訪問密鑰 NCBI 主頁 MyNCBI 主頁主要內容主導航



2014年科學代表;4:5485。

2014 年 6 月 30 日在線發布。doi: 10.1038/srep05485

PMCID: PMC4074787

PMID: 24975958

在通過各種途徑施用氫氣後,使用密封管估計大鼠組織中的氫氣濃度

Chi Liu, 1, 4, 5 Ryosuke Kurokawa, 1, 3, 5 Masayuki Fujino, 1, 2 Shinichi

Hirano, ³ Bunpei Sato, ³和 Xiao-Kang Li, ¹

作者信息 文章註釋 版權和許可信息 免責聲明

本文已得到糾正。見 Sci Rep. 2015 年 7 月 20 日;5:9629。

本文已被 PMC 中的其他文章引用。

相關數據

補充材料

氫在缺血再灌注損傷以及炎症和神經疾病的疾病動物模型中發揮有益作用。此外,分子氫可用於臨床環境中的各種新型醫學和治療應用。在本研究中,估計了大鼠血液和組織中的氫濃度。Wistar 大鼠口服超富氫水(HSRW),腹腔和靜脈注射超富氫鹽水(HSRS),吸入氫氣。然後使用高質量傳感器氣相色譜法應用一種確定氫氣濃度的新方法,然後通過密封管中的組織均質化製備樣品。該方法可以靈敏、穩定地測定氫氣濃度。與靜脈給藥後 1 分鐘相比,氫氣濃度在口服和腹腔給藥後 5 分鐘達到峰值。吸入氫氣後,發現氫氣濃度在 30 分鐘時顯著增加,此後保持相同水平。這些結果表明,準確測定大鼠血液和器官組織中的氫濃度對於使用分子氫的各種新型醫學和治療療法的應用非常有用和重要。

分子氫是一種有效的自由基清除劑,可選擇性地降低羥基自由基和過氧亞硝酸鹽(最具細胞毒性的活性氧 (ROS))的水平,從而有效保護細胞¹。氫也有利於用於各種新的醫學治療應用。最近,據報導氫氣有助於治療血吸蟲病相關的慢性肝臟炎症。這些治療特性歸因於清除羥基自由基².此外,許多研究報告了氫療法在不同疾病中的應用,

包括涉及神經、消化、心血管和呼吸系統的疾病。氫的保護作用也已在不同的動物模型中得到證實,包括通過減少缺血再灌注損傷而不改變血流動力學參數和提供對多器官損傷的保護來限制大腦、心臟、腸和腎臟的梗死體積的能力。全身炎症這些研究表明,氫在各種器官的臨床應用中發揮著有益的作用。然而,由於檢測器的敏感性和與組織處理相關的問題,使用不同的給藥方法很難準確地闡明動物器官中的氫濃度。因此,本研究描述了一種精確測定動物組織中氫濃度的可行方法。我們修改了傳統氣相色譜中使用的氫氣檢測方法,以開發更靈敏和準確的系統。使用這種新穎的方法,我們測量了在不同時間點施用不同濃度的超富氫水(HSRW)和超富氫鹽水(HSRS)以及吸入不同濃度的氫氣後組織中的氫濃度。我們的結果表明建立了一種準確測定大鼠血液和器官組織中氫濃度的方法。關於氫濃度的數據體內對於使用分子氫的各種新型醫學和治療療法的應用可能非常有用和重要。

