

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* ***** ***** *
* 計畫 : 富氫水對抗游離脂肪酸所誘發肝臟胰島素阻抗之保護 *
* 名稱 : 作用 *
* ***** ***** *

執行計畫學生： 蔡宇柔
學生計畫編號： MOST 104-2815-C-040-019-B
研究期間： 104年07月01日至105年02月28日止，計8個月
指導教授： 林志立

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學研究所

中華民國 105年03月17日

富氫水對抗游離脂肪酸所誘發肝臟胰島素阻抗之保護作用

(一)前言

現代人的飲食生活愈來愈好，而伴隨著的卻是許多代謝性疾病，例如糖尿病、肥胖症等。攝取過多的糖分或是脂質，都會使這些額外的養分堆積在身體當中，並且造成疾病。以非酒精性脂肪肝病為例，就是有過多的三酸甘油酯累積在肝臟組織當中，造成肝臟細胞的空泡化、纖維化。除此之外，肝臟組織也出現胰島素阻抗的現象，無法有效的利用血糖，造成患者高血脂、高血糖的狀態。若是沒有及時治療，將會造成肝炎、肝硬化，最後甚至導致患者死亡。近年來的研究指出過多的脂肪累積所產生的活性氧類可能為造成非酒精性脂肪肝的關鍵角色，因此若是能設法降低活性氧的產生，可能可以減緩非酒精性脂肪肝的病程。最近有愈來愈多研究在於富氫水在各個疾病的治療效果。富氫水中含有大量的氫分子，具有強力的抗氧化能力，可以清除過多的氧化物質，來降低細胞所受到的氧化傷害。而由於活性氧類在非酒精性脂肪肝扮演關鍵角色，因此我們將利用具有抗氧化力的富氫水來達到對抗非酒精性脂肪肝的功效。在本實驗當中，我們使用高濃度的游離脂肪酸處理肝臟細胞，導致脂肪大量累積在細胞中形成類似非酒精性脂肪肝的模型，再利用富氫水來處理細胞。從實驗結果來看，在經過高濃度游離脂肪酸處理過後，可以使肝臟細胞累積過多的三酸甘油酯並且影響胰島素訊息傳遞，但在富氫水的處理之下，能減緩三酸甘油酯的累積並且回復胰島素訊息傳遞。而在減緩氧化壓力方面，可以看到在游離脂肪酸處理之下，會造成SOD1的減少以及ROS的產生，但在富氫水處理之下，能回復SOD1的表現和減緩ROS的產生。從這些實驗結果來看，富氫水有可能可以成為減緩非酒精性脂肪肝的治療方法之一，但仍須更多的實驗結果來驗證其效果。

(二)研究目的

世界上肥胖的流行率逐漸增加而快速增長，非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)的患者也愈來愈多，大概佔了全球三分之一人口。NAFLD是一種的慢性肝疾病，在病理上其是指是脂質成分超過肝臟重量的百分之五以上，同時會發現三酸甘油酯大量累積在肝臟細胞當中，並經常伴隨肝臟胰島素阻抗(Hepatic insulin resistance)的現象。此症若沒有經過適合的治療，有可能會持續發展成肝炎、肝纖維化、肝硬化，甚至最終會導致肝癌的產生。而造成這些病變的原因，可能是因為肝臟細胞中不正常的脂肪累積，會造成肝細胞當中過多的活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)產生，進而造成肝組織的胰島素阻抗，但其中的機制尚不清楚。因此若能對其中的致病機制以及治療方式有更好的研究，可以使病人降低非酒精性脂肪肝的發生率以及避免其持續惡化。而已知富氫水(Hydrogen-rich water)具有很好的抗氧化效果，富氫水裡面富含

著大量的分子氫(Molecular hydrogen)，由於氫分子幾乎不具毒性，並可以輕易通過細胞膜深入細組織中，因此具有非常好的生體利用率(bioavailability)。在之前的研究中發現，富氫水對抗 ROS 的能力很強，因此我們推測具有強力抗氧化功能的富氫水可以清除過多脂質累積所造成的活性氧類的產生。根據目前我們的初步結果發現，用特定比率的游離脂肪酸(free fatty acids)處理肝臟細胞後，利用 Oil Red O staining 可以觀察到有明顯的油滴累積在肝臟細胞當中，但在富氫水的處理之下，則可以發現肝臟細胞中的油滴有明顯的減少，雖然對其中的機制沒有很清楚，但我們推測是因為富氫水的抗氧化能力，透過減少清除細胞當中過多的活性氧物質，因而導致在細胞中的三酸甘油酯下降並可能減緩胰島素阻抗。照目前的實驗結果來看，我們認為利用富氫水用於減緩非酒精性脂肪肝深具潛力，但為了證實此觀點，接下來將利用 Western Blotting 去看是否富氫水是否對胰島素阻抗的相關蛋白有影響，以及做 DCFH-DA 染色實驗觀察富氫水對肝臟細胞中過多的 ROS 是否有清除能力，並評估富氫水是否能減緩 ROS 對粒線體造成損傷的效果。若富氫水真的有效果能減緩非酒精性脂肪肝中的胰島素阻抗，或許同樣能對其他疾病例如二型糖尿病、代謝症候群這些同樣有胰島素阻抗病徵的疾病有同樣的效果，將可以減少許多由活性氧物質所導致的細胞傷害。

本計畫研究目標：

利用具有強力抗氧化力的富氫水處理由游離脂肪酸引起油滴累積的肝臟細胞，觀察是否能透過清除活性氧物質的方式，抑制脂肪累積，並減緩氧化壓力所造成的胰島素阻抗。

(三)文獻討論

第一節、 非酒精性脂肪肝(NAFLD)

