

# 中華民國第 59 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學科

第三名

052008

利用致敏小鼠模式探討氫水治療氣喘之效能

學校名稱：臺北市立麗山高級中學

作者： 高二 邱筠恩	指導老師： 郭瓊華 蕭國偉
---------------	---------------------

關鍵詞：氫水、氣喘、過敏

## 摘要

近年氣喘盛行率逐年提高使得醫療支出越來越多。目前類固醇是被廣泛利用的藥物，長期使用會有許多副作用。氫分子醫學近十幾年的研究指出氫分子具有抗氧化、抗發炎等效能降低對細胞的損傷，因此本研究想探討氫水治療氣喘的可能性。

本研究以氫水作為實驗藥物，利用 A549 細胞給予 LPS 刺激模擬發炎反應，檢測氫水對於細胞之毒性，發現氫水對細胞不會產生毒性，且觀察到氫水可以透過抑制細胞核內的 STAT3 路徑，降低 IL-6 基因表現，進而抑制 LPS 刺激 A549 細胞後所產生的發炎反應 IL-6 及 IL-8 分泌量。最後，利用氣喘小鼠模式給予氫水治療，檢測其呼吸道阻力的變化以及血清中 IgG1 抗體，結果顯示氫水治療的小鼠有些微減緩氣喘病徵，整體來說氫水是有潛力發展成一種氣喘的治療藥物。

## 壹、研究動機

氣喘為一種慢性呼吸道發炎疾病，其主要的症狀為肺部慢性發炎、呼吸道過度反應、血清中大量的抗原專一性抗體增加...等現象，會造成呼吸道變窄、上層粘膜腫脹導致呼吸困難。近幾十年來，因環境汙染嚴重，氣喘疾病在台灣的罹病率逐年攀升且有年輕化的趨勢，它不僅影響人的健康，更浪費了許多醫療及社會資源，因此，如何調節氣喘或是過敏疾病的嚴重度，成為目前重要的議題。(劉燦榮，2017)

現今氣喘的治療藥物主要有類固醇、乙二型交感神經興奮劑、副交感神經拮抗劑、白三烯拮抗劑等，其中又以類固醇-潑尼松龍 (Prednisolone) 最被廣泛使用，雖然其治療效果十分顯著，但如果長期使用的話卻有許多的副作用，如月亮臉、皮膚變薄、容易淤青、高血壓、高血糖、骨質疏鬆、白內障、青光眼、免疫功能降低、兒童生長遲緩等，且停藥時會有戒斷症狀，故需循序減量，不可突然停藥(陳琦華，2007；郭昶宏，2013)，因此本計畫希望能找到副作用較少的替代治療藥物，也就是氫水。

氫氣是無色無味及無臭的雙原子分子，是自然界相對分子質量最小的氣體。氫氣的擴散速度快，據科學文獻指出，在液體或人體組織中，氫分子能自由穿透細胞膜至細胞質，亦可直接進入粒線體，保護細胞內的胞器。氫分子醫學是近十幾年來開始蓬勃發展，研究發現氫分子具有抗氧化、抗發炎，能降低氧化壓力對細胞的損傷，並抑制細胞凋亡及抗敏感性。(太田成男，2007；孫學軍，2014)

而氫氣用於氣喘的研究也已有初步成果(Katherine et al., 2007)，但確切治療機制尚未釐清，加上氫氣是極度易燃之氣體，具有危險性，因此本研究改使用飽和氫水作為測試藥物，首先

想探討氫水對於人類肺上皮細胞或動物是否有毒性；接著，觀察氫水是否能降低人類肺上皮細胞的發炎反應；並進而探討氫水在細胞中的影響的機轉路徑為何；最後，利用氣喘小鼠模式模擬氣喘病人施予氫水治療之後，是否能有效減緩氣喘症狀，因此本研究希望可提供一些氣喘新的治療方向，使得氣喘病患能得到更好的醫療照護。

## 貳、研究目的

- 一、 測試氫水對 A549 細胞之毒性
- 二、 檢測氫水是否能降低 A549 細胞對於 LPS 所產生的發炎反應
- 三、 探討氫水在 A549 細胞中的作用機轉
- 四、 探討氫水是否能減緩致敏小鼠的氣喘症狀

## 參、研究設備與器材

器材	用途	器材	用途
細胞培養箱	細胞培養	離心機	離心細胞
無菌操作台	細胞實驗用	蛋白質轉漬器	Western
酵素免疫分析儀	ELISA 檢測用	聚合酶鏈鎖反應儀	RT-PCR
凝膠電泳	膠體電泳	呼吸道反應儀	AHR
垂直電泳	Western	微波爐	製作膠體電泳
-80 度冰箱	保存檢體		

## 肆、研究方法與過程

### 一、細胞實驗：

使用人類肺上皮細胞株 A549 來模擬氣喘病患接觸外來物質刺激的體外研究模式，給予氫水作為治療方針，進而觀察氫水在細胞發炎反應機制中的作用機轉。

實驗流程規劃如下：第一天培養人類肺上皮細胞 A549，第二天按照組別加入氫水或緩衝液做對照，經過一個小時前處理後，加入酯多糖 (LPS) 刺激細胞發炎，其發炎反應相關路徑圖如下圖所示。刺激後 24 小時收集其上清液或細胞裂解液，後續檢測各發炎指標的反應。



LPS 刺激發炎路徑圖

#### (一)細胞株

使用人類肺上皮細胞株 A549 模擬氣喘病患接觸外來物質刺激的體外研究模式，以含 10% 去活性胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 和 1% penicillin/streptomycin 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) 培養液，置於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的培養箱裡培養，每三天繼代一次。

#### (二)藥物治療及刺激

於 24-well 盤中種  $2 \times 10^5$  細胞，在藥物治療部分，實驗總共分成四組，第一、二組加入 250  $\mu$ l 磷酸緩衝液 (PBS) 作為藥物的控制組，而第三組則是加入 250 $\mu$ l 氫水為實驗組，最後第四組則是給予 4 mM 的 prednisolone 250  $\mu$ l 作為類固醇對照組。而在刺激部分，除了第一組不給予 LPS 刺激之外，其餘三組都給予 1  $\mu$ g/ml LPS 作為發炎刺激物。

實驗組別	PBS	PBS	氫水(H <sub>2</sub> )	prednisolone
1 µg/ml LPS	-	+	+	+

### (三)檢驗方式

#### 1. 細胞毒性檢測

將以 Cell Counting-kit 8 (CCK-8, Sigma) 套組來進行, 以 CCK-8 (以 PBS 做 10X diluted) 加入經藥物處理之細胞之後, 靜置於 37°C 培養箱反應 4 小時, 再以 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) plate reader (Tecan System, San Jose, CA, USA) 檢測 450 nm 的吸光值。

#### 2. ELISA 檢測細胞上清液中 IL-6、IL-8 濃度

將使用 ELISA 測定套組 (R&D Systems, Inc.) 來檢測細胞上清液中發炎介質 IL-6、IL-8 的含量, 首先 coating 一級抗體, 於室溫下靜置 16~18 小時, 使用 0.5% Tween20 清洗三次, 加入 1% BSA (以 PBS 稀釋) 做 blocking, 經過 1 小時室溫下作用後, 清洗三次, 加入稀釋好的樣品及標準品 (以 1% BSA 做稀釋), 在室溫下作用 2 小時, 再清洗三次, 加入二級抗體, 於室溫下反應 2 小時, 再次清洗三次, 加入 HRP 酵素在室溫下反應 30 分鐘, 清洗三次, 最後加入 TMB 試劑呈色, 30 分鐘後為了終止反應加入 2M 硫酸, 此時反應試劑的藍色會變成黃色, 再以 ELISA plate reader 檢測 450 nm 的吸光值。

#### 3. 抽取細胞 RNA 測 IL-6 之基因表現量。

##### (1) 抽取 RNA

將經不同藥物處理之細胞, 加入適量的 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 於試管中, 研磨後靜置於室溫 5 分鐘。之後加入氯仿混合後, 以 4 度, 13,000 xg 的條件下離心 15 分鐘, 分成三層後, 將最上面的水層取至另一個新的試管中, 並取等量體積之異丙醇與水層溶液均勻混合, 靜置 10 分鐘。之後在以 4 度, 13,000 xg 的條件下離心 10 分鐘, 離心後倒掉上層有機溶液後, 再以 1 ml 75% ethanol 清洗一次, 接著在 4 度, 7,400 xg 的條件下離心 5 分鐘。離心後倒掉上層

液體後，將 RNA pellet 以風乾的方式乾燥，並將 RNA 溶於 diethylpyro - carbonate (DEPC, Sigma) 處理過的二次水中，保存於 -80 度的冰箱中，之後再以 OD260 nm 之吸光值來定量，每一個 OD 讀值約等於 40  $\mu$ g/ml RNA 的量。

(2)反轉錄-聚合酶鏈反應 (RT-PCR):

將定量完成的 RNA，取 1  $\mu$ g 的 total RNA，在反轉錄酶緩衝溶液 (1 $\times$ RT buffer, Thermo Fisher Scientific) 中，經反轉錄酶 (MMLV-reverse transcriptase, Thermo Fisher Scientific) 在 42 度, 1 小時的作用下, 以 oligo-dT 為 primer 將 mRNA 反轉錄成 cDNA。所得到的 cDNA 接著進行聚合酶鏈反應 1 $\times$ PCR buffer、0.25mM dNTP、0.5U Taq DNA polymerase (DreamTaq, Thermo Fisher Scientific)。於反應中加入對  $\beta$ -actin 及 IL-6 基因有特異性的 primers, 進行 25 cycles 的擴增反應, 整體反應時間約 2 個小時。反應完成的產物會置入於 1.2% 的 Agarose gel 中以 100V 電壓下, 跑約 20~25 分鐘, 使擴增的 DNA 利用大小方式分離, 最後使用 EtBr 染色約 10 分鐘, 並使用 UVP 機器將影像拍攝保存。