結果

血液和組織中的氫濃度取決於 HSRW/HSRS 給藥和氫氣吸入的劑量

如材料和方法部分所述製備氫(圖。1)。在以不同濃度(1.25、2.5 和 5.0 ppm)口服和腹膜內施用氫氣後 5 分鐘測量氫氣濃度。肝臟、脾臟、胰腺和大腦的血液和組織中的氫濃度呈劑量依賴性增加,與口服 HSRW 濃度的增加有關。圖 2A)。腹腔注射HSRS 也導致組織氫濃度呈劑量依賴性增加。圖 2B)。此外,HSRS 的靜脈注射誘導了氫濃度的劑量依賴性增加(圖 2C)。此外,吸入氫氣後,肝臟、腎臟和脾臟的血液和組織中的氫濃度會增加,這取決於所使用的氫氣劑量。圖 2D)。為了評估在洩漏條件下使用密封(氣密)管確定氫氣濃度的當前方法的有效性,我們進行了一項額外的實驗,比較了使用和不使用 gentleMACS 管蓋與使用和不使用蓋帽時獲得的差異密封條件。如補充圖 1 所示,在密封條件下獲得的氫氣濃度比在密封條件下使用當前方法獲得的氫氣濃度低 70% 至 95%,這是一個顯著差異。

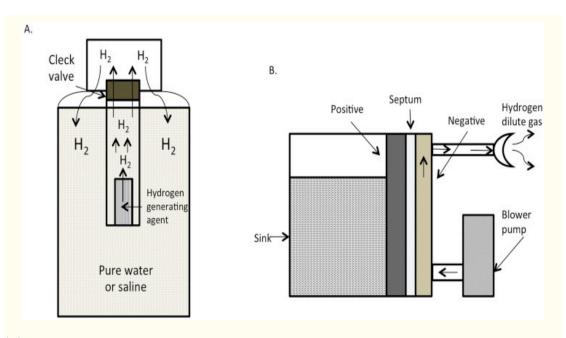


圖 1

氫氣超富水、鹽水和氫氣發生設備。

(A)在生成裝置中向氫生成劑中添加水。塑料瓶的內部通過反應加壓並產生氫氣(H₂)。 我們通過攪拌瓶子來生產 HSRW 或 HSRS。(B) 生物電解質室的氫氣供應系統由電解 室中的原水、隔膜和電極板組成。氫氣是基於水面上的風扇、陰極氣體和稀釋空氣之 間的相互作用,直接從電極板和陰極產生的。電解時陰極附近的氫氣濃度始終保持在 爆炸下限以下。