近年來，人們的飲食生活愈過愈好，而肥胖率的發生也愈來愈高，可能會引起各種代謝症候群，目前最常見的是非酒精性脂肪肝，其是近來最主要的慢性肝臟疾病，其年齡範圍可從小孩到大人可能都會有這種疾病，甚至有些人並不知道他有脂肪肝，因此疾病也可算是現代的文明病之一[1]。所涵蓋的肝臟疾病很廣，從單純的脂肪肝到非酒精性脂肪肝炎，再來到嚴重的肝纖維化以及肝硬化，甚至最後是肝癌的產生，最終而導致死亡[2, 3]。不僅如此，它也導致許多心血管疾病。非酒精性脂肪肝主要的特色為三酸甘油酯不正常地累積在肝臟細胞當中，並且通常伴隨著胰島素阻抗、第二型糖尿病以及血脂過多、高血壓，甚至會導致心血管疾病。最主要的致病原因主要被認為是飲食習慣，在日常飲食當中若攝取過多的葡萄糖以及脂肪，導致過多的脂肪酸游離在循環系統當中，而脂肪酸會被肝臟細胞吸收，在細胞內合成三酸甘油酯，過多的三酸甘油酯造成肝臟細胞不正常的脂肪累積[4]。在臨床上，對於 NAFLD 的定義是累積在肝臟中的脂肪大於肝臟

重量的百分之五時，就稱為脂肪肝。NAFLD 在診斷上有相當的困難，因為 NAFLD 的患者通常沒有明顯的症狀，並且例行的檢查方式還未被明確地建立，但有可能會有倦怠、嗜睡、食慾不振或右上腹部不適等現象，這些症狀皆為非特異性，對診斷的幫助不大，絕大部分是因為健康檢查中而被意外發現。而醫學上的檢查，主要是血液中的血清轉胺酶(ALT、AST 增加、丙穀氨轉(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)增加，這些都是有助於檢測到 NAFLD 的指標，或是做病理的切片檢查、超音波掃描檢查、電腦斷層掃描，如能及早發現有脂肪肝的現象，就能及時治療，預防肝硬化及肝癌的發生[5]。

第二節、 NAFLD 的致病機轉

非酒精脂肪肝是慢性肝病中最常出現的一種疾病，若沒有及時治療，他將會惡化成非酒精性肝炎，最後甚至可能導致死亡。其中致病的原因可能有很多種，最主要被認為的原因是飲食習慣，性別跟年齡也是其中之一，但有些沒有肥胖的人，仍有可能會患有非酒精性脂肪肝，因此也可能跟基因的調控或是跟腸胃的微生物有關，但這些原因都導致同樣的結果—就是有過多的三酸甘油酯累積在肝臟組織中，並且經常伴隨胰島素阻抗或是二型糖尿病等症狀[4, 6]。而 NAFLD 的致病機轉尚未很明確，目前有文獻已二次打擊假說(Two-hit hypothesis) “來解釋，第一次打擊為脂質儲存在肝臟細胞，伴隨著第二次打擊為過多活性氧類的作用，造成肝臟細胞膜進行過氧化作用，並且促發炎因子的增加及氧自由基的釋放，導致肝臟的發炎以及纖維化。而也有其他研究發現，飲食過量而造成過多脂肪酸以及它的代謝物，造成胰島素阻抗，可能才為導致 NAFLD 的原因[2]。由於攝食過量，導致身體需要不停的分泌胰島素來將葡萄糖儲存進細胞，連帶也會合成三酸甘油酯，造成更多的三酸甘油酯累積，而細胞愈對原本濃度的胰島素不敏感，因此需要身體分泌更多的胰島素才能反應，而這樣的情況則會造成患者在數小時後血糖急遽下降。最後在胰島 β 細胞無力分泌更多胰島素時，胰島素阻抗可發展成完全的二型糖尿病，使病患有三高：高血糖，高血壓，高血脂。

第三節、 活性氧類與自由基

自由基是含有未成對電子的原子、原子團或是分子，而活性氧為是指生物體內與氧代謝有關的含氧自由基以及和易形成自由基的過氧化物。正常生理情況下，自由基與活性氧大多源自於電子傳遞鍊等，為生物有氧代謝的副產物，維持正常生命所必需的物質。大部分的自由基是對細胞有利的，有些自由基為細胞內重要的訊息傳遞分子，少部分自由基才具有較強的毒害活性對細胞造成傷害。正常情況下，自由基在細胞內不斷地被製造出，同時也不斷地被清除，使自由基的濃度維持在一個水平上，過高的活性氧類會對細胞和基因結構造成傷害，破壞不飽和脂肪酸，引起脂質過氧化作用、造成人體的 aging 現象等以各種手段來最人體進

行氧化傷害 [7]。發生缺血或是炎症時，體內會產生大量的活性氧，在這些活性氧當中，一氧化氮和過氧化氫主要是具有訊息傳遞的功能，毒性作用較弱，而羥自由基以及過氧化亞硝陰離子具有較強的毒性，對細胞產生的傷害較大。過去的治疗方法是在尋找還原性夠強的物質去對抗這些活性氧類，但可能會去破壞內源性自由基的中和系統，導致抗氧化治療的無效。因此內源性抗氧化以及選擇性抗氧化才是對氧化損傷最可靠的手段。

在正常情況下，人體會有中和系統來清除過多的自由基，維持在一個平衡狀態，但隨著人體老化或是有其他外源性物質誘導過多的自由基產生，超過細胞可以清除的量，可能就會直接或是間接影響細胞的健康，此種不平衡的狀態稱為氧化壓力。目前研究認為氧化壓力與許多慢性或是急性疾病有相關聯，可能會造成二型糖尿病、非酒精性脂肪肝、心血管疾病、阿茲海默症、神經性退化性疾病等 [7, 8]。

