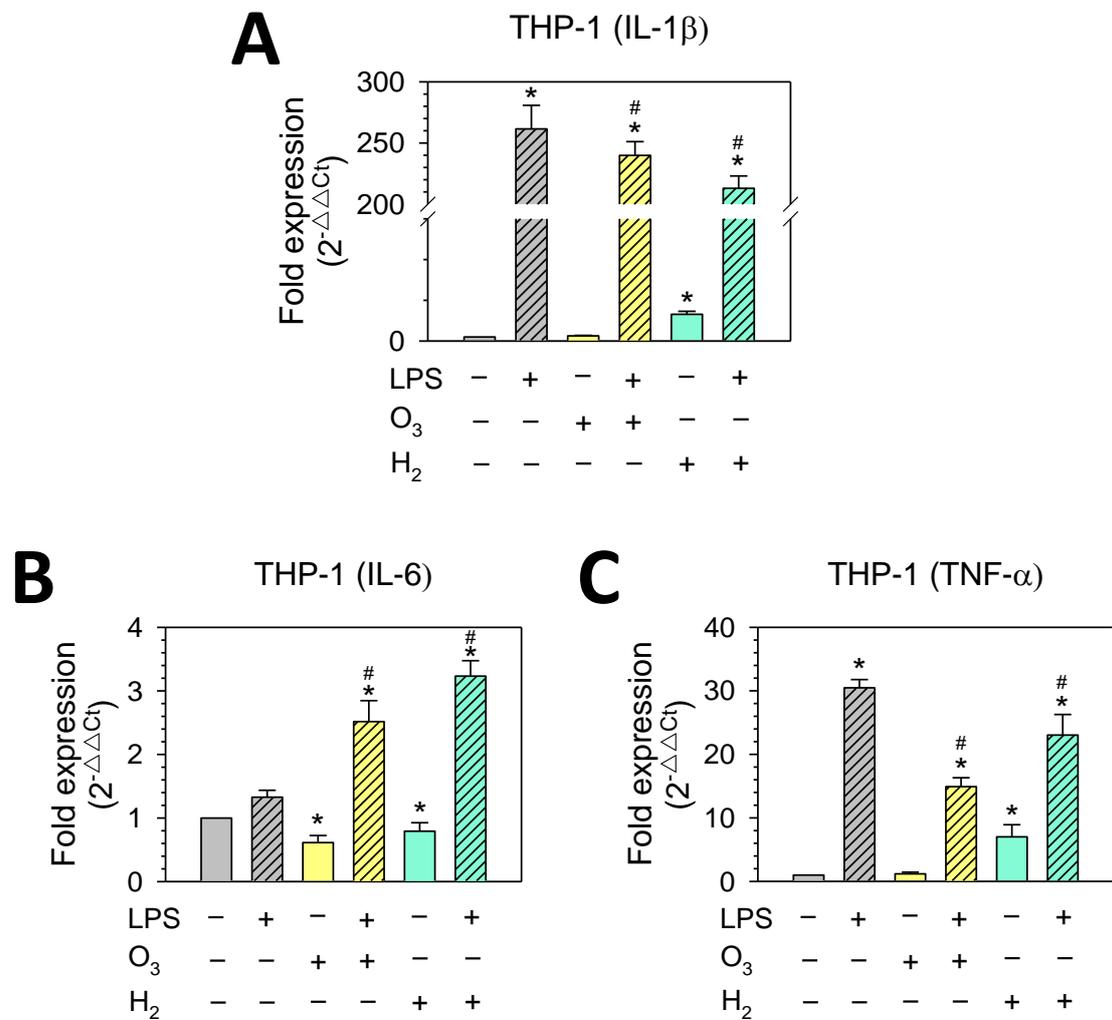
(A) THP-1 及(B) Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 6 小時後，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-10 之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean ± SD, n=3)。\* :  $p < 0.05$  與控制組比較。C : Control ; AA : 50  $\mu\text{g/ml}$  Ascorbic acid。

## 第八節 以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株發炎初期關鍵細胞 激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$ 表現，評估微奈米氣泡臭 氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株的影響

利用 Real-Time PCR 分析 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  基因表現，結果顯示單獨脂多醣(LPS) 50 ng/ml 刺激下會誘導 THP-1 細胞株發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  基因表現增加 30~250 倍，但以微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 預先作用 1 小時後，再經脂多醣(LPS) 50 ng/ml 刺激作用的組別，相較於脂多醣(LPS)單獨誘導的組別，微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水的將抑制部分脂多醣(LPS)所誘導的 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  基因表現增加(圖八、A、C)，顯示在先天免疫發炎情況下微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水具有部分緩解免疫過度發炎的功效。

相較於 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  表現被抑制，IL-6 在經由脂多醣(LPS)刺激下並未成統計意義的增加，但在以微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水預先作用後再經脂多醣(LPS)誘導的組別相較於單獨脂多醣(LPS)、臭氧水及氫水組別卻呈現顯著增加(圖八、B)，已知 IL-6 在免疫系統免疫活化的晚期扮演抗發炎的角色，能適度的抑制過度的 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  合成(Borish & Steinke, 2003, Opal & DePalo, 2000)，顯示不論是微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水在脂多醣(LPS)誘導的免疫發炎時，皆可藉