以下為 primers 資訊

$\beta$ -actin	F (5' ) AAGACCTCTATGCCAACACAGT (3' ) R (5' ) AGCCAGAGCAGTAATCTCCTTC (3' )
Human-IL-6	F (5' ) GGAAATCGTGGAAATGAG (3' ) R (5' ) GCTTAGGCATAACGCACT (3' )

4. 利用西方墨點法檢測發炎相關訊息傳遞的蛋白質

(1) 萃取細胞蛋白質

將經不同藥物處理之細胞於刺激後 30 分鐘加入核質蛋白質萃取液 (10mM Tris pH7.9, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 5mM DTT, 0.1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 2mg/ml aprotinine, 2mM leupeptin) 0.5 ml, 於冰上使用刮勺將細胞刮散並與萃取液混和均勻, 4 度離心機以 5800rpm 離心 8 分鐘, 將上清液取出, 此上清液為細胞質之成份。沉澱物則加入 100ml 之 extraction buffer (10mM Tris pH7.9, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM KCl, 5mM DTT, 0.5mM PMSF, 2mg/ml aprotinine, 2mM leupeptin, 20%v/v glycerol) 混合均勻置於冰上 45 分鐘後, 離心 12000rpm 20 分鐘, 取出上清液部分即為細胞核內之成分。

(2) 蛋白質定量:

根據標準品和樣品的數量, 將 BCA Reagent A : BCA Reagent B 按 50 : 1

的體積配製 working solution (BCA 套組, Thermo Fisher Scientific), 充分混合均勻。配製標準液: 取 10  $\mu$ l 蛋白標準液加 PBS 稀釋至 100  $\mu$ l 使最終濃度為 0.5 mg/ml, 在將稀釋後的標準液按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20  $\mu$ l 分別加到 96 孔盤中做序列稀釋, 加入 PBS 補足到 20  $\mu$ l。待檢測之樣品也取 20  $\mu$ l 到 96 孔盤中, 再於各孔加入 200  $\mu$ l BCA working solution, 混合均勻, 置於 37°C 培養箱中反應 30 分鐘。最後以 ELISA plate reader 檢測 550 nm 的吸光值測定蛋白濃度。

### (3) 聚丙烯醯胺膠體電泳法 (SDS-PAGE Assay):

首先配製 acrylamide gel (上膠為 8%, 下膠為 12%), 配製完成的膠體放置於電泳槽內, 加入電泳緩衝液 (running buffer: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1 % SDS), 接著將定量完成的蛋白質取 10 $\mu$ g 與 protein loading dye 混合, 以 100 度加熱變性 10 分鐘, 並冰浴冷卻後稍微離心。將各樣品及蛋白質 ladder 依序注入膠體的孔槽中, 通以電壓 60V 跑約 20~30 分鐘, 待樣品通過上膠聚集完成後將電壓調整為 100V, 使蛋白質以大小方式分離, 約跑 1~2 小時, 等樣品跑至一定的距離時再關閉電源。

### (4) 西方墨點法 (Western Blot):

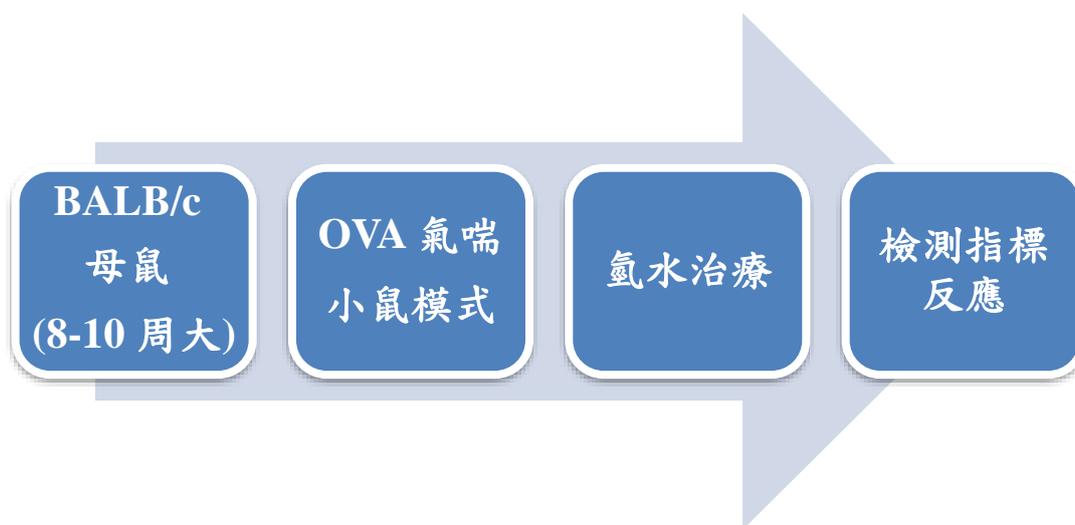
蛋白質樣品以 SDS-聚丙烯醯胺電泳展開後, 使用半乾式轉漬器將膠體上的蛋白質轉印到 NC 膜上, 轉印後之 NC 膜浸泡在含有 5 % BSA 的 TBST 緩衝液, 在室溫下輕輕搖晃 1 小時, 接下來將 NC 膜浸泡於一級抗體溶液中於 4 度冰箱中緩慢搖晃反應 16~18 小時, 以 0.1% TBST 沖洗 3 次, 每次搖晃 5 分鐘, 再浸泡於二級抗體溶液中, 在室溫下輕輕搖晃 1 小時, 再以 0.1% TBST 沖洗 3 次各 5 分鐘, 最後加入冷光染劑反應 1 分鐘, 以 UVP 機器將影像拍攝保存。

本研究檢測發炎相關訊號傳遞所使用的一級抗體包括:

細胞質的蛋白質部分有抗  $\beta$ -actin、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38、STAT3 及 NF- $\kappa$ B p65。另外細胞核的蛋白質部分則有抗 PCNA、STAT3 和 NF- $\kappa$ B p65。

## 二、動物實驗:

使用 BALB/c 母鼠 (大約 8~10 周大) 給予雞卵蛋白 (OVA) 建立慢性氣喘小鼠模式模擬氣喘病患遇到過敏原時的氣喘反應, 並於動物模式的第 21 天到 28 天, 連續 7 天給予氫水治療後觀察氫水是否能夠有效緩解氣喘徵狀。

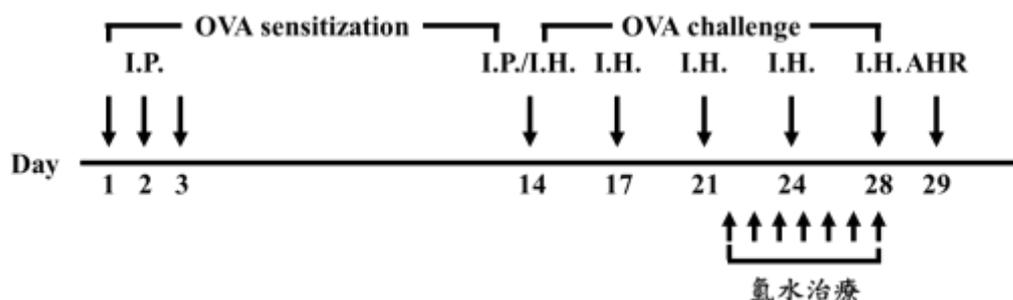


### (一) 實驗材料

BALB/c 母鼠 (大約 8 致 10 周大) 購於國家動物中心，飼養在長庚大學符合規範的動物房中，在恆定的溫度下，於 12 小時/ 12 小時的明暗循環進行控制動物的生活環境。

### (二) OVA 氣喘小鼠模型

將約 8 周大的 BALB/c 母鼠隨機分成 4 組，每組各 3 隻小鼠，第一組為對照組，第二組為疾病組，第三組為氫水治療組，第四組為類固醇治療組。以 50  $\mu$ g OVA (以 200  $\mu$ l 的生理食鹽水配製) 加上 0.8mg 佐劑 (Imject  $\text{\textcircled{R}}$ , Thermo Fisher Scientific) 進行腹腔注射，連續 3 天注射，在第 14 天，再追加一劑。並於第 14 天開始，每週 2 次，將小鼠置於透明蒸餾鍋中以霧化器 (Pulmo-aide, DeVilbiss, Somerset, PA, USA) 將 2% OVA 蒸氣送入鍋中對老鼠進行 20 分鐘的激發，一共進行 5 次，對照組則施以生理食鹽水蒸氣，取代 OVA 蒸氣，進行相同步驟。於最後一次的蒸氣吸入誘發氣喘之 24 小時後進行呼吸道阻力測試。實驗設計參考自賴郁婷(2012)及曾獻豪(2017)，之後進行修正。



### (三) 藥物治療

在氣喘模式第 21 天到 28 天，對照組 (N) 及疾病組 (S) 的小鼠以腹腔注射給予

400µl 的二次水作為藥物控制組，氫水治療組 (SH2) 的小鼠以腹腔注射給予 400µl 的氫水給予治療，而類固醇治療組 (SP) 的小鼠則以腹腔注射給予濃度為 20mg/kg 的 prednisolone (溶於二次水中) 400µl。

實驗組別	對照組 (N)	疾病組 (S)	氫水治療組(SH <sub>2</sub> )	類固醇治療組 (SP)
OVA	-	+	+	+
治療	二次水	二次水	氫水	Prednisolone

#### (四)檢驗方式

1. 外觀判定：觀察小鼠在 AHR 實驗中的氣喘症狀與活動力的改變，以錄影的方式記錄當時小鼠喘的程度，並給予等級評分。

2. 呼吸道過度反應 (Airway hyper-responsiveness, AHR)

將經過給予藥物療程之小鼠，以全腔式動物肺功能測定系統 (BUXCO, DSI Inc, USA)，進行活體呼吸道阻力測定。小鼠於腔室中會施予 1 分鐘的蒸氣，偵測 3 分鐘，休息 1 分鐘的循環，連續以 0、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/ml 不同濃度的 methylcholin chloride (Sigma) 蒸氣誘發氣管收縮，分別收集其數值，由感測器偵測小鼠呼吸速率及氣流量變化與大氣比較相對壓差後，經電腦換算出呼吸道阻力 (Penh 值)，觀察其呼吸道敏感度變化情形，作為肺功能判讀依據，再以統計軟體分析。