第四節、 過多的活性氧類造成肝臟組織的胰島素阻抗

在 NAFLD 的發病機轉中，活性氧族扮演著一個很重要的角色。隨著血液中的游離脂肪酸大量增加，肝臟細胞脂肪變性，累積一些三酸甘油酯在肝臟組織，造成肝臟細胞處在氧化壓力之下，大量產生 ROS，超過細胞能清除氧化物的能力並在一連續活性因子的作用下，對細胞造成傷害，不僅對蛋白質以及 DNA 產生損傷，甚至造成大量三酸甘油酯的累積以及對粒線體造成傷害。近年更有研究指出，過多的活性氧類可能是造成胰島素阻抗的兇手之一，而胰島素阻抗在非酒精性脂肪肝的患者當中，是一個很重要的病理特徵 [9]，肝臟組織的胰島素阻抗 (insulin resistance)，根據之前研究，可能是因為過多的氧化壓力所造成的，主要是因為在正常濃度的胰島素情況下，肝臟細胞對胰島素的敏感度下降，使肝臟細胞無法有效利用葡萄糖，需要更高濃度的胰島素才能引起肝臟組織反應，同時血液中也就會帶有大量的葡萄糖跟游離脂肪酸，為了進行補償，胰臟 β 細胞會分泌更大量的胰島素，使細胞能夠被激起反應進行葡萄糖的吸收，但在這樣的情況下，會導致餐後數小時後的血糖急速下降或是低血糖反應。由於胰臟 β 細胞無法再產更多的胰島素來維持正常血糖，造成 β 細胞損傷，所以嚴重的非酒精性脂肪肝通常也伴隨著二型糖尿病 [10]。

第五節、 NAFLD 目前衍生出的疾病以及治療方法

非酒精性脂肪肝涵蓋的肝臟疾病很廣，從單純的脂肪肝到非酒精性脂肪肝炎，再來到嚴重的肝纖維化以及肝硬化 [2]。非酒精性脂肪肝主要是在以無長期多量飲酒的不良習慣的情況下，肝臟有脂肪堆積的現象，是肝纖維以及肝硬化等肝臟疾病的過渡階段。但是脂肪肝對身體對損害不僅僅在肝臟而已，臨床上主要伴隨者胰島素阻抗、二型糖尿病、高血脂症、高血壓、冠狀動脈心臟病，而這些疾病

用反過來造成脂肪肝的惡化，形成一個惡性循環，促進肝癌以及心血管疾病的發生[11]。而目前治療 NAFLD 的方法主要是以飲食以及生活習慣上做改變，減少高油高糖高鹽的飲食和運動對於脂肪肝來說是很重要的因子。另外，由於胰島素阻抗是非酒精性脂肪肝的特徵之一，thiazolidinedione 和 metformin 這兩個胰島素增敏劑也是治療非酒精性脂肪肝的方法之一，以透過減緩胰島素阻抗的方式，來對非酒精性脂肪肝進行治療。其他像是還有降血脂藥物 fibrates、ezetimibe and statins，能降低血液中的脂肪，但這些藥物只能單純改善 NAFLD 其他的症狀，並沒有對治療 NAFLD 有很大的效果[12]。而且上述這些藥物都只有單一對抗病徵的效果，並且有很大的副作用，不僅無法完全治療 NAFLD，可能還為人體帶來額外的負擔。而近年愈來愈多和富氫水相關的研究，指出具抗氧化能力的富氫水可以清除體內過多的、導致疾病的活性氧類。除此之外，氫本身無毒無害、沒有副作用，即使攝取過多，也能輕易地排出體外。再者，氫分子是最小分子量的物質，具有良好的滲透性，能輕易穿透細胞質跟血腦屏障，這是很多藥物無法做到的效果。由於 NAFLD 也跟肝臟組織中過多的活性氧類有相關聯，因此我們推測具有抗氧化功能的富氫水能治療 NAFLD。在目前我們的研究發現，由游離脂肪酸處理的肝臟細胞，在富氫水的處理之下，脂質的累積變少了，故我們認為富氫水不僅能對抗活性氧類的產生，也可能可以減少脂質在細胞中的堆積，具有同時解決多種症狀的效果，能有效率地治療 NAFLD 的患者。

第六節、 富氫水的抗氧化功能

於 2007 年，日本學者發現氫氣具有抗氧化作用能選擇性的掃除具有強力氧化能力的·OH。氫是一種具有醫療潛力的醫療性氣體。許多科學文獻因此如雨後春筍般的開始加以探討將氫氣注入水中後的醫療保健作用。氫分子是最小分子量的物質，具備良好的活性和滲透性，可以快速的進入細胞、組織及腦內。富氫水可清除體內過多的活性氧，活性氧可導致各種疾病，由於它的強力氧化特性，會損害基因(DNA)及細胞中的胞器，導致細胞的死亡，從而產生各種疾病，例如代謝症候群等[13]。像是在 2014 的研究，將富氫水給四個月大的公鼠喝，直到老鼠 16 月個大時，比起控制組，實驗組可以看到較少的牙周組織的氧化損傷，顯示富氫水在這方面有靠老化的效果[14]；在另一篇同是 2014 的研究，將富含氫的生理鹽水用於治療在有液壓衝擊傷的大鼠中，可以觀察到 Malondialdehyde (marker for oxidative stress.) 的下降以及長壽基因 Sir2 的表達上升[15]。這些研究都可以看出富氫水能消除自由基達到抗氧化的端倪。而活性氧類在非酒精性脂肪肝病理機制中扮演著很重要的角色，不僅導致脂質累積在肝臟細胞當中，造成過多的活性氧類產生以及粒線體損傷，並且有胰島素阻抗發生的現象，更嚴重的話會導致非酒精性肝炎、肝硬化、肝纖維化、甚至是肝癌，死亡率極高[16, 17]。而在許多研究當中發現富氫水能消除活性氧類，由於富氫水具有強力的抗氧化效果，在目前的實驗當中，我們發現由游離脂肪酸處理的肝臟細胞，在富氫

水的處理之下，因此我們在這次的實驗當中，將去探討是否富氫水去能對由游離脂肪酸引起的肝臟細胞的油滴累積減少，並且是否能清除過多油滴所產生的 ROS 以及其造成的胰島素阻抗。