由活化 THP-1 細胞株分泌較多的 IL-6，藉此達到抑制細胞激素 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$  表現。

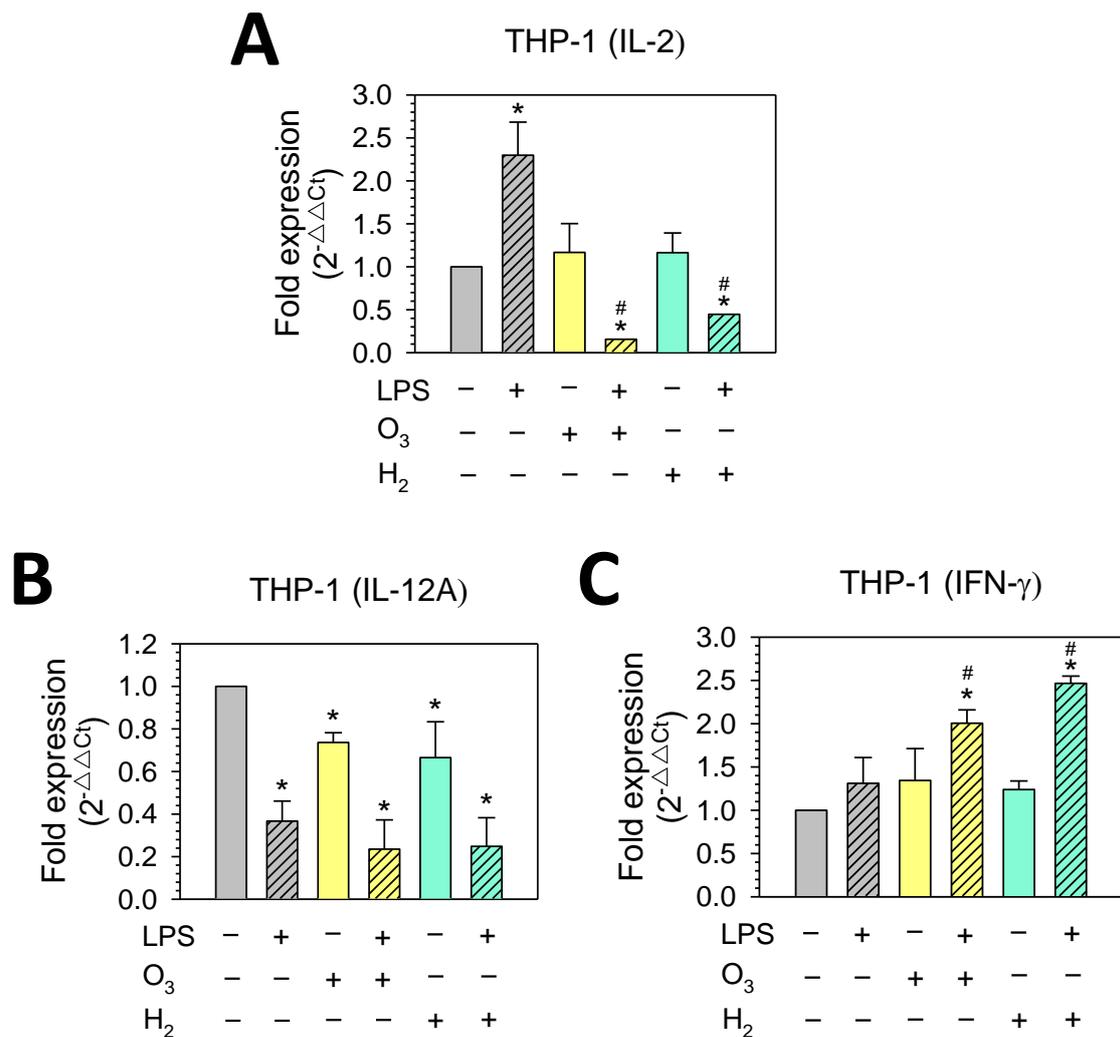


圖八、以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  表現，並藉以評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株免疫調節的影響。

THP-1 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 1 小時後，再加入脂多醣(LPS)作用 6 小時，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean  $\pm$  SD, n=3)。\* :  $p < 0.05$  與控制組比較；# :  $p < 0.05$  與 LPS 組比較。LPS : Lipopolysaccharide。

## 第九節 以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株調節後天免疫細胞 激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$ 之表現，評估微奈米氣泡 臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株的影響

利用 Real-Time PCR 分析 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$  基因表現，結果顯示單獨脂多醣(LPS) 50 ng/ml 會誘導 THP-1 細胞株細胞激素 IL-2 表現增加，但以微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 預先作用 1 小時後，再經脂多醣(LPS) 50 ng/ml 刺激作用的組別相較於脂多醣(LPS)、微奈米氣泡臭氧水或是微奈米氣泡氫水單獨作用的組別，IL-2 表現呈現顯著統計意義的下降(圖九、A)。在 IL-12A 表現上，不論是脂多醣(LPS)、微奈米氣泡臭氧水、微奈米氣泡氫水單獨作用或是脂多醣(LPS)併用微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水，皆呈現統計意義的下降(圖九、B)。相較於 IL-2 及 IL-12A 表現受到抑制，IFN- $\gamma$  則在 THP-1 細胞株以臭氧水及氫水預先作用後再經脂多醣(LPS)誘導的組別，相較於脂多醣(LPS)單獨作用的組別，可觀察到 IFN- $\gamma$  表現顯著增加(圖九、C)，已知 IFN- $\gamma$  具促進 B 淋巴細胞增殖、活化自然殺手細胞及毒殺型 T 淋巴細胞功能等活化後天免疫的角色，所以此部分的結果顯示，在免疫細胞發炎情況下，微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水應具有提升自然殺手細胞及毒殺型 T 淋巴細胞的抗菌、抗病毒及抗腫瘤能力。