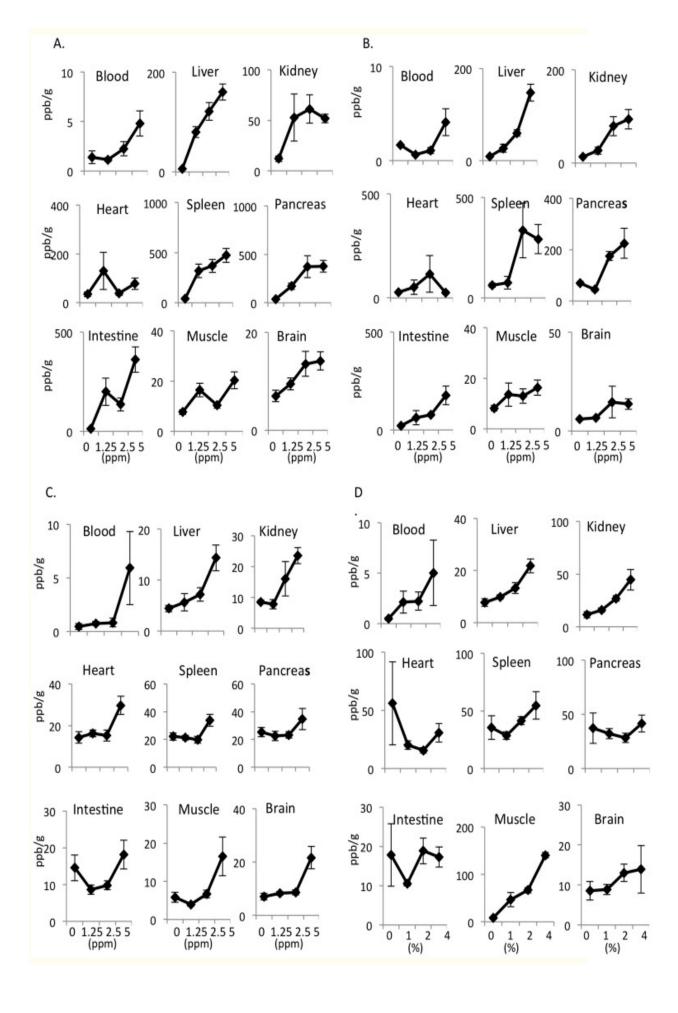


圖 2

血液和組織中的氫濃度取決於 HSRW/HSRS 的劑量和氫氣的給藥。

(A) HSRW □服給藥和 (B) HSRS 腹膜內給藥 5 分鐘後獲得的動脈血和肝臟、腎臟、心臟、脾臟、胰腺、腸、肌肉和腦組織中的氫濃度,(C)靜脈注射 HSRS 後 1 分鐘和 (D) 吸入氫氣後 30 分鐘。在所有實驗中,每組對超過三隻大鼠的數據進行分析,並表示為平均值±SEM。補充表 1 總結了大鼠的實際數量。

血液和組織中的氫濃度取決於 HSRW/HSRS 給藥和氫氣吸入後的時間

在口服和腹膜內給藥後 5、15、30 和 60 分鐘以及靜脈內給藥 5 ppm 氫後 1、3 和 5 分鐘測定血液和組織中的氫濃度。所有值在口服和腹腔注射 HSRW 後 5 分鐘達到最大值(如圖。3A)和 HSRS(如圖。3B),而 HSRS的靜脈給藥需要一分鐘。然後血液和組織中的氫濃度緩慢下降(圖 3A、B、C)。在 5 分鐘達到最高水平後觀察到的血液和組織中氫濃度的下降在腹膜內給藥後更快。如圖。3B)比口服給藥(如圖。3A)。相比之下,氫氣濃度在靜脈治療後一分鐘達到峰值,然後從一到五分鐘逐漸下降(圖 3C)。與腹膜內、靜脈內或口服給藥相比,吸入氫氣導致氫氣濃度升高較慢。然而,在吸入後,升高的氫氣濃度可維持至少 60 分鐘(圖 3D).

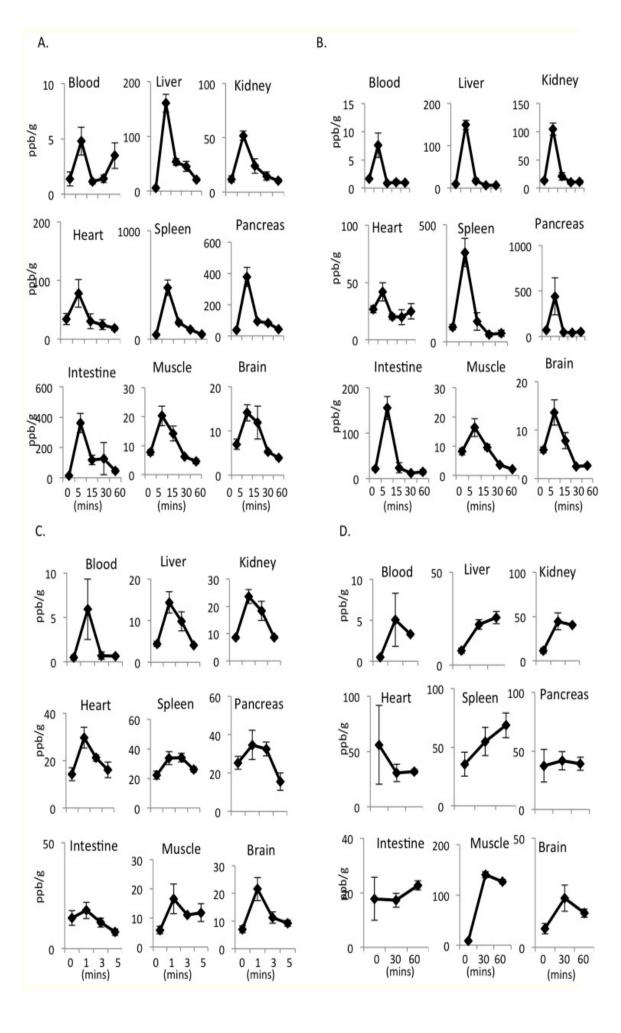


圖 3

血液和組織中的氫濃度取決於 HSRW/HSRS 和氫氣給藥後的時間。

(A) \Box 服 5 ppm HSRW, (B) 腹腔注射 5 ppm 的 HSRS, (C) 靜脈注射 5 ppm 的 HSRS 和 (D) 吸入 4% 的氫氣。在所有實驗中,每組對超過三隻大鼠的數據進行分析,並表示為平均值 \pm SEM。補充表 2 總結了大鼠的實際數量。