第六節、 富氫水目前的研究進度

至從在 2007 年日本學者發表關於氫氣功效的文章後，氫氣開始受到國際關注，愈來愈多學者開始研究氫氣，使用氫氣能有效治療不同疾病，每年關於氫氣生物學的文章數量更是一比一年增加。而氫氣主要能可治療的疾病範圍，主要是以涉及氧化應激以及抗氧化治療的疾病為主，例如缺血或是炎症等。而目前氫氣的攝取途徑主要有兩種：直接吸取氫氣，以及口服氫氣水；而製造富氫水又有需多不同的方法：一、化學反應法，二、加壓法，三、三級電解法，不同方法所製造的氫水其含量跟離子含量的多寡都會不同。並且，服用富氫水具有很高的生物安全性，並不會為身體帶來其他的副作用，雖然目前氫氣的作用機制尚在研究階段，但已有許多研究學者非常期待氫氣未來在臨床治療的前景。現階段已將氫氣研究在許多疾病上，例如帕金森症、器官缺血[18-20]、炎症相關疾病等，雖然臨床治療疾病的案例較少見，並且氫氣治療疾病的作用機制尚未很明確，但以目前的研究結果來看，氫氣在治療氧化應激的疾病具有相當大的前景，隨著不段深入的研究，相信富氫水能有效治療疾病並提升我們的健康。

(四)研究方法

首先先以游離脂肪酸 OAPA 來處理 HepG2 細胞，模擬脂肪肝的模型，再加入以富氫水泡的培養液來共同培養 24 小時。以下四點為此次計畫想要研究探討的方向：

1. 富氫水是否能減緩三酸甘油酯的累積:Oil Red O staining

利用 Oil Red O staining 染利用 脂肪酸處理的 HepG2 cell 中的油滴，對比控制組以及使用富氫水治療的以脂肪酸處理的 HepG2 cell，觀察是否有減緩油滴的產生。

2. 富氫水是否能減緩 ROS 的產生:DCFH-DA 活性氧檢測試劑

累積在肝臟細胞中過多的三酸甘油酯，導致細胞內過多的活性氧類產生，因此利用 DCFH-DA 試劑來檢測利用富氫水處理前後，細胞中的 ROS 是否有減少的趨勢。

3. 富氫水是否能回復胰島素訊息傳遞

非酒精性脂肪肝的患者，通常會伴隨著胰島素阻抗的症狀，使胰島素訊息傳遞受到阻抗，因此我們利用游離脂肪酸處理 HepG2 細胞，再以富氫水處理，然後利用西方點墨法看 AKT/GSK3 β 這條路徑再單游離脂肪酸處理會受到影響，並在加入富氫水處理後會回復這條路徑的活性。

4. 富氫水是否可能透過 AMPK 路徑減緩脂質累積

加入富氫水處理後，若是能減緩油滴累積，可能是透過很多不同的路徑的造成的。首先我們先看 AMPK/SIRT1 這條路徑是否為其中被影響的路徑之一。而 AMPK 為脂肪酸合成的路徑之一，因此我們預期是透過活化 AMPK 而導致脂肪酸合成下降來減少脂質的產生的。經游離脂肪酸以及富氫水同時處理後，再以西方點墨法來看 AMPK 的蛋白表現量是否有差異。

(五)結果與討論(結論與建議)

第一節、 氫水減緩三酸甘油酯累積的能力

非酒精脂肪肝其中一個特徵是有過多的三酸甘油酯累積在肝臟組織，因此先探討富氫水是否能在高濃度游離脂肪酸的處理之下，減緩三酸甘油酯的累積，首先分成 6 組(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3)HW 組:HW 處理 (4) OAPA+HW 處理:OAPA(1Mm)+HWT 處理處理 24 小時之後，以 oil red o staining 對細胞進行分析；結果如 (圖一)、(圖二)，顯示以 OAPA 處理 HepG2 肝癌細胞之後，細胞三酸甘油酯的累積明顯比 Control 組還要高很多，

而 Control 組和 HW 組並沒有太大差異。而同時處理 OAPA+HW 的組別比起 OAPA 組，其三酸甘油酯有顯著下降。從上述結果來看，OAPA 處理的確能增加 HepG2 三酸甘油酯的累積，而富氫水可以使其累積減少。因此我們接下來看是否富氫水也能否影響其他非酒精性脂肪肝的特徵。

第二節、 氫水影響胰島素訊息傳遞的能力

胰島素阻抗也是非酒精性脂肪肝的病理特徵之一，因此我們利用 OAPA 去影響 HepG2 肝癌細胞的胰島素訊息路徑，並且利用氫水處理看是否能減緩 OAPA 抑制的效果。首先分成 4 組(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3) HW 組:HW 處理 (4)OAPA+HW 處理:OAPA(1Mm)+HW 處理。處理 24 小時之後，以 Western blotting 對 insulin-signaling pathway:AKT 以及 GSK3 β 的表現量來評估；結果如 (圖三) 所示，以 OAPA 處理 HepG2 肝癌細胞之後，相較於 Control 組，OAPA 組別的活化態的 AKT 以及 GSK3 β 的表現量都有下降。而同時處理 OAPA 以及 HWT 的組別相較於 OAPA 組，其活化態的 AKT 以及 GSK3 β 都有上升的現象。從上述結果來看，顯示 OAPA 能抑制 insulin-signaling pathway 中的 AKT 以及 GSK3 β 表現，但在氫水的處理之下，可以看到活化的 AKT 以及 GSK3 β 的表現量有上升的趨勢。

第三節、 氫水透過活化 SIRT1/AMPK 路徑降低脂肪酸合成的影響

接下來為了探討氫水可能是透過哪個路徑去減緩三酸甘油酯累積，我們首先測試氫水是否是透過抑制 fatty acid synthesis pathway 去抑制脂肪堆積。首先分成 4 組(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3) HW 組:HW 處理 (4)OAPA+HW 處理:OAPA(1Mm)+HW 處理。處理 24 小時之後，以 Western blotting 對 fatty acid synthesis pathway :SIRT1 以及 AMPK 的表現量來評估；結果如(圖四)所示，顯示以 OAPA 處理 HepG2 肝癌細胞後，比起 Control 組，OAPA 組別的 SIRT1 以及活化態的 AMPK 的表現量都有下降的趨勢。而同時處理 OAPA 和 HWT 的情況下，比起 OAPA 組別，其 SIRT1 以及活化態的 AMPK 的表現量都有增加的情況。從上述結果所示，OAPA 可以抑制 SIRT1 以及活化態的 AMPK 的表現；而在氫水的處理之下，可以活化 SIRT1 和活化態 AMPK 的表現，來達到減緩三酸甘油酯累積的效果。