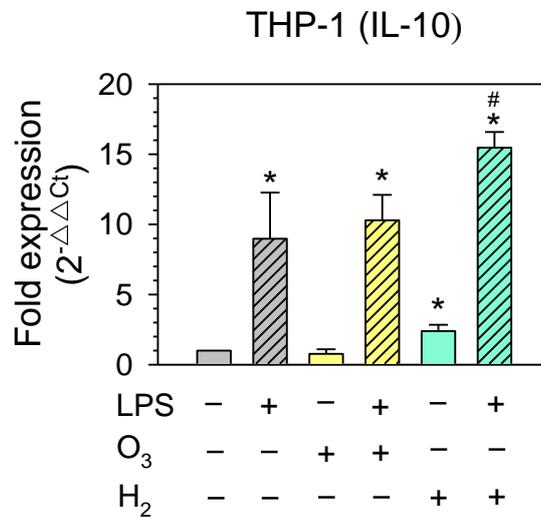


圖九、以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株扮演活化後天免疫相關發炎的細胞激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$  之表現，並藉以評估此時微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株免疫調節的影響。

THP-1 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 1 小時後，再加入脂多醣(LPS) 50 ng/ml 作用 6 小時，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$  之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean  $\pm$  SD, n=3)。\* :  $p < 0.05$  與控制組比較; #:  $p < 0.05$  與 LPS 組比較。LPS: Lipopolysaccharide。

## 第十節 以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株抗發炎細胞激素 IL-10 之表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株免疫調節的影響

利用 Real-Time PCR 分析 IL-10 基因表現，結果顯示單獨脂多醣 (LPS) 50 ng/ml 會誘導 THP-1 細胞株細胞激素 IL-10 表現增加，以微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 預先作用 1 小時後，再經脂多醣(LPS) 50 ng/ml 刺激作用 6 小時後，可發現以微奈米氣泡氫水預先作用的組別其 IL-10 的表現相較於脂多醣(LPS)單獨作用的組別來得高，而以微奈米氣泡臭氧水預先作用的組別則不受影響，顯示在 THP-1 細胞株發炎的情況下，微奈米氣泡氫水相較於微奈米氣泡臭氧水更能有效提升 IL-10 細胞激素的表現(圖十)，並藉由 IL-10 分泌來調控及抑制過度的免疫發炎反應。