此外,Cmax 分析表明,口服 HSRW 導致脾臟、小腸和胰腺組織中的氫濃度很高(超過 300 ppb/g)。圖 4A)。同時,腹腔注射 HSRS 導致脾臟和胰腺中的氫濃度很高(超過 300 ppb/g)。如圖。4B)。然而,靜脈治療後任何組織中的氫濃度都不高(超過 35 ppb/g)。圖 4C)。有趣的是,吸入氫氣導致肌肉中的氫氣濃度最高(超過 140 ppb/g;圖 4D).

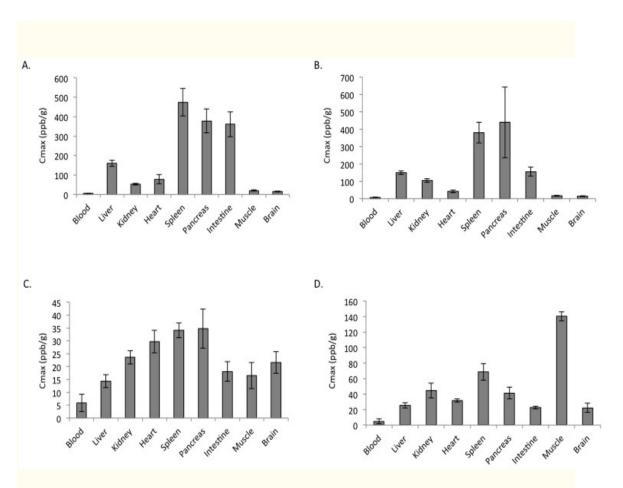


圖 4

不同組織中氫濃度的 Cmax 分析。

(A) \Box 服 5 ppm HSRW, (B) 腹腔注射 5 ppm 的 HSRS, (C) 靜脈注射 5 ppm 的 HSRS 和 (D) 吸入 4% 的氫氣。在所有實驗中,每組對超過三隻大鼠的數據進行分析,並表示為平均值 \pm SEM。補充表 2 總結了大鼠的實際數量。

如圖所示圖 5,我們比較了各種給藥方式(口服、腹腔內、靜脈內和吸入)後氫濃度的峰值。口服和腹腔內治療後肝臟、腎臟、脾臟、胰腺和腸道中的氫濃度顯著高於靜脈內或吸入給藥後觀察到的氫濃度。相比之下,與其他給藥方式相比,吸入氫氣會導致肌肉中的氫濃度顯著升高,而大腦中的氫濃度略高。

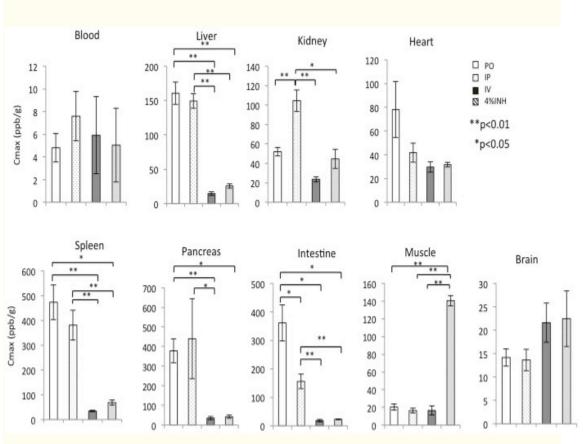


圖 5

使用不同給藥方法對氫濃度進行 Cmax 分析。

討論

在這項研究中,我們開發了一種改進的方法來檢測大鼠組織中的氫濃度。這種修改方法有兩個優點。第一個優點是使用 gentleMACS 的氣密性條件,這被證明可以防止氫氣在處理過程中從取樣組織中洩漏。如<u>補充圖 1</u>所示,在密封條件下,組織中的氫濃