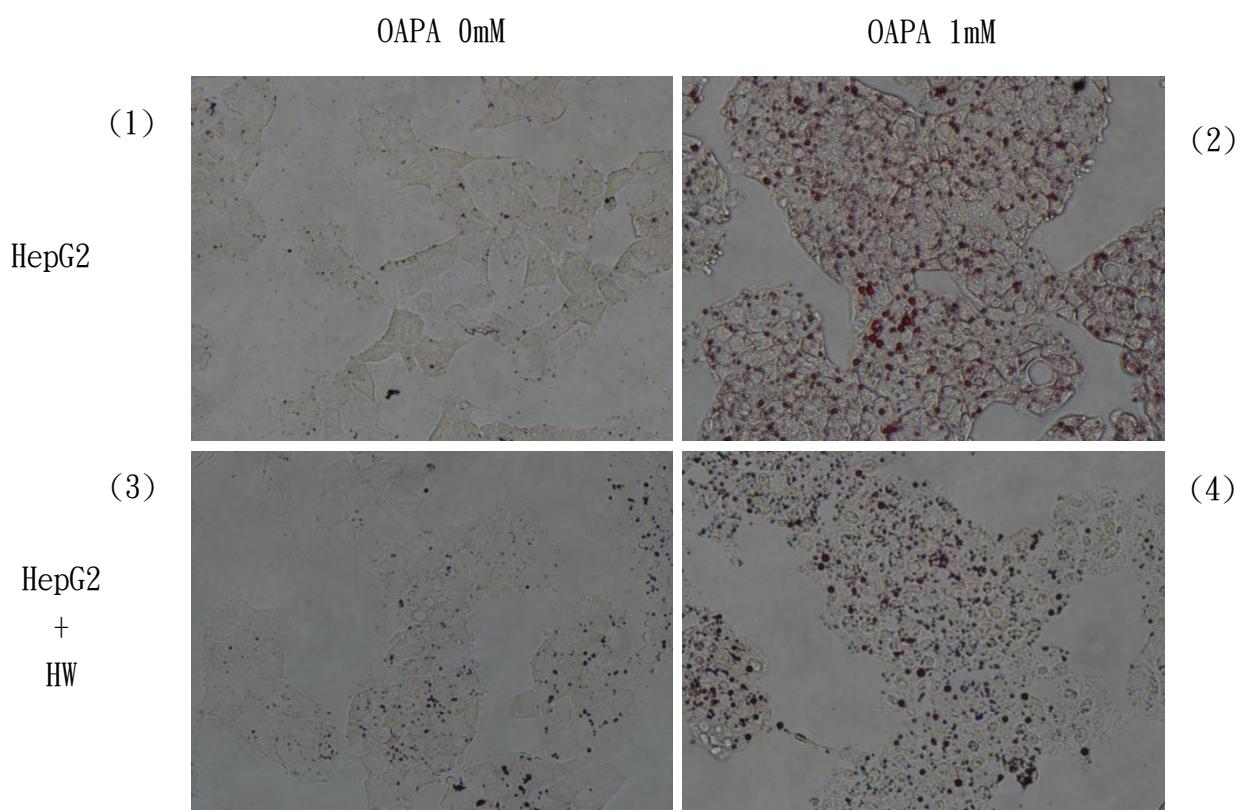
第四節、 氫水誘導細胞中 SOD1 的表現對抗過氧化物

為了探討富氫水是否因為誘導 SOD1 來減緩过氧化物的產生，首先分成 4 組 (1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3) HW 組:HW 處理 (4)OAPA+HW 處理:OAPA(1Mm)+HW 處理。處理 24 小時之後，以 Western blotting 對抗氧化蛋白 SOD1 的表現來來做評估。結果如(圖五)，相較於 Control 組，在 OAPA 處理的情況下，可以看到 SOD1 蛋白表現量有明顯的下降；但在同時

處理 OAPA+HW 的組別下，相較於 OAPA 組，SOD1 的蛋白表現量有上升的趨勢。從上述結果所示，OAPA 可能或造成細胞內 SOD1 蛋白的表現量下降，而在氫水的處理之下，SOD1 的表現有上升的趨勢。

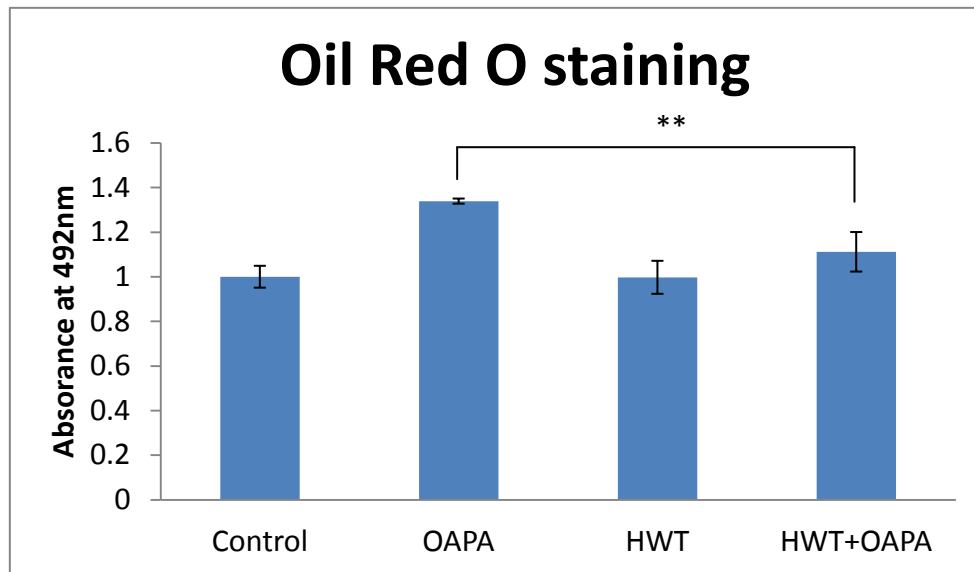
第五節、 氫水對抗 ROS 的能力

為了探討富氫水對抗 ROS 的能力，首先分成 4 組(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3) HW 組:處理 (4)OAPA+HW 處理:OAPA(1Mm)+HW 處理。處理 0.5 小時之後，以 DCFH-DA 染色並用螢光顯微鏡觀察，來探討 ROS 的變化量。結果如(圖)所示，相較於 Control 組，在 HepG2 用 OAPA 處理的情況下，會使細胞明顯產生 ROS 的現象；而在同時處理 OAPA 以及 HW 的組別之下，相較於 OAPA 組，可以看到其 ROS 的產生有明顯下降的情況。從上述結果所示，在 OAPA 的處理之下，的確能引起 ROS 的產生，但若是同是跟富氫水處理，可以看到其 ROS 有明顯的下降。