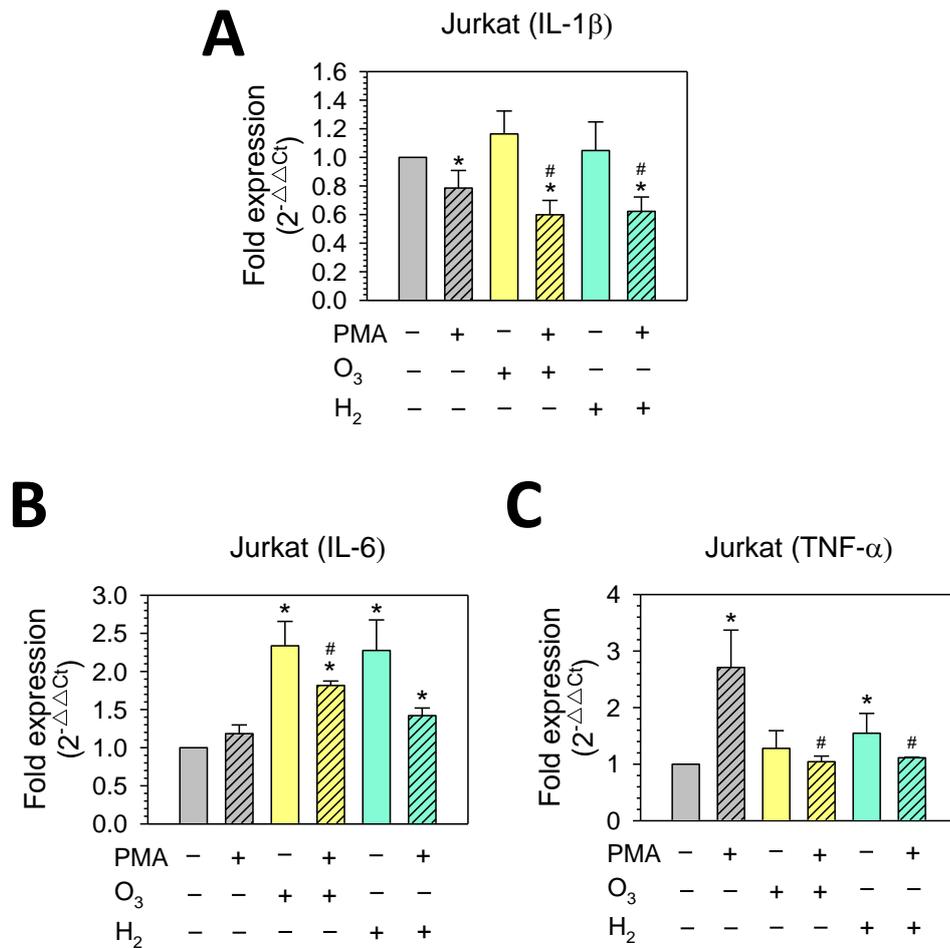


圖十、以脂多醣(LPS)誘導 THP-1 細胞株扮演抗發炎相關細胞激素 IL-10 之表現，並藉以評估此時微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株免疫調節的影響。

THP-1 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 1 小時後，再加入脂多醣(LPS) 50 ng/ml 作用 6 小時，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-10 之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean ± SD, n=3)。\* :  $p < 0.05$  與控制組比較；# :  $p < 0.05$  與 LPS 組比較。LPS : Lipopolysaccharide。

## 第十一節 以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$ 表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 T 淋巴細胞株免疫調節的影響

已知佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)能刺激淋巴細胞進行有絲分裂，藉此達到啟動後天免疫系統的活化。利用 Real-Time PCR 分析 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  基因表現，結果顯示單獨佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA) 50 ng/ml 刺激下會誘導 Jurkat 細胞株發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$  基因表現下降(圖十一、A)、IL-6 基因表現不變(圖十一、B) 及 TNF- $\alpha$  基因表現增加(圖十一、C)，但以微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 預先作用 1 小時後，再經佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)刺激作用的組別相較於微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水單獨誘導的組別，IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  基因表現皆呈現統計意義的下降(圖十一)，顯示在先天免疫發炎情況下微奈米氣泡臭氧水及微奈米氣泡氫水具有緩解後天免疫淋巴細胞過度發炎的功效。

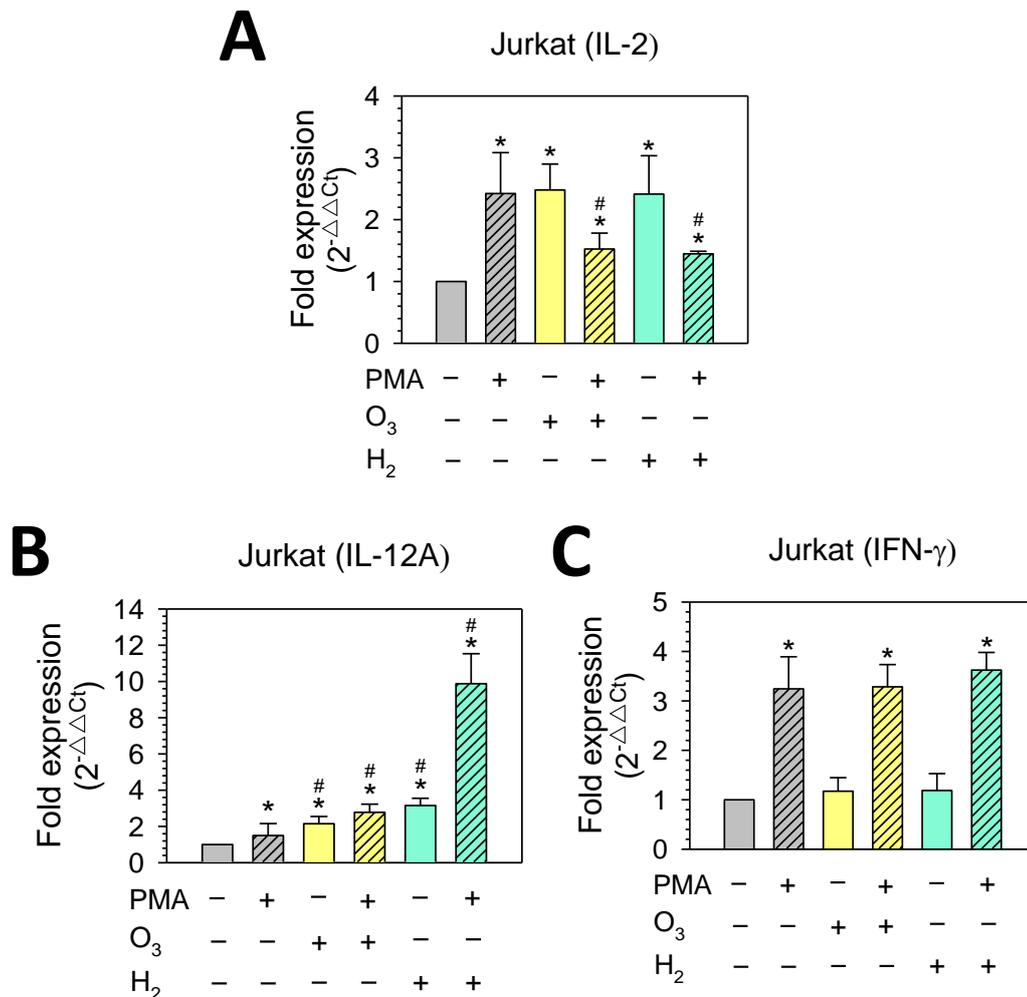


圖十一、以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株發炎初期關鍵細胞激素 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  表現，並藉以評估此時微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 T 淋巴細胞株免疫調節的影響。

Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 1 小時後，再加入佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯 (PMA) 50 ng/ml 作用 6 小時，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖 (mean  $\pm$  SD, n=3)。\* :  $p < 0.05$  與控制組比較；# :  $p < 0.05$  與 PMA 組比較。PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate。

## 第十二節 以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株扮演活化後天免疫發炎細胞激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$ 之表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 T 淋巴細胞株免疫調節的影響

利用 Real-Time PCR 分析 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$  基因表現，結果顯示單獨佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA) 50 ng/ml 會誘導 Jurkat 細胞株細胞激素 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$  表現增加(圖十二)，但以微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 預先作用 1 小時後，再經佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA) 50 ng/ml 刺激作用後，僅 IL-2 表現呈現顯著統計意義的下降(圖十二、A)，IL-12A 則是呈現統計意義的上升(圖十二、B)，IFN- $\gamma$  則無統計意義差異(圖十二、C)。

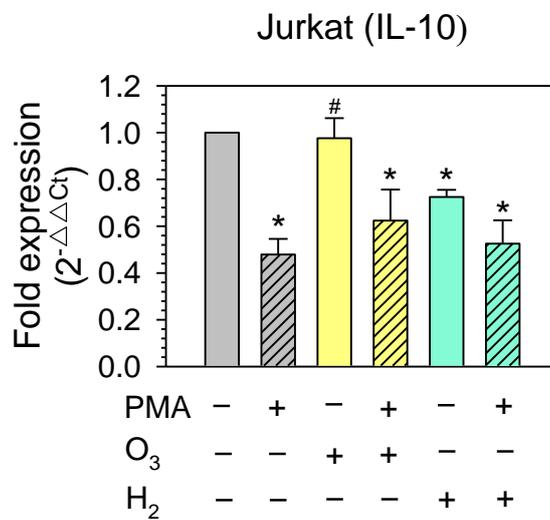


圖十二、以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株發炎初期關鍵細胞激 IL-2、IL-12A 及 IFN- $\gamma$  表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對 T 淋巴細胞株免疫調節的影響。

Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 1 小時後，再加入佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯 (PMA) 50 ng/ml 作用 6 小時，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-2、IL-12A 和 IFN- $\gamma$  之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖 (mean  $\pm$  SD, n=3)。\* :  $p < 0.05$  與控制組比較；# :  $p < 0.05$  與 PMA 組比較。PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate。

### 第十三節 以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株抗發炎細胞激素 IL-10 之表現，評估微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對淋巴細胞株免疫調節的影響

利用 Real-Time PCR 分析 IL-10 基因表現，結果顯示單獨佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA) 50 ng/ml 會抑制 Jurkat 細胞株細胞激素 IL-10 表現，以微奈米氣泡臭氧水 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水 1,200 ppb 預先作用 1 小時後，再經佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA) 50 ng/ml 刺激作用 6 小時後，IL-10 的表現與佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA) 單獨作用的組別相似(圖十三)，顯示後天免疫淋巴細胞在發炎期，微奈米氣泡氫水及微奈米氣泡臭氧水無法藉由調節其 IL-10 細胞激素的表現來調控及抑制過度的免疫發炎反應。



圖十三、以佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯(PMA)誘導 Jurkat 細胞株扮演抗發炎相關細胞激素 IL-10 之表現，並藉以評估此時微奈米氣泡臭氧水或微奈米氣泡氫水對單核免疫細胞株免疫調節的影響。

Jurkat 細胞株經微奈米氣泡臭氧水濃度 1.2 ppm 及微奈米氣泡氫水濃度 1,200 ppb 作用 1 小時後，再加入佛波醇-12-十四烷酰-13-乙酸酯 (PMA) 50 ng/ml 作用 6 小時，利用 Real-Time PCR 分析細胞中 IL-10 之 mRNA 表現。實驗結果以 Sigma Plot 10.0 統計並繪圖(mean ± SD, n=3)。

\* :  $p < 0.05$  與控制組比較；# :  $p < 0.05$  與 PMA 組比較。PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate。

## 第五章 結論



	Monocyte			T cell		
	Cytokines	O <sub>3</sub>	H <sub>2</sub>	Cytokines	O <sub>3</sub>	H <sub>2</sub>
先天免疫	IL-1β	=	↑	IL-1β	=	=
	IL-6	↓	↓	IL-6	↑	↑
	TNF-α	=	↑	TNF-α	=	↑
後天免疫	IL-2	=	=	IL-2	↑	↑
	IL-12A	↓	↓	IL-12A	↑	↑
	IFN-γ	=	=	IFN-γ	=	=
	IL-10	=	↑	IL-10	=	↑