度明顯低於使用傳統條件獲得的氫濃度,從而最大限度地減少了處理過程中組織樣品 的氫洩漏。

第二個優勢是高質量傳感器氣相色譜儀 SGHA-P1 的應用。SGHA-P1 配備有半導體氣體傳感器。與採用熱導檢測器的傳統氣相色譜相比,SGHA-P1 可檢測 10 ppb 的氫氣濃度,該值比傳統氣相色譜的檢測限高約 10 至 100 倍,離子-選擇性電極和鉑催化亞甲藍法。使用改進的方法,我們發現大鼠血液和組織中的氫濃度在口服和腹腔給藥後5 分鐘達到峰值。相比之下,氫氣濃度在靜脈給藥後一分鐘達到峰值,然後從一到五分鐘逐漸下降,最終達到對照水平。大鼠血液和組織中的氫濃度在吸入氫氣後 30 分鐘達到最高水平,隨後 30~60 分鐘開始呈現緩慢下降趨勢。這些結果表明,我們成功地建立了一種測定氫濃度的方法,該方法可用於在用 HSRW/HSRS 和氫氣處理後穩定檢測各種組織中的氫。迄今為止,許多研究人員已經報告了氫濃度 這些結果表明,我們成功地建立了一種測定氫濃度的方法,該方法可用於在用 HSRW/HSRS 和氫氣處理後穩定檢測各種組織中的氫。迄今為止,許多研究人員已經報告了氫濃度這些結果表明,我們成功地建立了一種測定氫濃度的方法,該方法可用於在用 HSRW/HSRS 和氫氣處理後穩定檢測各種組織中的氫。迄今為止,許多研究人員已經報告了氫濃度這些結果表明,我們成功地建立了一種測定氫濃度的方法,該方法可用於在用 HSRW/HSRS 和氫氣處理後穩定檢測各種組織中的氫。迄今為止,許多研究人員已經報告了氫濃度

最近的證據表明,HSRW、HSRS 和吸入氫氣具有抗氧化和抗凋亡特性,可以通過選擇性清除有害 ROS 1 來保護器官免受缺血再灌注損傷。該模型中氫的作用機制涉及該化合物防止氧化損傷的能力,如減少的核酸氧化和脂質過氧化 1 ~21 所示。此外,許多研究提供的證據表明,氫對各種器官的急性和慢性損傷具有保護作用 3.4.5.6.2.8.2.10.11.12.13.14.15.16.17。根據目前的數據,動物組織中的氫濃度在口服和腹腔內治療後五分鐘達到最大值;因此,就獲得顯著的 ROS 清除效果而言,用氫氣處理的最佳時間點可能是實驗開始前 5 分鐘。

已知炎症過程與氧化應激密切相關,一些研究已經探討了氫氣在抗炎治療中的潛力。 在炎症性疾病的動物模型中,據報導,氫氣可以減輕肝炎、結腸炎、胰腺炎、阻塞性 黃疸和敗血症 ¹³ ²² ²³ 的炎症。在炎症條件下,氫氣治療已被發現顯著降低白細胞介素 (IL)-6 和腫瘤壞死因子 (TNF)-α 以及其他炎症相關分子的水平,包括 IL-12 和乾擾 素 (IFN)-γ^{4,6,11}.目前的結果還顯示,在口服和腹腔內治療後,大鼠脾臟、小腸、胰 腺、肝臟和腎臟以及吸入氫氣後的肌肉、肺和睾丸(初步結果)中存在高濃度的氫 氣。基於這些數據,臨床醫生和研究人員可以選擇更有效的治療途徑,並探索氫氣是 否能抑制這些器官的炎症性疾病。