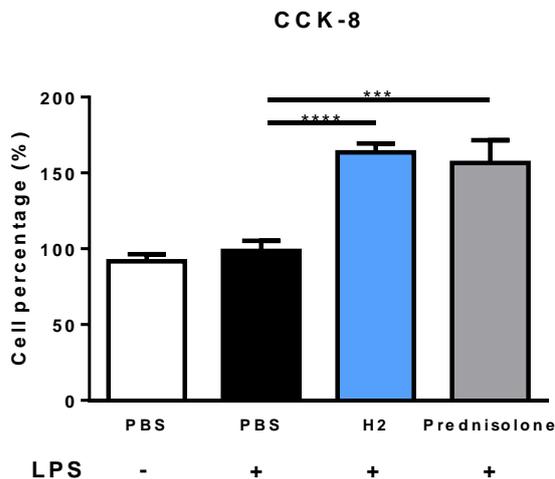
3. 使用 ELISA 檢測小鼠血清中的抗原特異性抗體

測定小鼠血清中 OVA specific-IgE 及 OVA specific-IgG1 抗體的含量。先 coating 100µg OVA 於 96-well 盤中於 37 度培養箱作用 1 小時，以 0.1% Tween20 (以 PBS 稀釋) 清洗三次，再使用 1% BSA 做 blocking 於 37 度培養箱作用 30 分鐘，再清洗 3 次，加入稀釋好的樣品或實驗室自製的標準品，於 37 度培養箱作用 1 小時，清洗 3 次，加入二級抗體，再 37 度培養箱作用 1 小時，清洗 3 次，加入 HRP 酵素於室溫下反應 30 分鐘，清洗 3 次後，最後加入 TMB 試劑呈色，反應 30 分鐘後為了終止反應加入 2M 硫酸，使溶液由藍色轉變成黃色，再以 ELISA plate reader 檢測 450 nm 的吸光值。

## 伍、研究結果與討論

### 一、檢測氫水對於細胞是否有毒性

我們使用 CCK-8 套組來檢測氫水是否對於 A549 細胞產生毒性，判別方式是以 OD 值判定，若數值越高則代表細胞內的酵素活性越強，也就是說活著的細胞數量就越多，相反的，數值越低代表活著的細胞數較少（圖一）。當我們以有給予 LPS 刺激的控制組的 OD 平均值作為 100% 基準值，其他組別以相對換算量來一比較。細胞毒理實驗的結果來看，給予 LPS 刺激後的細胞相較於沒有 LPS 刺激的細胞其並沒有差異 (-LPS: 91.7%; +LPS: 100%)，表示 LPS 的刺激不會使細胞死亡。而氫水實驗組或潑尼松龍對照組的細胞存活率明顯高於兩者控制組，因此顯示氫水對細胞是無毒害的。進而比較氫水與潑尼松龍兩者細胞存活率，整體來說氫水又比潑尼松龍數值來得更高 (H<sub>2</sub>: 163.6%; Prednisolone: 156.6%)，顯示氫水可能促進細胞活化能力比潑尼松龍好。

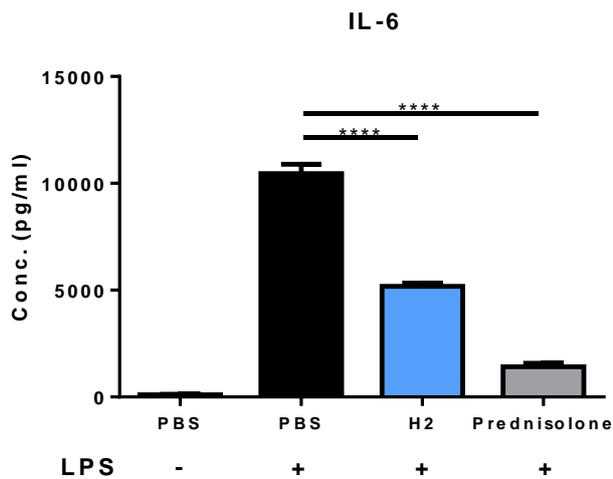


圖一、各處理組對細胞存活率的影響

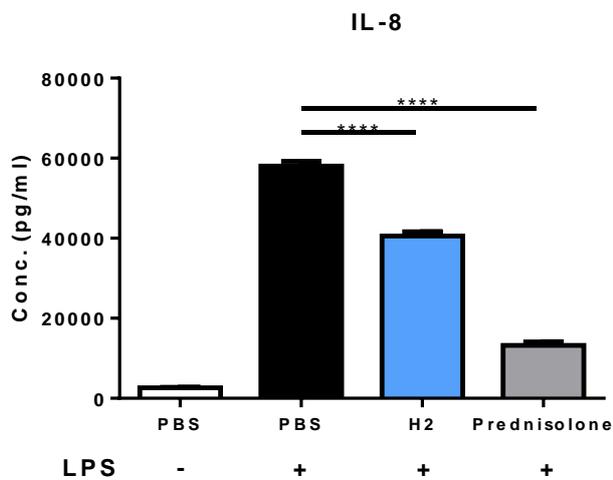
(註: \*表示與+LPS 的控制組做比較, \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\*表示  $p < 0.0001$ 。)

### 二、觀察氫水是否能降低人類肺上皮細胞的發炎反應

當 A549 細胞受到 LPS 刺激後會產生 IL-6、IL-8 的發炎物質，因此我們利用 ELISA 技術來檢測細胞上清液中兩者的含量（圖二和三）。ELISA 結果顯示，有給予 LPS 刺激的細胞 (IL-6: 10459.7 pg/ml; IL-8: 58059.4 pg/ml) 與沒有刺激的細胞 (IL-6: 102.5 pg/ml; IL-8: 2652.4 pg/ml) 相比，IL-6 及 IL-8 有大量分泌的現象。給予氫水後 IL-6 及 IL-8 都有顯著的降低 (IL-6: 5175.3 pg/ml; IL-8: 40581.6 pg/ml)，而潑尼松龍對照組也有相同趨勢 (IL-6: 1424.3 pg/ml; IL-8: 13221.8 pg/ml)，顯示氫水能有效抑制發炎反應所產生的發炎介質。



圖二、各處理組中 IL-6 濃度的差異，顯示氫水能降低 A549 細胞受 LPS 刺激後 IL-6 的分泌 (註: \*表示與+LPS 的控制組做比較， \*\*\*\*表示  $p<0.0001$ 。)

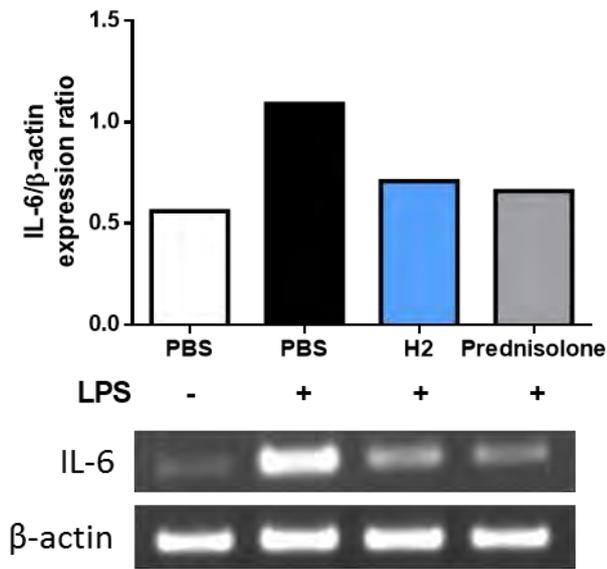


圖三、各處理組中 IL-8 濃度的差異，顯示氫水能降低 A549 細胞受 LPS 刺激後 IL-8 的分泌 (註: \*表示與+LPS 的控制組做比較， \*\*\*\*表示  $p<0.0001$ 。)

### 三、觀察氫水是否能降低人類肺上皮細胞的發炎物質的基因表現

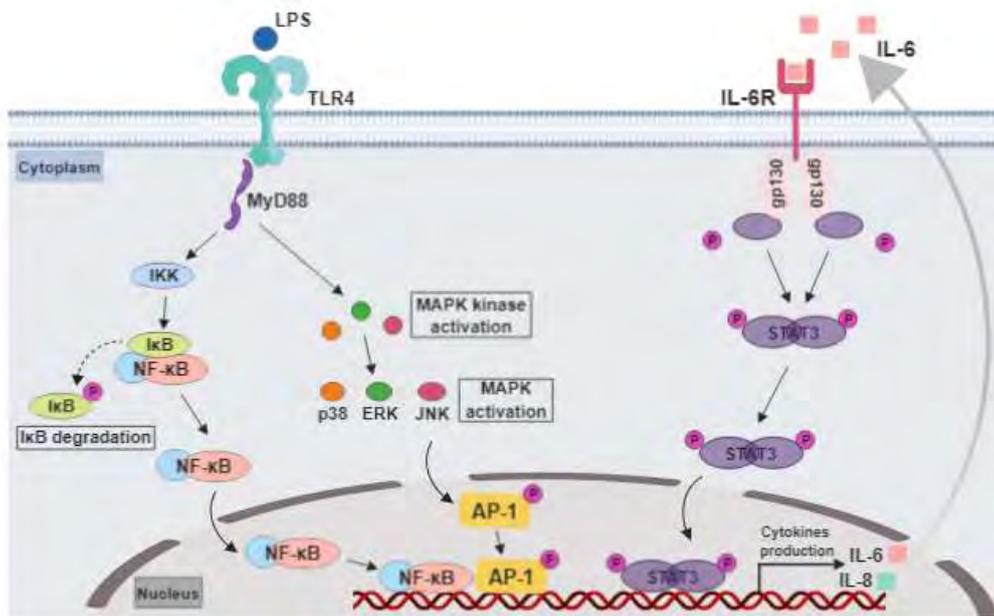
當 A549 細胞受到 LPS 刺激後會開啟 IL-6 的基因表現，使的 IL-6 蛋白質大量分泌，因此我們使用 RT-PCR 方式檢測細胞中 IL-6 基因表現是否受氫水的影響 (圖四)。PCR 結果顯示， $\beta$ -actin 亮度一致顯示 DNA 的品質一致。而有給予 LPS 刺激的細胞與沒有刺激的細胞相比，*il6* 基因表現有增加的現象，且給予氫水及潑尼松龍後，兩者的 IL-6 基因表現都有明顯降低，