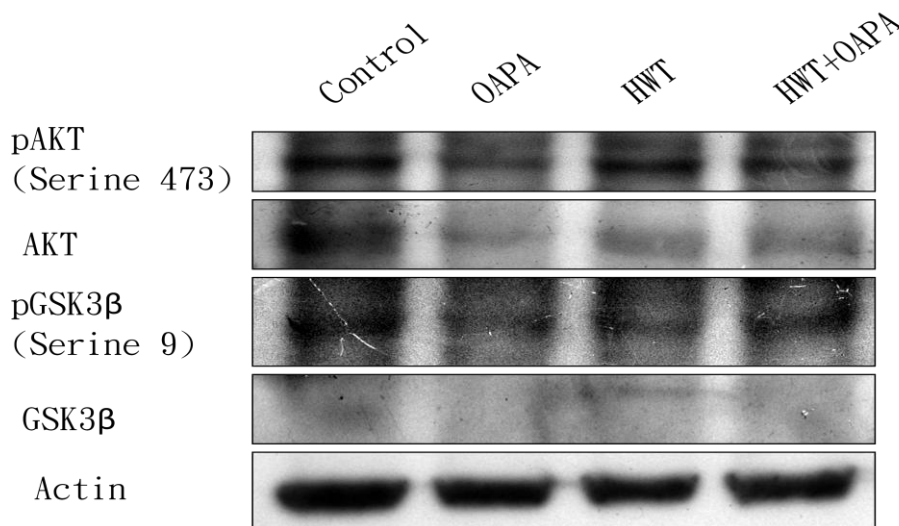
圖一、利用富氫水處理過後，三酸甘油酯有下降的趨勢。

利用 OAPA 以及氫水同時處理 HepG2 肝癌細胞，經 24 小時後，觀察三酸甘油酯累積的狀況。總共分為六組:(1)Control 組:無 OAPA 及 HW 處理 (2)OAPA 組:1 mM OAPA 處理 (3) HW 組:HW 處理 (4) HW+OAPA 組:HW+1mM OAPA 處理。實驗結果所示，在單獨 OAPA 處理之下，的確會造成 HepG2 三酸甘油酯的累積，但若同時處理台灣氫水，即可以減緩三酸甘油酯的累積。



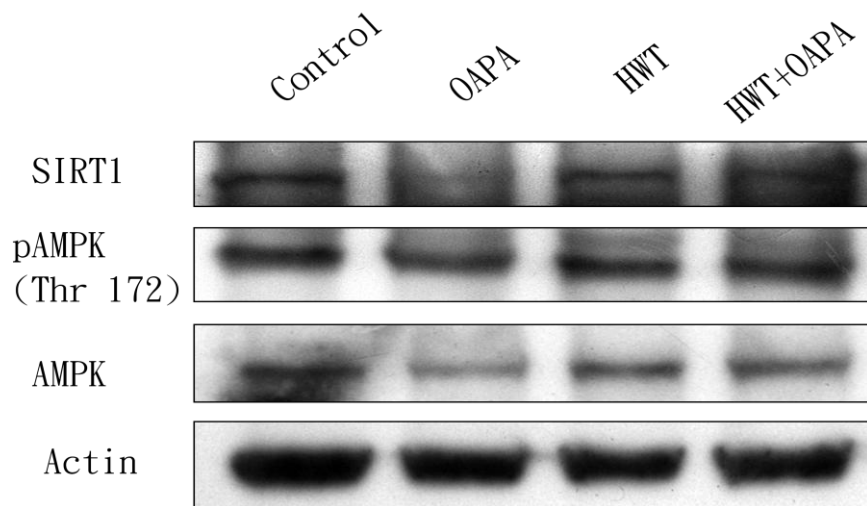
圖二、定量 Oil Red O 染劑:經由富氫水處理過後，三酸甘油酯有減緩累積的狀況。

利用 OAPA 以及氫水同時處理 HepG2 肝癌細胞，經 24 小時後，定量 Oil Red O 染劑去看三酸甘油酯累積的狀況。總共分為六組:(1)Control 組:無 OAPA 及 HW 處理 (2)OAPA 組:1 mM OAPA 處理 (3) HW 組:HW 處理 (4) HW+OAPA 組:HW+1mM OAPA 處理。實驗結果所示，在單獨 OAPA 處理之下，定量出來的結果與 Control 有達顯著差異；但若同時處理台灣氫水，則可以降低三酸甘油酯的累積，達到 $p < 0.01$ 的顯著差異。以*、**、***表示 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ ，表示統計上的顯著差異，並視之為有意義。



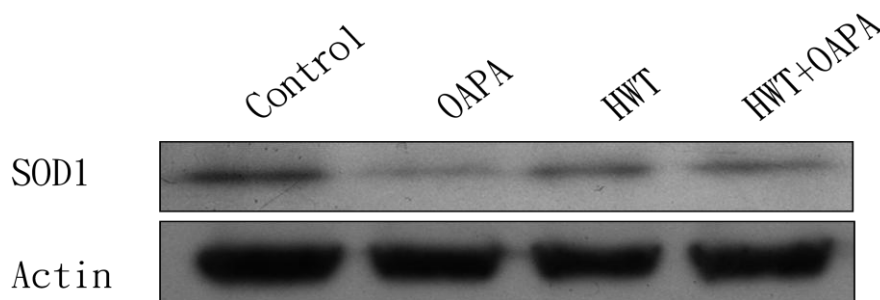
圖三、可看到在 OAPA 處理之下，pAKT 以及 pGSK3β 都有下降的情況，但在富氫水的處理之下，兩者都有回升的趨勢。