沒有報導氫在有效劑量下是有毒的,過量的可能性不大,因為過量的氫會通過肺 16 呼出。這種現象與維生素 C 和 E 等抗氧化劑的現象形成鮮明對比,後者在人體中的有效劑量高於耐受攝入量的上限 13.17.23. 根據目前的結果和先前的發現,通過每天口服或吸入氫氣治療,很有可能預防由 ROS 引起的慢性疾病。此外,這些治療可能會增加肌肉力量並改善不孕症。然而,治療急性和慢性炎症性疾病所需的有效氫濃度尚未明確。一種估算體內氫濃度的新方法本研究中描述的可能有助於確定該參數的截止值,至少在各種實驗動物模型中。器官組織中存在的氫氣在修剪和均質化後很容易擴散到空氣中。因此,很難準確估計器官組織中的氫濃度,這些值在一定程度上受背景影響。然而,我們的新方法幾乎沒有表現出背景效應。

許多實驗已經證明氫的治療效果基於其抗炎作用機制。然而,之前沒有報導顯示器官組織中的氫濃度是實現氫的治療益處所必需的。為了評估氫濃度與其生物學效應之間的相關性,我們進行了涉及用過飽和氫超富鹽水(HSRS)治療腎臟缺血再灌注損傷的實驗。在本實驗中,我們在小鼠中使用了兩種濃度的 HSRS(1.6 ppm 和 5 ppm)。因此,生存時間和臨床評分顯著改善,改善程度取決於 HSRS 的濃度。這些結果將在別處詳細描述(準備中的手稿)。體內和臨床改善。此外,疾病發病機制的急性和慢性炎症的機制取決於局部細胞浸潤的程度,以及整個身體或至少在某些淋巴組織中的浸潤。因此,了解每個器官中的氫濃度非常重要。如本研究所示,估計體內氫濃度的能力可能為精確研究氫的抗炎作用提供有用的信息。

總之,我們使用我們新開發的方法確定了各個器官中的氫濃度。我們的分析結果可能 有助於在許多臨床應用中使用氫,並為開發新的臨床療法提供有利的背景。

方法

動物

雄性 Wistar 大鼠 8 至 12 週齡,體重 180 至 200 克,購自靜岡實驗動物中心 (日本靜岡)。根據日本東京國家兒童健康與發展研究所動物使用和護理委員會的指 導方針,將所有大鼠維持在標準條件下並餵食囓齒動物食物和水。所有動物操作均根 據日本國家兒童健康與發展研究所實驗動物護理和使用委員會的建議進行。

HSRW、HSRS 和氫氣的製備

HSRW 和 HSRS 分別使用 Hydrogen water 7.0 (ECOMO International Co. Ltd., Fukuoka, Japan) 用純淨水和鹽水製備(圖 1A)。使用溶解氫試劑亞甲藍試劑盒 (MiZ Co. Ltd, Kanagawa, Japan) 測量,HSRW 和 HSRS 中溶解氫的濃度為 1.25、2.5 和 5.0 ppm。使用氫氣供應裝置(MiZ Co. Ltd.)製備三種濃度(1%、2% 和 4%)的氫氣(圖 1B) 並使用高濃度檢測器 XP-3140 (New Cosmos Electric Co. Ltd., Osaka, Japan) 進行測量。

HSRW 和 HSRS 治療方案

大鼠被關在兩組中。HSRW 和 HSRS 組分別口服 HSRW 和腹腔或靜脈注射三種濃度 $(1.25 \times 2.5 \text{ 和} 5.0 \text{ ppm})$ 的 HSRS,而對照組給予蒸餾水和生理鹽水。在 HSRW 和 HSRS 口服和腹腔給藥後 $5 \times 15 \times 30$ 和 60 分鐘以及 1×3 和 5 分鐘獲得肝、腎、心臟、脾臟、胰腺、腸、肌肉和腦的動脈血和組織靜脈注射 HSRS 後。