Monocyte：單核球細胞，本研究以 THP-1 細胞株進行研究

T cell：T 淋巴球細胞，本研究以 Jurkat 細胞株進行研究

O<sub>3</sub>：為本論文微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)之簡稱

H<sub>2</sub>：為本論文微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)之簡稱

IL：Interleukin(介白素)或稱 Cytokine(細胞激素)

TNF：Tumor necrosis factor(腫瘤壞死因子)

本論文以微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)作用於單核球細胞(Monocyte)及 T 淋巴球細胞(T cell)這兩種免疫細胞，實驗結論：

### 一、微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)作用

- (一)、對單核球細胞(Monocyte): 會降低 IL-6 和 IL-12A 的基因表現。
- (二)、對 T 淋巴球細胞(T cell): 會增強 IL-2、IL-6 和 IL-12A 的基因表現。

### 二、微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)作用

- (一)、對單核球細胞(Monocyte): 會增強 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-10 的基因表現及降低 IL-6 和 IL-12A 的基因表現。
- (二)、對 T 淋巴球細胞(T cell): 會增強 IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-10 和 IL-12A 的基因表現。

本論文結論為微奈米氣泡臭氧水(nb-O<sub>3</sub>-water)及微奈米氣泡氫水(nb-H<sub>2</sub>-water)作用後會改變單核球細胞(Monocyte)及 T 淋巴球細胞(T cell)中介白素(Interleukin)及腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor)的基因表現，表示會對免疫功能影響，及具有部分提升免疫功能及緩解後天免疫淋巴細胞過度發炎的功效。

## 參考文獻

- Adegbola SO, Sahnan K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P (2018) Anti-TNF Therapy in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci* 19
- Aldini G, Vistoli G, Regazzoni L, Gamberoni L, Facino RM, Yamaguchi S, Uchida K, Carini M (2008) Albumin is the main nucleophilic target of human plasma: a protective role against pro-atherogenic electrophilic reactive carbonyl species? *Chem Res Toxicol* 21: 824-35
- Altman N (2007) *The oxygen prescription: the miracle of oxidative therapies*. Healing Arts Press, Rochester, Vermont,
- Amitani H, Asakawa A, Cheng K, Amitani M, Kaimoto K, Nakano M, Ushikai M, Li Y, Tsai M, Li JB, Terashi M, Chaolu H, Kamimura R, Inui A (2013) Hydrogen improves glycemic control in type1 diabetic animal model by promoting glucose uptake into skeletal muscle. *PLoS One* 8: e53913
- Barnes PJ (2003) Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 511-22
- Berry MA, Hargadon B, Shelley M, Parker D, Shaw DE, Green RH, Bradding P, Brightling CE, Wardlaw AJ, Pavord ID (2006) Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 354: 697-708
- Bocci V (2006a) Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 493-504
- Bocci V (2011) Ozone. A New Medical Drug 2011. In Springer, Dordrecht. The Netherlands
- Bocci VA (2006b) Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res* 37: 425-35
- Bonilla FA, Oettgen HC (2010) Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S33-40
- Borish LC, Steinke JW (2003) 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111: S460-75

- Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H (2017) Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. *Inflammation* 40: 340-349
- Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT (2007) Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 11: R49
- Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214: 149-60
- Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring MT, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh DG, Walker BD, Kaufmann DE (2009) IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 114: 346-56
- Buchholz BM, Kaczorowski DJ, Sugimoto R, Yang R, Wang Y, Billiar TR, McCurry KR, Bauer AJ, Nakao A (2008) Hydrogen inhalation ameliorates oxidative stress in transplantation induced intestinal graft injury. *Am J Transplant* 8: 2015-24
- Burska A, Boissinot M, Ponchel F (2014) Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm* 2014: 545493
- Celis R, Cuervo A, Ramirez J, Canete JD (2019) Psoriatic Synovitis: Singularity and Potential Clinical Implications. *Front Med (Lausanne)* 6: 14
- Cheng A, Yan H, Han C, Wang W, Tian Y, Chen X (2014) Polyphenols from blueberries modulate inflammation cytokines in LPS-induced RAW264.7 macrophages. *Int J Biol Macromol* 69: 382-7
- Choy EH, Panayi GS (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344: 907-16
- Cole AR, Raza A, Ahmed H, Polizzotti BD, Padera RF, Andrews N, Kheir JN (2019) Safety of inhaled hydrogen gas in healthy mice. *Med Gas Res* 9: 133-138
- Consoli V, Sorrenti V, Grosso S, Vanella L (2021) Heme Oxygenase-1 Signaling and Redox Homeostasis in Physiopathological Conditions. *Biomolecules* 11

Cordero MD, Alcocer-Gomez E, Ryffel B (2018) Gain of function mutation and inflammasome driven diseases in human and mouse models. *J Autoimmun* 91: 13-22

Daif ET (2012) Role of intra-articular ozone gas injection in the management of internal derangement of the temporomandibular joint. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 113: e10-4

Darwich L, Coma G, Pena R, Bellido R, Blanco EJ, Este JA, Borrás FE, Clotet B, Ruiz L, Rosell A, Andreo F, Parkhouse RM, Bofill M (2009) Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology* 126: 386-93

Deisseroth A, Dounce AL (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50: 319-75

Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-8

Dinarello CA (2014) An expanding role for interleukin-1 blockade from gout to cancer. *Mol Med* 20 Suppl 1: S43-58

Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctot KL (2010) A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry* 67: 446-57

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6: 836-48

Elvis AM, Ekta JS (2011) Ozone therapy: A clinical review. *J Nat Sci Biol Med* 2: 66-70

Fu Y, Ito M, Fujita Y, Ito M, Ichihara M, Masuda A, Suzuki Y, Maesawa S, Kajita Y, Hirayama M, Ohsawa I, Ohta S, Ohno K (2009) Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 453: 81-5

Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S (2007) Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 670-4

Gabay C, Lamacchia C, Palmer G (2010) IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6: 232-41

Gabrilovich DI, Nagaraj S (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9: 162-74

Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S (2018) Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov* 17: 395-412

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A (2013) The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity* 39: 1003-18

Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, Hieny S, Kelsall B, Trinchieri G, Sher A (2012) NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 36: 1047-59

Guilherme L, Cury P, Demarchi LM, Coelho V, Abel L, Lopez AP, Oshiro SE, Aliotti S, Cunha-Neto E, Pomerantzeff PM, Tanaka AC, Kalil J (2004) Rheumatic heart disease: proinflammatory cytokines play a role in the progression and maintenance of valvular lesions. *Am J Pathol* 165: 1583-91

Halliwell B, Clement MV, Long LH (2000) Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486: 10-3

Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP (2003) The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11: 747-55

Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR (2007) Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS J* 274: 2163-80

Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T (2010) Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1215-28

Horvitz HR (1999) Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59: 1701s-1706s

Hunter CA, Jones SA (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 16: 448-57

Ighodaro OM, Akinloye OA (2018) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine* 54: 287-293

Imai K, Kotani T, Tsuda H, Mano Y, Nakano T, Ushida T, Li H, Miki R, Sumigama S, Iwase A, Hirakawa A, Ohno K, Toyokuni S, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A, Kikkawa F (2016) Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radic Biol Med* 91: 154-63

Iuchi K, Imoto A, Kamimura N, Nishimaki K, Ichimiya H, Yokota T, Ohta S (2016) Molecular hydrogen regulates gene expression by modifying the free radical chain reaction-dependent generation of oxidized phospholipid mediators. *Sci Rep* 6: 18971

Ivancich A, Jouve HM, Sartor B, Gaillard J (1997) EPR investigation of compound I in *Proteus mirabilis* and bovine liver catalases: formation of porphyrin and tyrosyl radical intermediates. *Biochemistry* 36: 9356-64

Jiang X, Niu X, Guo Q, Dong Y, Xu J, Yin N, Qi Q, Jia Y, Gao L, He Q, Lv P (2019) FoxO1-mediated autophagy plays an important role in the neuroprotective effects of hydrogen in a rat model of vascular dementia. *Behav Brain Res* 356: 98-106

Kabel AMJJCRT (2014) Relationship between cancer and cytokines. 2: 41-43

Kafoury RM, Hernandez JM, Lasky JA, Toscano WA, Jr., Friedman M (2007) Activation of transcription factor IL-6 (NF-IL-6) and nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by lipid ozonation products is crucial to interleukin-8 gene expression in human airway epithelial cells. *Environ Toxicol* 22: 159-68

Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M, Adachi T, Obayashi H, Yoshikawa T (2008) Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 28: 137-43

Kamimura N, Ichimiya H, Iuchi K, Ohta S (2016) Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1alpha to enhance fatty acid metabolism. *NPJ Aging Mech Dis* 2: 16008

- Karupiah G, Xie QW, Buller RM, Nathan C, Duarte C, MacMicking JD (1993) Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* 261: 1445-8
- Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, Huang CS, Masutani K, Tanaka Y, Noda K, Peng X, Takahashi T, Billiar TR, Okumura M, Toyoda Y, Kensler TW, Nakao A (2013) Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 304: L646-56
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57
- Kulbe H, Chakravarty P, Leinster DA, Charles KA, Kwong J, Thompson RG, Coward JJ, Schioppa T, Robinson SC, Gallagher WM, Galletta L, Australian Ovarian Cancer Study G, Salako MA, Smyth JF, Hagemann T, Brennan DJ, Bowtell DD, Balkwill FR (2012) A dynamic inflammatory cytokine network in the human ovarian cancer microenvironment. *Cancer Res* 72: 66-75
- Lardinois OM (1995) Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Free Radic Res* 22: 251-74
- Larini A, Bianchi L, Bocci V (2003) The Ozone Tolerance: I) Enhancement of Antioxidant Enzymes is Ozone Dose-Dependent in Jurkat Cells. *Free Radical Research* 37: 1163-1168
- Lenardo MJ (1991) Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature* 353: 858-61
- Li J, Dong Y, Chen H, Han H, Yu Y, Wang G, Zeng Y, Xie K (2012) Protective effects of hydrogen-rich saline in a rat model of permanent focal cerebral ischemia via reducing oxidative stress and inflammatory cytokines. *Brain Res* 1486: 103-11
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5: 1403-9
- Lin JH, Walter P, Yen TS (2008) Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu Rev Pathol* 3: 399-425

- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-95
- Ma Q (2013) Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 53: 401-26
- Maggini S, Pierre A, Calder PC (2018) Immune Function and Micronutrient Requirements Change over the Life Course. *Nutrients* 10
- Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL (2008) IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol* 28: 635-9
- Massague J (2008) TGFbeta in Cancer. *Cell* 134: 215-30
- Matsumoto A, Yamafuji M, Tachibana T, Nakabeppu Y, Noda M, Nakaya H (2013) Oral 'hydrogen water' induces neuroprotective ghrelin secretion in mice. *Sci Rep* 3: 3273
- McInnes IB, Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7: 429-42
- Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, Hlh Across Speciality Collaboration UK (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 395: 1033-1034
- Merin O, Attias E, Elstein D, Schwalb H, Bitran D, Zimran A, Silberman SJJCS (2007) Ozone administration reduces reperfusion injury in an isolated rat heart model. 22: 339-342
- Mikami T, Tano K, Lee H, Lee H, Park J, Ohta F, LeBaron TW, Ohta S (2019) Drinking hydrogen water enhances endurance and relieves psychometric fatigue: a randomized, double-blind, placebo-controlled study (1). *Can J Physiol Pharmacol* 97: 857-862
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC (1993) Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 76: 2812-23
- Monastero RN, Pentylala S (2017) Cytokines as Biomarkers and Their Respective Clinical Cutoff Levels. *Int J Inflamm* 2017: 4309485
- Moore JB, June CH (2020) Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science* 368: 473-474

- Neurath MF (2014) Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 14: 329-42
- O'Shea JJ, Murray PJ (2008) Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity* 28: 477-87
- Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13: 688-94
- Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima MJA (2005) Disruption of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *180*: 11-17
- Ohta S (2011) Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Curr Pharm Des* 17: 2241-52
- Ohta S (2014) Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol Ther* 144: 1-11
- Olson KR (2020) Are Reactive Sulfur Species the New Reactive Oxygen Species? *Antioxid Redox Signal* 33: 1125-1142
- Opal SM, DePalo VA (2000) Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 117: 1162-72
- Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ (2016) Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 16: 131-44
- Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M (1995) The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. *Free Radic Biol Med* 19: 935-41
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki IJCca (2014) Antioxidants and human diseases. *436*: 332-347
- Rice-Evans C, Burdon R (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32: 71-110

- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133: 775-87
- Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ortiz A (2011) TWEAK, a multifunctional cytokine in kidney injury. *Kidney Int* 80: 708-18
- Scassellati C, Ciani M, Galoforo AC, Zanardini R, Bonvicini C, Geroldi C (2020) Molecular mechanisms in cognitive frailty: potential therapeutic targets for oxygen-ozone treatment. *Mech Ageing Dev* 186: 111210
- Schoenborn JR, Wilson CB (2007) Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96: 41-101
- Sciorsci RL, Lillo E, Occhiogrosso L, Rizzo A (2020) Ozone therapy in veterinary medicine: A review. *Res Vet Sci* 130: 240-246
- Sies H, Jones DP (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 363-383
- Smith AJ, Humphries SE (2009) Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 43-59
- Song G, Zong C, Zhang Z, Yu Y, Yao S, Jiao P, Tian H, Zhai L, Zhao H, Tian S, Zhang X, Wu Y, Sun X, Qin S (2015) Molecular hydrogen stabilizes atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor-knockout mice. *Free Radic Biol Med* 87: 58-68
- Sprague AH, Khalil RA (2009) Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 78: 539-52
- Sun H, Chen L, Zhou W, Hu L, Li L, Tu Q, Chang Y, Liu Q, Sun X, Wu M, Wang H (2011) The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice. *J Hepatol* 54: 471-80
- Thapa M, Kuziel WA, Carr DJ (2007) Susceptibility of CCR5-deficient mice to genital herpes simplex virus type 2 is linked to NK cell mobilization. *J Virol* 81: 3704-13
- Togi S, Togi M, Nagashima S, Kitai Y, Muromoto R, Kashiwakura J-i, Miura T, Matsuda TJBR (2021) Implication of NF- $\kappa$ B Activation on Ozone-Induced HO-1 Activation. 4: 59-63

Trinchieri G (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-46

Turvey SE, Broide DH (2010) Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* 125: S24-32

Valacchi G, Bocci V (1999) Studies on the biological effects of ozone: 10. Release of factors from ozonated human platelets. *Mediators Inflamm* 8: 205-9

von Ossowski I, Hausner G, Loewen PC (1993) Molecular evolutionary analysis based on the amino acid sequence of catalase. *J Mol Evol* 37: 71-6

Wang C, Li J, Liu Q, Yang R, Zhang JH, Cao YP, Sun XJ (2011) Hydrogen-rich saline reduces oxidative stress and inflammation by inhibit of JNK and NF-kappaB activation in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 491: 127-32

Yagi T, Higuchi Y (2013) Studies on hydrogenase. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 89: 16-33

Yamamoto R, Homma K, Suzuki S, Sano M, Sasaki J (2019) Hydrogen gas distribution in organs after inhalation: Real-time monitoring of tissue hydrogen concentration in rat. *Sci Rep* 9: 1255

Zhang Y, Sun Q, He B, Xiao J, Wang Z, Sun X (2011) Anti-inflammatory effect of hydrogen-rich saline in a rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion. *Int J Cardiol* 148: 91-5