並以量化圖展示趨勢，顯示氫水可能透過抑制 IL-6 基因表現而達到**控制發炎的反應**。



圖四、各處理組中 IL-6 基因表現濃度的差異，氫水能抑制 IL-6 基因表現

#### 四、探討氫水在細胞中的影響的機轉路徑為何

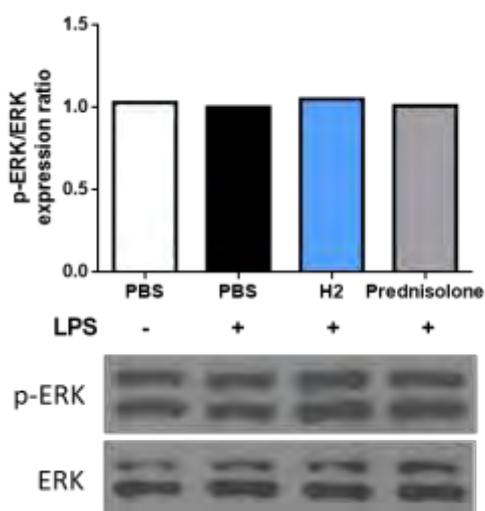


LPS 接上細胞膜上的受體，促使細胞質內特定蛋白質聚合，活化兩條細胞質中的發炎路徑，左邊為 NF-κB 活化路徑，IκB 磷酸化後會降解，促使 NF-κB 活化進入細胞核中，右邊為 MAPK 活化路徑，促使 p38、ERK、JNK 的磷酸化，並使 AP-1 磷酸化進入細胞核中，在細胞核內 NF-κB 與 AP-1 為轉錄因子開啟發炎介質細胞因子等的基因表現，產生相關的發炎介質，例如 IL-6、IL-8 蛋白質分泌至細胞外。而細胞外的 IL-6 發炎介質則又會再次與 IL-6 受體(IL-6R)

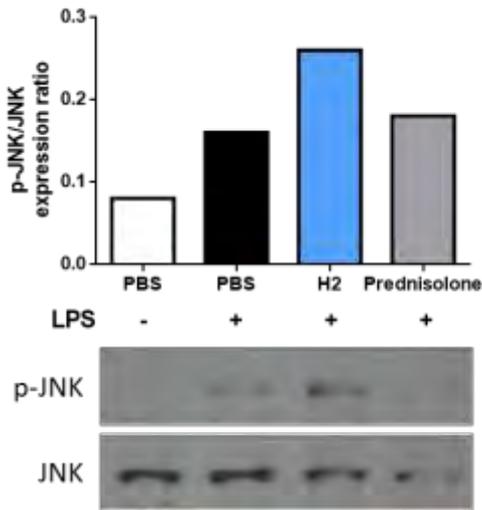
結合，進而開啟 STAT3 轉錄因子的表現，磷酸化的 STAT3 會再次進入細胞核中加強 IL-6 蛋白質的製造形成正回饋的現象，導致發炎反應加劇。

我們針對此 LPS 刺激路徑下游的發炎蛋白質訊號傳遞路徑做一系列的檢測，利用西方墨點法來觀察氫水對於哪一條下游的蛋白質訊號傳遞有影響。細胞質的部分，我們偵測了  $\beta$ -actin、ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38、NF- $\kappa$ B p65 及 STAT3 (圖五、六、七、八)。結果顯示， $\beta$ -actin 的亮度皆一致，表示細胞質蛋白質的含量一致 (圖八)。我們發現經過不管細胞是否有刺激其 p-ERK 及 ERK 含量非常多，因此四組實驗組別之間並沒有變化，可能原因猜測是加入的蛋白質含量過多，導致達到偵測的飽和上限，可能需要再嘗試少一點的蛋白質含量，看看是否能把差異拉開 (圖五)。有趣的是在 JNK 的部分，當細胞受到 LPS 刺激時 p-JNK 會些微的增加，但給予氫水後 p-JNK 有更活化的趨勢，而潑尼松龍也有相同現象，但比較不顯著，顯示氫水無法抑制 p-JNK 此條路徑(圖六)。而在 p38 的部分，我們發現四組的 p-p38 測不太到，導致實驗組之間沒有變化，可能原因猜測是收取蛋白質的時間不適當，或許 p38 的訊號在刺激後 30 分鐘是測不到活化態的，因此可以多收取不同刺激的時間點來檢測是否推測正確 (圖七)。細胞質中 STAT3 及 NF- $\kappa$ B p65 轉錄因子的部分，一樣四組之間看不到任何差異，顯示氫水並非通過這些路徑來抑制 IL-6 的表現量。(圖八)。

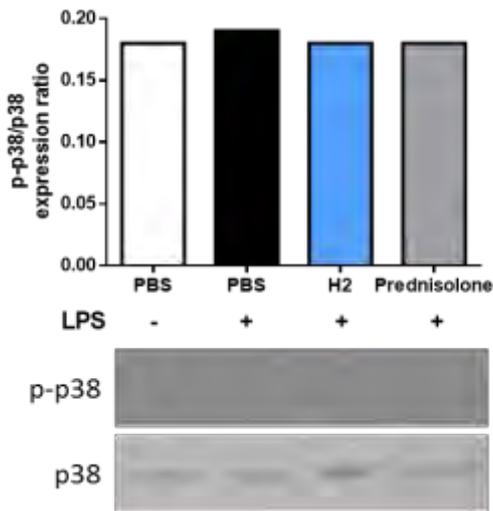
另外細胞核的蛋白質部分則有檢測 PCNA、NF- $\kappa$ B p65 和 STAT3 兩者轉錄因子的含量 (圖九)。結果顯示，PCNA 的亮度皆一致，表示細胞核蛋白質的含量一致。在 Nu-STAT3 部分，給予氫水後細胞中的表現量明顯降低，推測氫水是通過此條路徑抑制 IL-6 的表現量。而 Nu-NF- $\kappa$ B p65 部分，則一樣四組實驗組之間沒有差異，表示氫水不會抑制這條路徑。**推測氫水是透過抑制 Nu-STAT3 轉錄因子的活化，來減緩 A549 細胞對於 LPS 刺激下的發炎反應。**



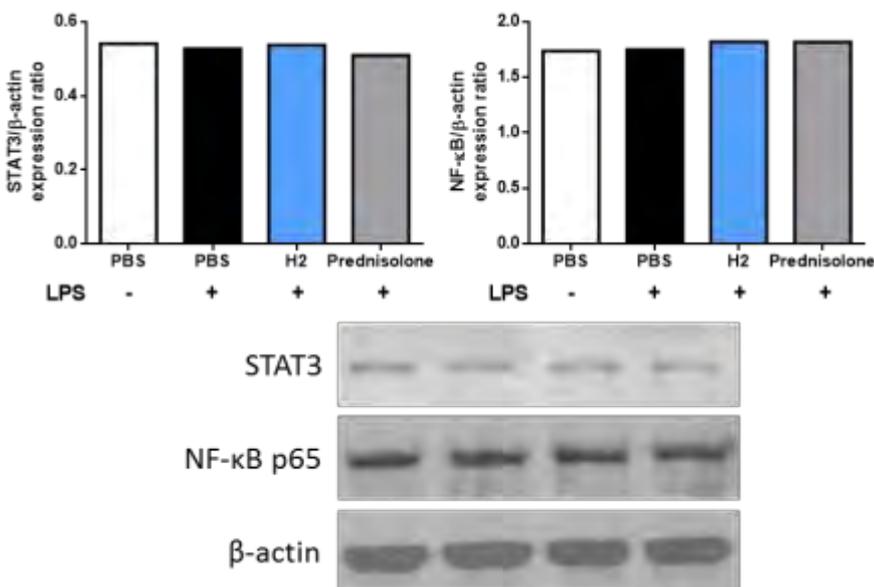
圖五、各處理組中 ERK 路徑相關蛋白質濃度的差異，顯示氫水無法抑制 ERK 路徑



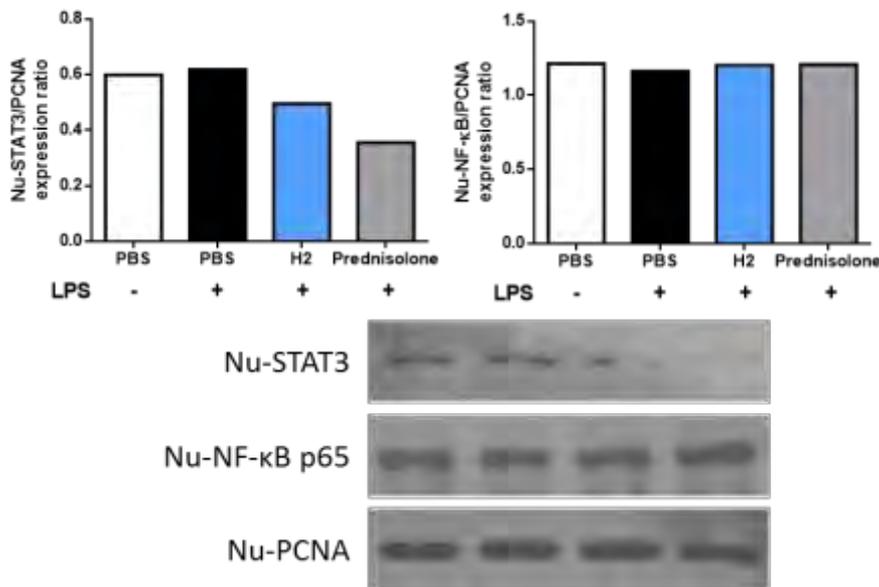
圖六、各處理組中 JNK 路徑相關蛋白質濃度的差異，顯示氫水無法抑制 JNK 路徑