氫氣處理方案

通過氫氣供應裝置對大鼠進行三種濃度的混合氣體(分別為 1%氫氣和 99%空氣、2%氫氣和 98%空氣和 4%氫氣和 96%空氣)處理。使用氣體檢測器 XP-3140 (Newcosmos Ltd. Co, Tokyo, Japan)測定混合氣體中的氫濃度。吸入不同濃度氫氣後 30分鐘和 60分鐘,分別採集肝、腎、心、脾、胰、腸、肌肉和腦的動脈血和組織。組織解離和動脈血和組織中氫濃度的測定

取樣後立即將組織放入充滿純空氣(Taiyo Co. Ltd.,Tokyo,Japan)的 gentleMACS 管(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germen)中,然後使用 gentleMACS TM ^{均質化} Octo 解離劑 (Miltenyi Biotec)。然後,用注射器通過橡膠層收集管中的 2ml 氣體。隨後使用高質量傳感器氣相色譜儀(SGHA-P1;FIS Co. Ltd.,Hyogo,Japan)測量氫濃度。將每份動脈血樣置於充滿純淨空氣的玻璃試管中,採集 2ml 氣體進行測定。每個血液或組織樣本中的氫濃度定義如下:氫濃度(ppb/g;V/V)=A/B×C;其中 A 是使用傳感器氣相色譜儀獲得的測量值,B 是血液或組織重量 (g),C 是 gentleMACS 管的體積(24 ml)。

統計分析

所有實驗數據代表三個以上的獨立實驗,表示為每個實驗的平均值 \pm 標準誤差 (SEM)。學生 t 檢驗用於比較配對和非配對變量。

作者貢獻

CL 和 RK 進行了實驗。MF 和 XK.L. 寫了手稿。MF、SH、BS 和 X.-KL 設計了實驗並分析了數據。

補充材料

補充資料:

補充資料

點擊這裡杳看。(226K'PDF)

參考

- 1. 大澤一世 *等人。* 氫通過選擇性地減少細胞毒性氧自由基作為治療性抗氧化劑。Nat Med **13**, 688-694, 10.1038/nm1577 (2007)。[考研] [谷歌學術]
- 2. 向 L. 等。吸入氫氣可減少豬大肝切除術期間的肝損傷。*World J Gastroenterol* **18**, 5197-5204, 10.3748/wjg.v18.i37.5197 (2012)。[PMC 免費文章][PubMed][Google Scholar]
- 3. Nakao A.、Toyoda Y.、Sharma P.、Evans M. 和 Guthrie N. 富氫水對潛在代謝綜合徵受 試者抗氧化狀態的有效性———項開放標籤試點研究。*J Clin Biochem Nutr* **46**,140–149,10.3164/jcbn.09-100 (2010)。[PMC 免費文章][PubMed][Google Scholar]
- 4. 謝 K. 等。氫氣通過減少氧化應激和 HMGB1 釋放對小鼠多種微生物敗血症的保護作用。衝擊 34, 90-97, 10.1097/SHK.0b013e3181cdc4ae (2010)。[考研] [谷歌學術]
- 5. 鄭 X. *等人。* 富氫鹽水可防止大鼠腸道缺血/再灌注損傷。*自由基 Res* **43、478-484、10.1080** /10715760902870603 (2009)。[考研] [谷歌學術]
- 7. 李傑等 \mathcal{L} 。富氫鹽水通過減少氧化應激改善了 β -澱粉樣蛋白誘導的阿爾茨海默病大鼠模型的記憶功能。 $Brain\ Res\ 1328$, 152-161, 10.1016/j.brainres.2010.02.046 (2010)。 [考研] [谷歌學術]