利用 OAPA 以及氫水同時處理 HepG2 肝癌細胞，經 24 小時後，以西方點墨法觀察胰島素訊息傳遞的表現狀況。總共分為四組:(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3) HW 組:HW 處理 (4)OAPA+HW 處理:OAPA(1Mm)+HW 處理。實驗結果所示，在單獨 OAPA 處理之下，的確會減少胰島素訊息分子 pAKT 以及 pGSK3β 的表現；但若同時處理台灣氫水，則可以看到其能回復 pAKT 以及 pGSK3β 的活性。



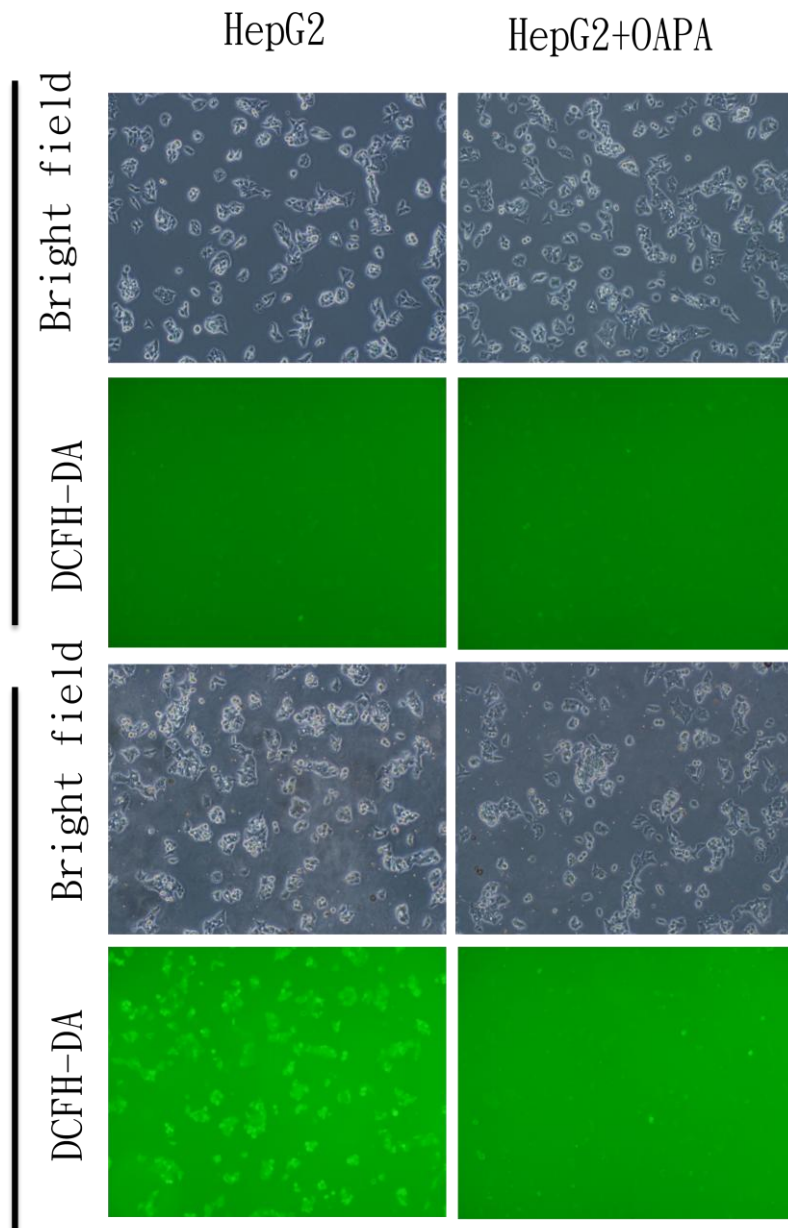
圖四、在 OAPA 處理之後，可以看到 SIRT1/pAMPK 有稍微下降的情況，而在富氫水處理過後，可以看到 SIRT1/pAMPK 有上升的趨勢。

利用 OAPA 以及氫水同時處理 HepG2 肝癌細胞，經 24 小時後，以西方點墨法觀察 SIRT1/AMPK 訊息傳遞的表現狀況。總共分為四組：(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3) HWT 組:HW 處理 (4)OAPA+HW 組:OAPA(1Mm)+HW 處理。實驗結果所示，在單獨 OAPA 處理之下，的確會減少 SIRT1 以及 pAMPK 的表現；但若同時處理台灣氫水，則可以看到其能回復 SIRT1 以及 pAMPK 的活性。



圖五、在 OAPA 處理的情況下，可以看到 SOD1 的表現有下降的情況；但在富氫水的處理之下，可看到兩者有增加表現的趨勢。

利用 OAPA 以及氫水同時處理 HepG2 肝癌細胞，經 24 小時後，以西方點墨法觀察抗氧化基因 SOD1 的表現狀況。總共分為四組：(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm)處理 (3) HW 組:HW 處理 (4)OAPA+HW 組:OAPA(1Mm)+HW 處理。實驗結果所示，在單獨 OAPA 處理之下，的確會減少 SOD1 的表現；但若同時處理台灣氫水，則可以看到其能回復 SOD1 的活性。



圖六、檢測富氫水減緩 ROS 產生的能力。

利用 OAPA 以及氫水同時處理 HepG2 肝癌細胞，經 24 小時後，以 DCFH-DA 觀察 ROS 的產生狀況。總共分為四組：(1) Control 組:無 OAPA 和 HW 處理 (2) OAPA 組:OAPA (1Mm) 處理 (3) HW 組:HW 處理 (4)OAPA+HW 組:OAPA(1Mm)+HW 處理。實驗結果所示，在單獨 OAPA 處理之下，的確會引起 ROS 的產生；但若同時處理台灣氫水 HWT，可以看到 ROS 有減少的現象。