圖七、各處理組 p-38 路徑相關蛋白質濃度的差異，顯示氫水無法抑制 p-38 路徑



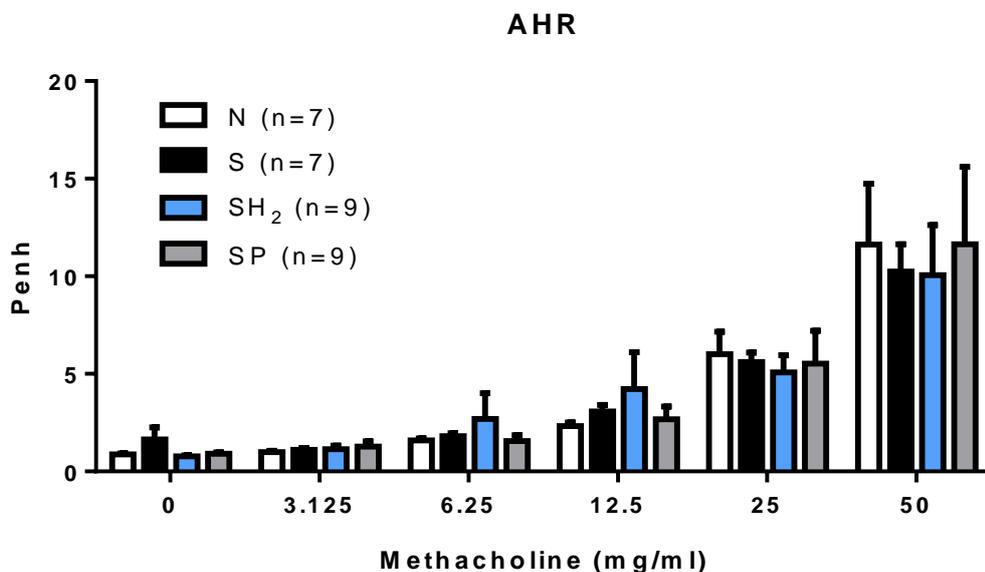
圖八、各處理組中細胞質內轉錄因子濃度差異，顯示氫水無法抑制細胞質內的轉錄因子 STAT3 及 NF-κ B p65 含量



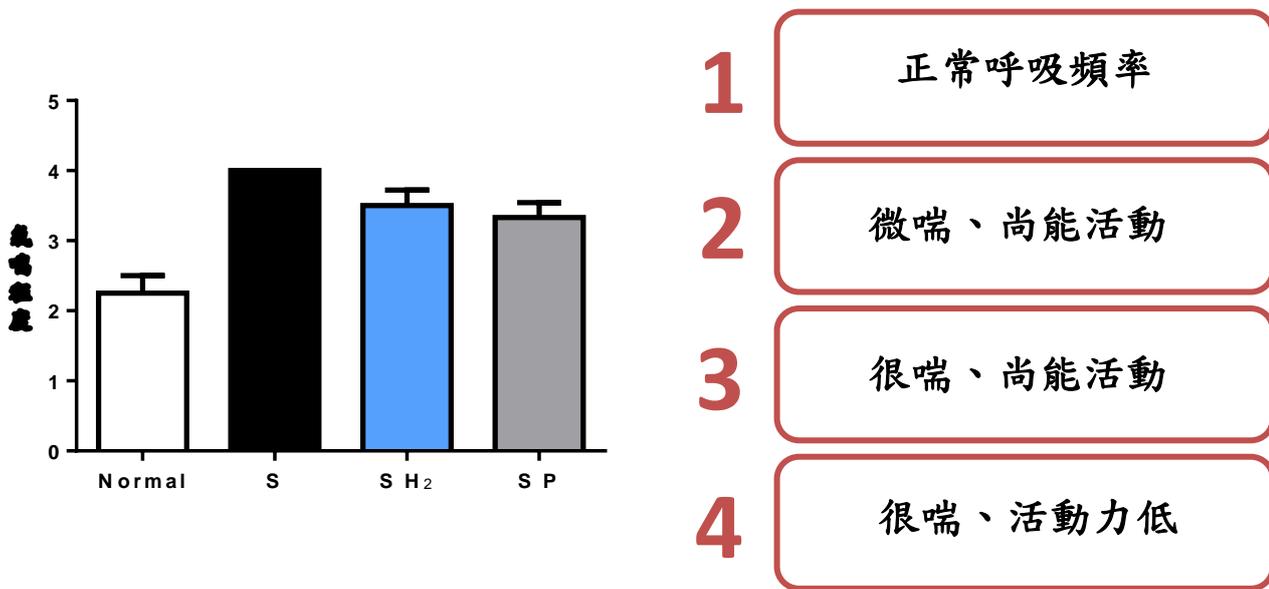
圖九、氫水可以抑制細胞核內的 STAT3 轉錄因子蛋白質含量

### 五、觀察氫水是否能有效減緩氣喘症狀

呼吸道阻力 (AHR) 是臨床上普遍用來檢測氣喘的指標性檢驗，使小鼠以漸進式吸入低到高劑量的 Methacholine 誘發氣管收縮，藉由呼吸頻率及氣流量變化與大氣比較相對壓差後，經電腦換算後得出 penh 值做判定，數值越高代表越喘 (圖十)。同時，我們也會依現實狀況觀察小鼠活動狀態而進行氣喘評估，做一個量化的分級 (圖十一)。結果顯示，以最高濃度 50mg/ml Methacholine 做比較，四組實驗組別之間沒有差異，氫水治療組也無下降趨勢，因此無法準確比較氫水是否有效果。但在現實目測觀察中氫水實驗組在 50mg/ml Methacholine 刺激下是略有效果的。



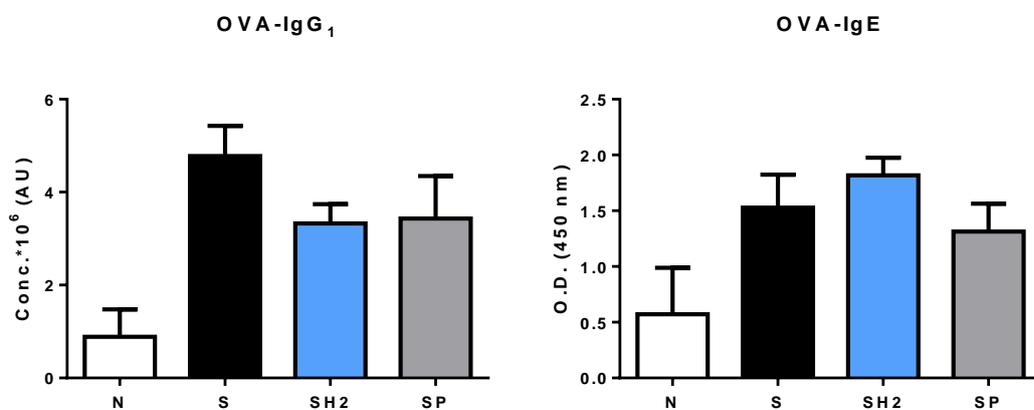
圖十、給予氫水治療的小鼠其 AHR 沒有顯著的減緩效果



圖十一、給予氫水治療的小鼠有些微減緩氣喘的程度

#### 六、檢測氫水治療後的小鼠血液中抗原專一性抗體濃度是否有影響

免疫反應對於過敏原會產生抗原專一性的抗體，因此可以藉由 ELISA 的方式檢測血清中抗原專一性抗體 IgG1、IgE 來觀察氫水是否能有效降低抗體量的產生 (圖十二)。結果顯示，在 OVA-IgG1 圖表中，給予氫水治療的小鼠其 OVA-IgG1 分泌量有減少，顯示氫水可以**抑制**抗原專一性抗體的分泌；而在 OVA-IgE 圖表中發現，給予氫水治療的小鼠血清中 OVA-IgE 濃度略高於疾病組 (S)，但兩者沒有差異，顯示氫水針對 OVA-IgE 抗體並無明顯抑制效果。推測可能是因為要在給藥七天的時間之內慢性發炎的疾病抑制住，似乎很困難，而氫水有可能



促進漿細胞活化而導致抗體濃度較其他處理組提高。

圖十二、各處理組抗原特異性抗體濃度差異，氫水治療的小鼠 OVA-IgG1 有些微降低的趨勢

## 陸、結論

### 一、細胞實驗：

- (一)由細胞毒理測試中可發現飽和氫水對於細胞是無害的，可促進細胞的存活率。
- (二)氫水能有效抑制由 LPS 刺激細胞發炎反應所分泌的 IL-6 及 IL-8，氫水也能有效降低 IL-6 的基因表現。
- (三)推測氫水能透過抑制細胞核內的 STAT3 進而抑制整體的 IL-6 發炎路徑。

### 二、動物實驗：

- (一)在呼吸道阻力的測驗中，氫水治療的小鼠並無減緩氣喘效果，但實際目測觀察中經氫水治療的小鼠對於高劑量的 Methacoline 是略有效果的。
- (二)檢測小鼠血清中抗原特異性抗體發現，經氫水治療後小鼠血清中的抗原特異性 IgG1 抗體是略有抑制效果的。

以上述細胞實驗及動物實驗整體來看，氫水可透過抑制細胞核內的 STAT3 進而降低 il6 基因的表現，使得發炎介質 IL-6 及 IL-8 含量大幅減少，導致氣喘病徵有些微的抑制效果，因此氫水是有潛力成為氣喘的治療藥物。