- 8. 陳 C. 等。富氫鹽水可防止大鼠脊髓損傷。Neurochem Res **35**, 1111-1118, 10.1007/s11064-010-0162-y (2010)。[考研] [谷歌學術]
- 9. 林田 K. *等人。*吸入氫氣可減少大鼠心肌缺血再灌注損傷模型的梗死面積。*Biochem Biophys Res Commun* **373**, 30–35, 10.1016/j.bbrc.2008.05.165 (2008)。[考研] [谷歌學術]
- 10. Matsushita T.、Kusakabe Y.、Kitamura A.、Okada S. & Murase K. 使用血氧水平依賴性磁共振成像研究富氫水對順鉑誘導的大鼠腎毒性的保護作用。*Jpn J Radiol* **29**, 503–512, 10.1007/s11604-011-0588-4 (2011)。[考研] [谷歌學術]
- 11. 紅衣主教 JS 等。口服氫水可預防大鼠慢性同種異體移植腎病。*腎臟詮釋* 77,101-109,10.1038/ki.2009.421 (2010)。[考研] [谷歌學術]
- 12. Shingu C. *等人。* 富氫鹽水溶液可減輕腎缺血再灌注損傷。*J Anesth* **24**, 569–574, 10.1007/s00540-010-0942-1 (2010)。[考研] [谷歌學術]
- 13. Kajiya M. *等人。*來自腸道細菌的氫氣對伴刀豆球蛋白 A 引起的肝炎具有保護作用。 *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 316–321, 10.1016/j.bbrc.2009.06.024 (2009)。[考 研][谷歌學術]
- 14. 錢 L. *等人。* 氫對輻照小鼠的潛在心臟保護作用。*J 輻射水庫* **51**,741-747 (2010)。 [考研] [谷歌學術]
- 15. 林田 K. *等人。* H(2) 氣體改善心臟驟停後的功能結果,其程度與大鼠模型中的低溫治療相當。 *J Am Heart Assoc* 1,e003459,10.1161/jaha.112.003459 (2012)。 [PMC 免費文章] [PubMed] [Google Scholar]
- 16. 寺崎 Y. *等人。* 氫療法通過減少氧化應激來減輕輻射引起的肺損傷。*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **301**, L415-426, 10.1152/ajplung.00008.2011 (2011)。[考研] [谷歌學 術]
- 17. Liu C.、Cui J.、Sun Q. 和 Cai J. 氫療法可能是治療急性放射綜合徵的一種有效且特異性的新療法。醫學假設 74, 145-146, 10.1016/j.mehy.2009.07.017 (2010)。[考研] [谷歌學術]
- 18. 毛 YF *等人。*富氫鹽水可減少大鼠腸道缺血/再灌注引起的肺損傷。*Biochem Biophys Res Commun* **381**, 602-605, 10.1016/j.bbrc.2009.02.105 (2009)。[考研] [谷歌學術]

- 19. 伊藤 T. 等人。分子氫抑制 FcepsilonRI 介導的信號轉導並防止肥大細胞脫粒。 *Biochem Biophys Res Commun* **389**, 651-656, 10.1016/j.bbrc.2009.09.047 (2009)。
- 20. [考研] [谷歌學術]
- 21. Nagata K.、Nakashima-Kamimura N.、Mikami T.、Ohsawa I. & Ohta S. 分子氫的消耗可 防止小鼠慢性身體約束期間海馬依賴學習任務中的壓力誘導損傷。*神經精神藥理* 學**34**,501–508,10.1038/npp.2008.95 (2009)。[考研] [谷歌學術]
- 22. 林 T. 等人。吸入氫氣可減弱小鼠間歇性缺氧引起的左心室重構。*Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**,H1062-1069,10.1152/ajpheart.00150.2011 (2011)。
- 23. [考研] [谷歌學術]
- 24. Kajiya M.、Silva MJ、Sato K.、Ouhara K. 和 Kawai T. Hydrogen 介導抑制葡聚醣硫酸 鈉誘導的結腸炎症。*Biochem Biophys Res Commun* **386**, 11–15, 10.1016/j.bbrc.2009.05.117 (2009)。[考研] [谷歌學術]
- 25. 陳赫 *等人。* 富氫鹽水可改善大鼠 l-精氨酸誘導的急性胰腺炎的嚴重程度。*Biochem Biophys Res Commun* **393**, 308–313, 10.1016/j.bbrc.2010.02.005 (2010)。
- 26. [考研] [谷歌學術]

科學報告中的文章由自然出版集團提供

國家醫學圖書館 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894