根據這些實驗結果，富氫水是有可能可以對非酒精脂肪肝產生治療的效果，但由於沒有每次實驗都定量富氫水氫的含量，意即每次做實驗時以富氫水泡的培養液氫含量都不同，因此造成實驗數據很分歧，無法穩定實驗數據，也無法非常確定富氫水到底是否能減緩非酒精脂肪肝的形成，這是在這個實驗中所做的疏失。

建議：

由於氫分子很容易因為製造過程上的不同或是運輸上的問題，無法控制每包氫水包中的氫含量。並且氫無法長時間溶解在水中，因此需要每次實驗都需要調配新的培養基，因此可能出現每次調配時濃度有差異。並且在配置的過程當中，可能會因為搖晃、攪拌以及過濾造成氫分子的逸散，這些手法都可能使每次調配的培養基的氫濃度有差異，只能在配置過程當中，降低搖晃的劇烈程度，並且快速完成，減少氫分子的揮發。而由於我在實驗中並沒有特別去定量氫分子的濃度，使氫濃度落在一個範圍之內，因此配置的培養基的氫分子濃度差異可能會很大，這也是造成我實驗結果分歧的最主要原因。

討論：

在國際間有愈來愈多關於氫分子的臨床研究，其具備很好的抗氧化性，能中和羥自由基，使細胞免於活性氧類的攻擊。

目前關於活性氧類的疾病，可能會想說要用抗氧化劑來治療，但自由基也有分為好的自由基跟壞的自由基。好的自由基，例如：NO 或是 H_2O_2 是做為訊息傳遞分子，調控細胞之間的溝通；而壞的自由基則像是羥自由基，此類自由基會引發連鎖的氧化反應，對細胞造成傷害。而不管是好的自由基或是壞的，若是累積太多，超過平衡的量，都會對細胞造成影響。而若是我們直接使用抗氧化來對抗體內的自由基，可能會將好的自由基都一併消除掉，使細胞失去訊息傳遞的功能。目前對酒精性脂肪肝的治療方法，除了飲食調整以及運動之外，可能會服用一些增加胰島素敏感性的藥物，但這些藥物並無法完全消除非酒精性脂肪肝的症狀，可能會還會帶來一些副作用，而在 2007 年日本學者提出氫分子可以”選擇性”去消除對細胞具有毒害作用的羥自由基，而並不會消除好的自由基，因此我們假設使用氫水能對抗過多累積的自由基，進而減緩非酒精性脂肪肝的症狀。

氫水對於非酒精性脂肪肝的作用機制尚不清楚，目前國際所認為比較可能的三種機制為：(1) 氫氣選擇性中和強毒活性的羥基自由基和亞硝酸陰離子 (2) 氫氣可調節基因表達 (3) 氫氣具有信號調節作用，三種機制可能可以互相調節。因此若能更深入了解氫氣減緩非酒精性脂肪肝的分子機制為何，相信氫水會對治療非酒精性脂肪肝更有治療價值，希望未來能用在實驗臨床應用。

(五) 參考文獻

1. Povero, D. and A.E. Feldstein, *Novel Molecular Mechanisms in the Development of Non-Alcoholic Steatohepatitis*. *Diabetes Metab J*, 2016. **40**(1): p. 1-11.
2. Berlanga, A., et al., *Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease*. *Clin Exp Gastroenterol*, 2014. **7**: p. 221-39.
3. Koo, S.H., *Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis*. *Clin Mol Hepatol*, 2013. **19**(3): p. 210-5.
4. Ress, C. and S. Kaser, *Mechanisms of intrahepatic triglyceride accumulation*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(4): p. 1664-73.
5. Cohen, D.E. and E.A. Fisher, *Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease*. *Semin Liver Dis*, 2013. **33**(4): p. 380-8.
6. Popov, V.B. and J.K. Lim, *Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Role of Medical, Surgical, and Endoscopic Weight Loss*. *J Clin Transl Hepatol*, 2015. **3**(3): p. 230-8.
7. Vaahtera, L., et al., *Specificity in ROS signaling and transcript signatures*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(9): p. 1422-41.
8. Rodriguez-Vargas, J.M., et al., *ROS-induced DNA damage and PARP-1 are required for optimal induction of starvation-induced autophagy*. *Cell Res*, 2012. **22**(7): p. 1181-98.
9. Willcox, J.K., S.L. Ash, and G.L. Catignani, *Antioxidants and prevention of chronic disease*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004. **44**(4): p. 275-95.
10. Al-Goblan, A.S., M.A. Al-Alfi, and M.Z. Khan, *Mechanism linking diabetes mellitus and obesity*. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014. **7**: p. 587-91.
11. Sasaki, A., et al., *Bariatric surgery and non-alcoholic Fatty liver disease: current and potential future treatments*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014. **5**: p. 164.
12. Yoon, H.J. and B.S. Cha, *Pathogenesis and therapeutic approaches for non-alcoholic fatty liver disease*. *World J Hepatol*, 2014. **6**(11): p. 800-11.
13. <Recent progress toward hydrogen medicine-potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications..pdf>.
14. Tomofuji, T., et al., *Effects of hydrogen-rich water on aging periodontal tissues in rats*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 5534.
15. Hou, Z., et al., *Hydrogen-rich saline protects against oxidative damage and cognitive deficits after mild traumatic brain injury*. *Brain Res Bull*, 2012. **88**(6): p. 560-5.

16. Besse-Patin, A. and J.L. Estall, *An Intimate Relationship between ROS and Insulin Signalling: Implications for Antioxidant Treatment of Fatty Liver Disease*. *Int J Cell Biol*, 2014. **2014**: p. 519153.
17. Song, B.J., et al., *Increased nitroxidative stress promotes mitochondrial dysfunction in alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 781050.
18. Fujita, K., et al., *Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease*. *PLoS One*, 2009. **4**(9): p. e7247.
19. Zhang, C.B., et al., *Hydrogen gas inhalation protects against liver ischemia/reperfusion injury by activating the NF-kappaB signaling pathway*. *Exp Ther Med*, 2015. **9**(6): p. 2114-2120.
20. <hlv-07-231.pdf>.