## 柒、參考資料與其他

- 太田成男(2007)。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。nature medicine。vol.13,p.688-694。
- 孫學軍(2014)。氫氣可治療支氣管哮喘。氫分子醫學保健疾病醫療論文彙集。章節 2-4、2-5、9-15。
- 郭昶宏(2013)。氣喘相關免疫細胞功能之調控因子與機轉:以抗氣喘藥物及環境賀爾蒙探討。高雄醫學大學。
- 陳琦華(2007)。氣喘病人使用類固醇結合長效乙二型交感神經作用劑單一吸入劑之氣喘控制指標及醫療資源利用評估。台北醫學大學藥學系。
- 曾獻豪(2017)。大蒜萃取物改善小鼠過敏性氣喘之功效及其作用機轉探討。大葉大學。
- 劉燦榮，(2017)。淺談氫分子預防疾病之原理與應用實證。2017年10月22日下載，網址取自 <http://www.tmu.edu.tw/v3/app/news.php?Sn=1355>
- 賴郁婷(2012)。利用小鼠動物模式探討由 HMGB1 在慢性氣喘的角色。中國醫藥大學-免疫學研究所。
- Katherine C Wood, Mark T Gladwin(2007)。The hydrogen highway to reperfusion therapy。nature medicine。vol.13,p.673-674。

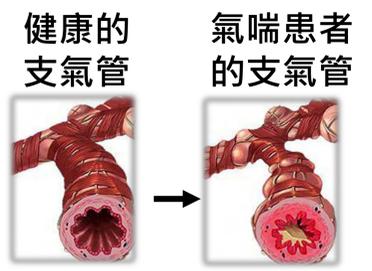
## 【評語】 052008

本研究探討氫水治療氣喘的可能性，實驗上以氫水為藥物，以人類肺癌細胞株 A549 細胞為實驗細胞，以酯多糖(LPS)刺激細胞模擬發炎反應，細胞實驗發現氫水對細胞不會產生毒性，也顯示氫水可抑制發炎反應所產生的發炎介質，進一步實驗亦觀察到氫水可能透過抑制細胞核內的 STAT3 路徑，降低發炎介質之基因表現，而動物實驗方面在小鼠模式之呼吸道阻力檢驗並無法比較氫水是否有治療效果，雖然陳述目測觀察略有效果，但未來還是應以科學證據上的收集證明及觀測評分的改進來設計實驗，整體而言氫水是否有潛力發展成氣喘的治療藥物，還需再進一步的研究來證明，本研究實驗執行及記錄嚴謹，探究精神值得嘉許。

# 一、研究背景

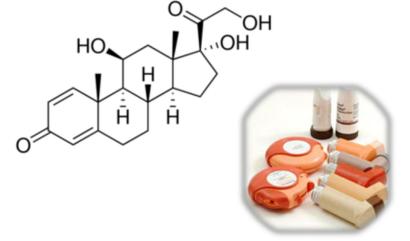
## 氣喘(Asthma)：

氣喘為一種**慢性呼吸道發炎疾病**，其主要的症狀為肺部慢性發炎、呼吸道過度反應、血清中大量的抗原專一性抗體增加...等現象，會造成呼吸道變窄、上層粘膜腫脹導致呼吸困難。近年來，因環境汙染嚴重，氣喘疾病在台灣的**罹病率逐年攀升**且有年輕化的趨勢，因此，如何調節氣喘或是過敏疾病的嚴重度，成為目前重要的議題。



## 波尼松龍(Prednisolone)：

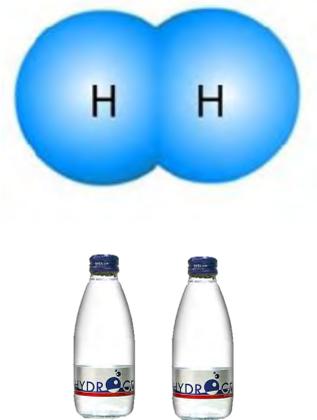
類固醇藥物，其藥用機制可**減緩**氣喘病人體中的**免疫系統反應**，減少呼吸道腫脹並減少黏液分泌和過敏反應等症狀。此藥物需要**長期使用**才能有效減少氣喘發作的次數以及嚴重程度，其**副作用**包含高血壓、高血糖、骨質酥鬆、白內障、兒童生長遲緩等，且停藥時會有**戒斷症狀**，故需循序減量，不可突然停藥。



## 氫水(Hydrogen water)：

氫氣無色無味無臭，擴散速度快，據文獻指出，在液體或人體組織中，能自由穿透細胞膜至細胞質，亦可直接進入粒線體，保護細胞內的胞器。氫分子具有**抗氧化、抗發炎**，能降低氧化壓力對細胞的損傷，並抑制細胞凋亡及抗敏感性。

氫分子醫學是近十幾年來開始發展的，氫氣用於氣喘的研究也已有初步成果，然而確切治療機制尚未釐清，因此本研究希望可提供氫分子醫學對於氣喘治療的方向。因氫氣具有危險性，所以本研究改使用**飽和氫水(2.14%)**作為本實驗之測試藥物。



# 二、研究動機

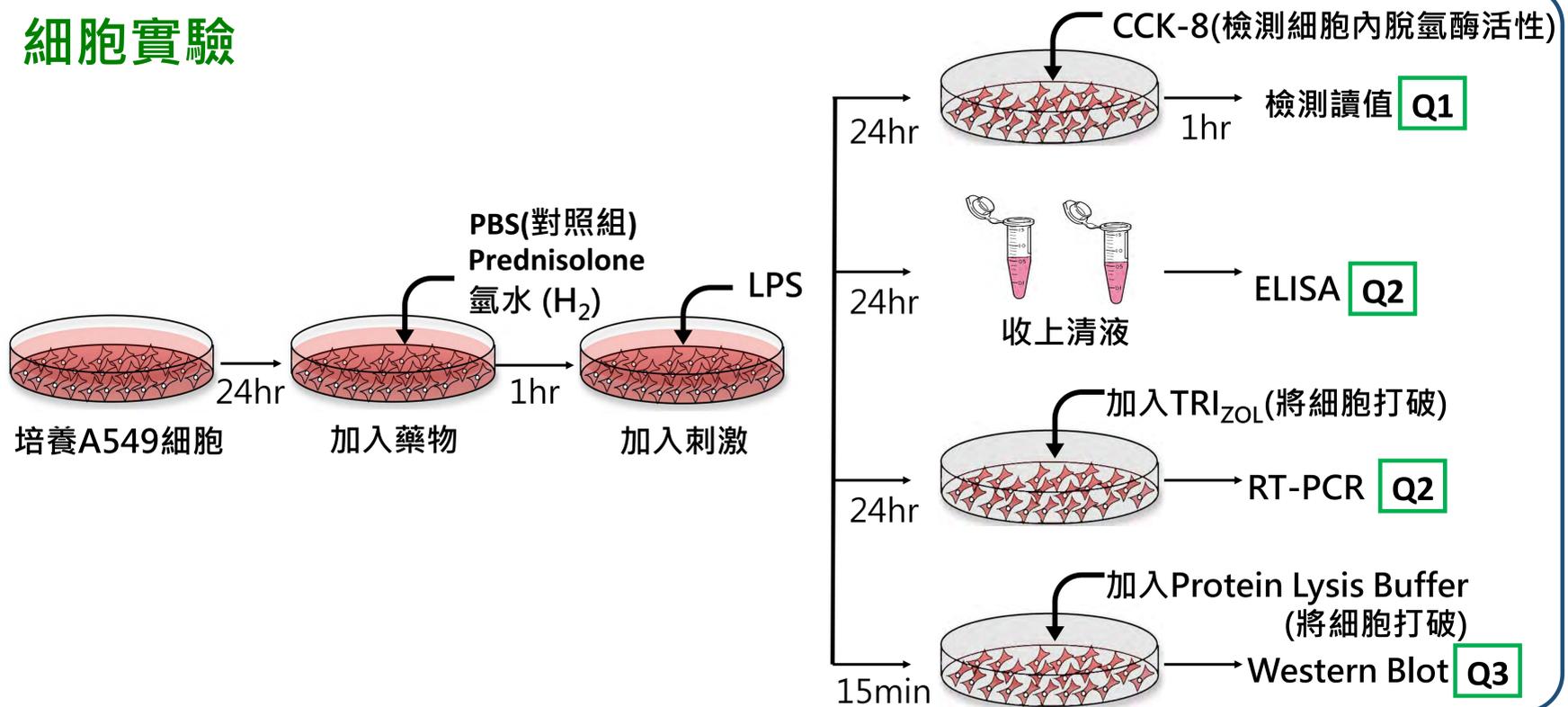
- 一、目前所使用的類固醇氣喘藥物(Prednisolone)，副作用甚大。
- 二、文獻指出氫水能抑制與氧化壓力相關的疾病。
- 三、氫水相較類固醇藥物，副作用小。

# 三、研究問題

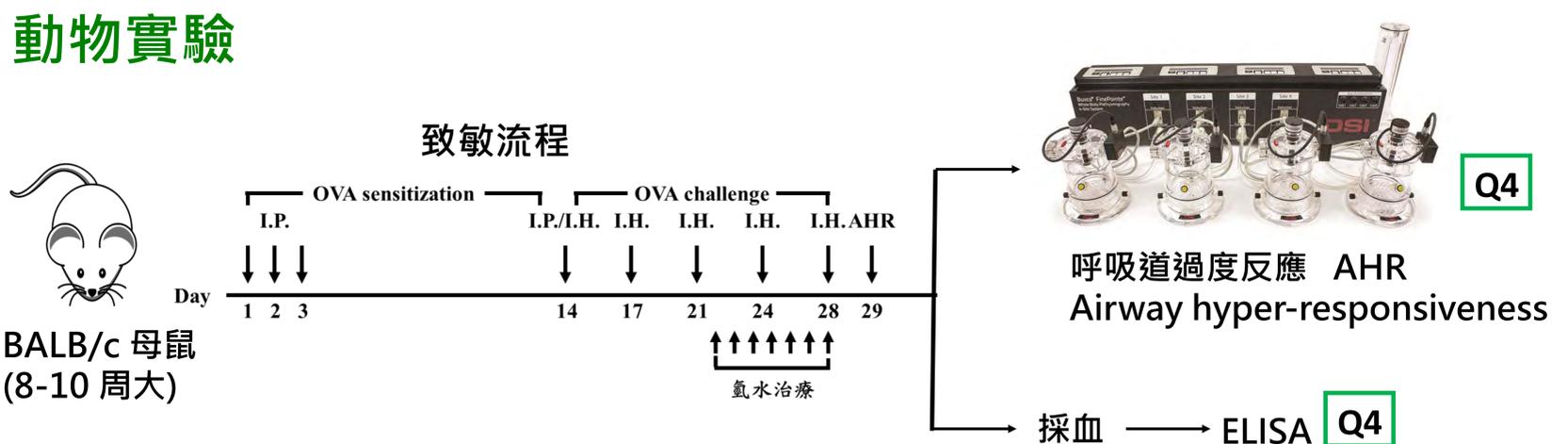
- 一、氫水是否對A549細胞有毒害？
- 二、氫水是否能降低由LPS刺激的細胞發炎反應？
- 三、氫水在細胞中降低發炎的機轉路徑？
- 四、給予致敏小鼠氫水後，是否能減緩氣喘症狀？

# 四、研究方法

## 細胞實驗

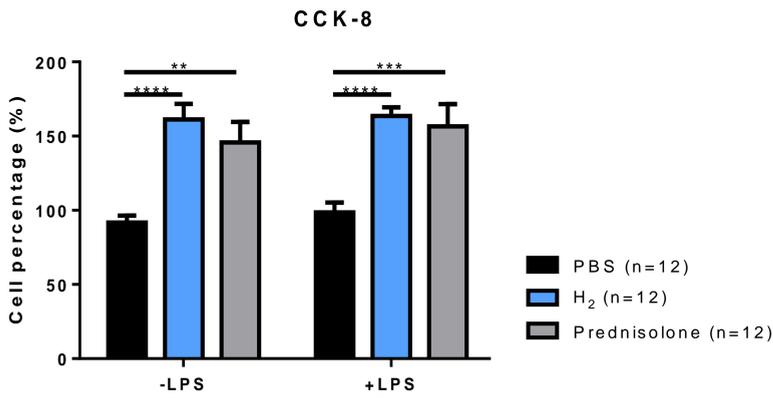


## 動物實驗



# 五、實驗結果

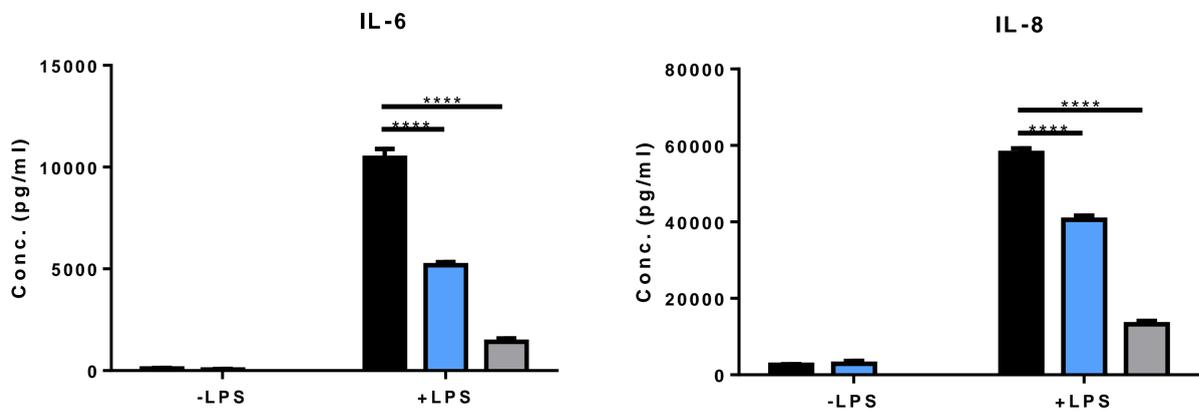
## Q1 氫水是否有毒害?



- (一) -LPS為不受刺激的組別，+LPS為受刺激的組別。
- (二) H<sub>2</sub>組與Prednisolone組分別與對照組PBS比較。
- (三) 數值愈高，細胞存活率愈高。
- (四) 顯著性以\*表示，\*\*表示p<0.01；\*\*\*表示p<0.005；\*\*\*\*表示p<0.001。(統計方法：2 way ANOVA)

**氫水不會使細胞死亡，且能活化細胞**

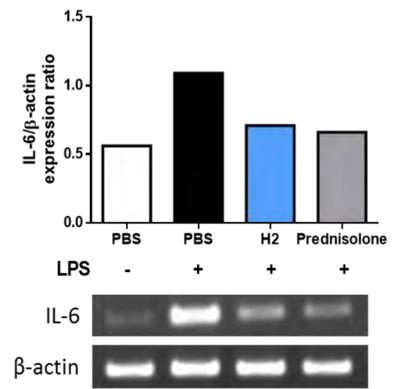
## Q2 氫水是否能降低發炎反應?



- (一) -LPS為不受刺激的組別，+LPS為受刺激的組別。
- (二) H<sub>2</sub>組與Prednisolone組分別與對照組PBS比較。
- (三) Conc. (pg/ml)的數值愈高，其發炎程度愈嚴重。
- (四) 統計結果顯著性以\*表示，\*\*表示p<0.01；\*\*\*表示p<0.005；\*\*\*\*表示p<0.001。(統計方法：2 way ANOVA)

**氫水能有效抑制發炎反應**

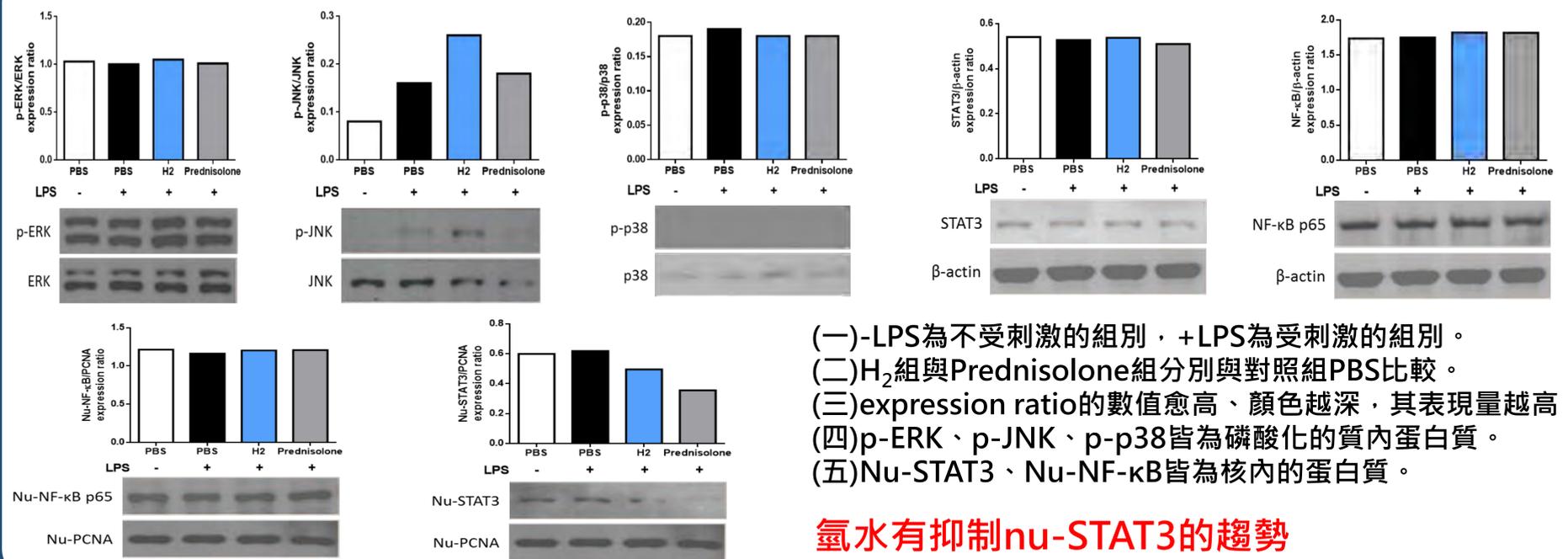
### IL-6基因片段



- (一) -LPS為不受刺激的組別，+LPS為受刺激的組別。上條是IL-6基因片段的表現量，下條是β-actin的基因表現量。
- (二) 亮度愈濃代表IL-6基因片段愈多。

**氫水能有效抑制發炎反應**

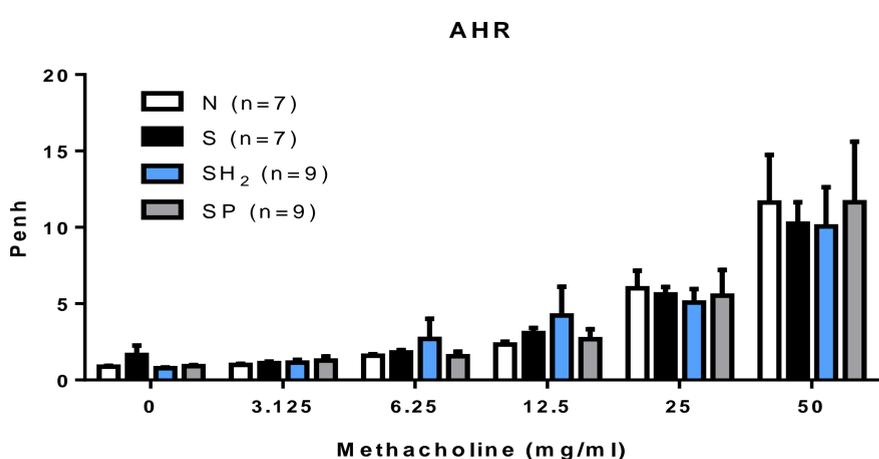
## Q3 氫水在細胞中的機轉路徑?



- (一) -LPS為不受刺激的組別，+LPS為受刺激的組別。
- (二) H<sub>2</sub>組與Prednisolone組分別與對照組PBS比較。
- (三) expression ratio的數值愈高、顏色越深，其表現量越高。
- (四) p-ERK、p-JNK、p-p38皆為磷酸化的質內蛋白質。
- (五) Nu-STAT3、Nu-NF-κB皆為核內的蛋白質。

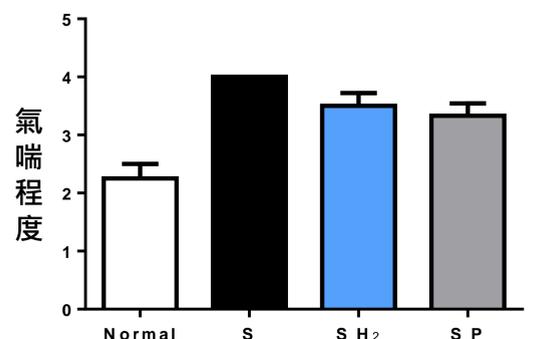
**氫水有抑制nu-STAT3的趨勢**

## Q4 給予致敏小鼠氫水後，是否能減緩氣喘症狀?



### 氣喘小鼠表徵觀察

- 1 正常呼吸頻率 (約每分鐘70次)
- 2 微喘、尚能活動
- 3 很喘、尚能活動
- 4 很喘、活動力低、流鼻水

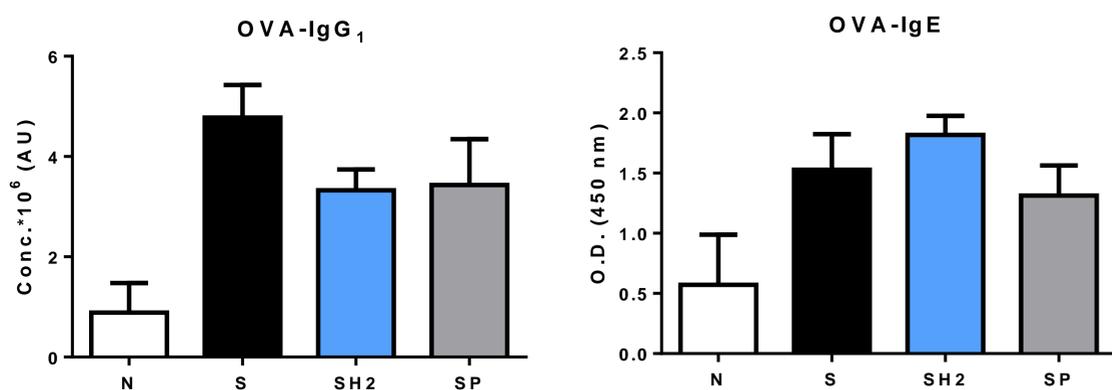


- (一) 加入Methacholine的濃度是隨著0至50mg/ml遞增。
- (二) SH<sub>2</sub>組、SP組分別和對照組S組做比較。
- (三) Penh值愈高，氣喘的程度愈嚴重。

- (一) 氣喘程度1至4的等級請參考左圖(二)SH<sub>2</sub>組、SP組分別和對照組S組做比較。
- (二) 為增加數據客觀性，由五個人員分別評測，進行觀察。

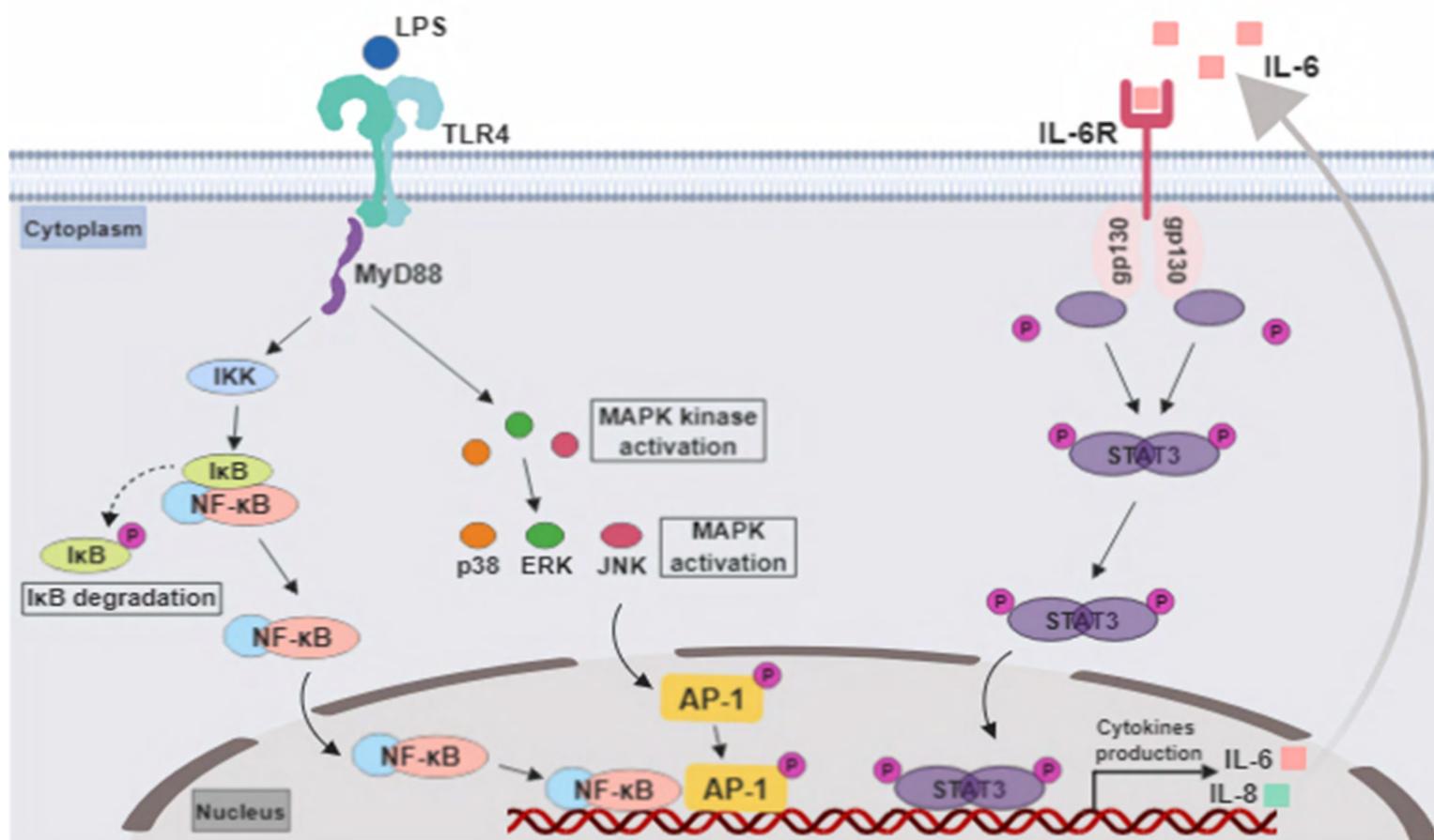
**目測觀察中，氫水能減緩氣喘症狀**

## Specific OVA-IgG<sub>1</sub>、IgE濃度



- (一) Conc.\*10<sup>6</sup>(AU) 與 O.D. 值愈高，抗體濃度愈高。
- (二) SH<sub>2</sub>組、SP組分別和對照組 S組做比較。

氫水可以抑制特定專一性抗體的分泌



LPS接上細胞膜上的受體，促使細胞質內特定蛋白質聚合，活化兩條細胞質中的發炎路徑，左邊為NFκB活化路徑，IκB磷酸化後會降解，促使NFκB活化進入細胞核中，右邊為MAPK活化路徑，促使p38、ERK、JNK的磷酸化，並使AP-1磷酸化進入細胞核中，在細胞核內NFκB與AP1為轉錄因子開啟發炎介質細胞因子等的基因表現，產生相關的發炎介質，例如IL-6、IL-8蛋白質分泌至細胞外。而細胞外的IL-6發炎介質則又會再次與IL-6受體(IL-6R)結合，進而開啟STAT3轉錄因子的表現，磷酸化的STAT3會再次進入細胞核中加強IL-6蛋白質的製造形成正回饋的現象，導致發炎反應加劇。

## 六、討論

- 1.由細胞毒理測試中可發現飽和氫水對於細胞是無害的，可促進細胞的存活率。
- 2.氫水能有效抑制由LPS刺激細胞發炎反應所分泌的IL-6及IL-8，氫水也能有效降低IL-6的基因表現。
- 3.推測氫水能透過抑制細胞核內的STAT3進而抑制整體的IL-6發炎路徑。
- 4.在呼吸道阻力的測驗中，氫水治療的小鼠並無減緩氣喘效果，但實際目測觀察中經氫水治療的小鼠對於高劑量的Methacoline是略有效果的。
- 5.檢測小鼠血清中抗原特異性抗體發現，經氫水治療後小鼠血清中的抗原特異性IgG1抗體是略有效果的。

## 八、結論

以上述細胞實驗及動物實驗整體來看，氫水可透過抑制細胞核內的STAT3進而降低IL-6基因的表現，使得發炎介質IL-6及IL-8含量大幅減少，導致氣喘病徵有些微的抑制效果，因此氫水是有潛力成為氣喘的治療藥物。

## 七、應用

氣喘病是常見的慢性呼吸道發炎疾病，平時造成患者不便，急性發作時更有可能造成死亡。西醫治療時常用之藥物有氣管擴張劑、抗組織胺藥及減敏療法，除了有副作用之外，也無法根治疾病。且近年來以學童與青少年罹病越為嚴重，影響層面甚廣，如果氫氣能夠治療氣喘的話，不僅可以取代或是和類固醇一併使用，以減輕現行藥物所帶來的副作用，也能對未來氣喘醫療提供一個全新的方向。

## 九、參考資料

- Katherine C Wood, Mark T Gladwin(2007) The hydrogen highway to reperfusion therapy. nature medicine. vol.13  
劉燦榮，(2017)。淺談氫分子預防疾病之原理與應用實證。673-674。  
孫學軍(2014)。氫氣可治療支氣管哮喘。氫分子醫學保健疾病醫療論文彙集。章節 2-4、2-5、9-15。  
太田成男(2007)。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。nature medicine. vol.13,p.688-694。