

综述

氢分子供体种类及其在体内代谢动力学特点

刘伯言, 秦树存*

山东省高校动脉粥样硬化重点实验室, 泰山医学院动脉粥样硬化研究所, 泰山氢生物医学研究院, 泰安 271000

摘要: 氢分子(H₂)已被证明具有多种生物医学效应。作为一种小分子气体, 氢气可以无障碍扩散至靶点, 应用于医学研究和大众健康的各种氢气相关产品也应运而生。氢分子供应于动物和人体的途径多种多样, 主要包括吸氢气、喝氢水、注射氢生理盐水、服用氢气固态缓释剂和激发肠道菌群产生氢气的食物等。不同的给氢途径具有不同的体内代谢动力学特点, 进而影响作用效果。本文对氢分子供体种类及其在体内代谢动力学特点作一综述。

关键词: 氢分子; 代谢动力学; 给氢途径

中图分类号: R3

Different types of molecular hydrogen donors and their pharmacokinetics *in vivo*

LIU Bo-Yan, QIN Shu-Cun*

Key Laboratory of Atherosclerosis in Universities of Shandong Province, Institute of Atherosclerosis, Taishan Medical University, Taishan Institute for Hydrogen Biomedical Research, Taian 271000, China

Abstract: Molecular hydrogen (H₂) has been shown to have diverse biomedical effects. As a small molecular gas, hydrogen can be diffused to the target without hindrance. A variety of related hydrogen products used in medical research and public health have been developed. There are various methods of administration of H₂, mainly including inhaling hydrogen gas, drinking hydrogen water, injecting hydrogen-saline, orally taking solid-state H₂ sustained-release agents, and stimulating intestinal microbiomes to produce hydrogen. Pharmacokinetics of H₂ *in vivo* vary with methods of administration and thus influence its biomedical effects. This review summarizes the types of H₂ donors and their pharmacokinetics *in vivo*.

Key words: molecular hydrogen (H₂); pharmacokinetics; administration of H₂

自从2007年太田成男(Shigeo Ohta)研究组发表文章^[1], 报道呼吸微量的氢气即可显著减轻大鼠的脑缺血再灌注损伤, 并提出了氢气的选择性抗氧化理论之后, 全世界多家科研机构开始了氢生物医学效应的学术研究。迄今为止, 已有千余篇文章证明氢气在临床和动物试验中具有多种生物医学效应^[2,3]。这种广泛的生物医学效应得益于氢气易在体内扩散的物理特性。氢气是没有极性的气体分子, 在生物体内扩散不受细胞膜的限制, 并且氢气分子量小到

只有2, 如此小的体积很容易穿过细胞膜, 到达线粒体等易产生活性氧自由基的部位, 或者到达细胞核等储存遗传信息的部位, 从而保护这些细胞器免受氧化损伤。但是, 选择性抗氧化假说也面临着挑战, 例如有研究者通过体外实验证明氢气与亚硝酸阴离子和羟基自由基几乎不发生反应^[4]。氢气生物医学效应的机制成为该领域的研究焦点和难点, 不同角度和层面的研究方兴未艾。与此同时, 应用于医学研究和大众健康的各种氢气相关产品应运而

Received 2018-04-11 Accepted 2018-06-25

Research from the corresponding author's laboratory was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81770855) and the Taishan Scholars Foundation of Shandong Province, China (No. ts201511057).

*Corresponding author. Tel: +86-538-6222986; E-mail: scqin@tsmc.edu.cn

生。为了达到最佳应用效果,给氢途径及其在体内的代谢动力学研究日益受到广泛关注。氢分子供应于动物和人体的途径是多种多样的,主要包括吸氢气、喝氢气水、注射氢生理盐水、服用氢气固态缓释剂和激发肠道菌群产生氢气的食物等(图1)。本文对发挥生物医学效应的氢分子供体种类及其在体内的代谢动力学特点进行综述。

1 氢分子供体种类及体内代谢动力学特点

1.1 吸入氢气

吸入是医用气体最常规的使用方法,也是氢气用于治疗 and 预防疾病的常用方法。以气态的方式直接使用氢气,很重要的考虑因素是使用的安全性。氢气爆炸极限是4%~75%(体积百分浓度)^[5],即空气里如果混入氢气的体积达到总体积的4%~75%,点燃时就会发生爆炸。考虑到安全性,2%~4%的氢气混合气体是最常见的吸入浓度^[1]。Cui等^[6]将电解水之后的高浓度气体(66.7%氢气、33.3%氧气)直接应用于大鼠,证明了其生物安全性和有效性,并认为此种氢气供应方式比传统的高压气瓶储存更为方便;因其浓度处于氢气爆炸极限范围之内,Cui等在文中提到了其应用安全性问题^[6]。动物实验研究证明,高浓度的氢气对心脏^[7]、肝脏^[8]、视网膜^[9]的缺血再灌注损伤、子宫内膜异位^[10]和乙醛酸诱导的小鼠肾草酸钙晶体沉积^[11]具有良好的治疗效果。目前市场上已有用于人体呼吸的氢氧雾化机,可以提供高浓度氢气。

氢气在体内的运输和代谢符合生理学惰性气体相关规律。在潜水医学中,氢气与氮、氦、氖、氩、氙等气体都被认为是生理学惰性气体。氮气是最常见的生理学惰性气体,其在高压下的饱和和脱饱

和规律已有较全面的研究。目前认为,呼吸少量氢气与呼吸高压氮气有所不同,但基本规律类似。根据潜水医学中的气体扩散规律,惰性气体吸入后在血液中的饱和浓度的一半大约需要5 min,达到接近饱和大约需要30 min^[12]。惰性气体在不同的组织中饱和速度不同,这主要与组织中的脂肪含量及血液灌流状况有关。惰性气体在脂肪中溶解度高,张力上升慢。因此总体来说,脂肪多、血液灌流少的组织,半饱和时间长。血液中氢气半饱和时间最短,然后是脑组织,而肌肉组织较长。当停止吸入特定惰性气体后,其在体内的分压超过外在呼吸气体中的分压,就会向体外扩散,称为脱饱和。饱和快的组织,脱饱和也快^[12]。

吸入的氢气在肺内扩散至血液,并经血液循环到达身体各部位。Ono等^[13]研究显示,人体连续呼吸吸入3%或4%氢气30 min,氢气在动脉血和静脉血中的浓度迅速升高,约20 min达到稳定水平。吸入氢气的浓度越高,血液中氢气浓度也越高。吸入4%氢气,动脉血中氢气浓度可达24 $\mu\text{mol/L}$ 。在停止氢气吸入后,氢气浓度在开始阶段迅速下降,在动脉血和静脉血中分别约6和18 min降低至最高浓度的10%,之后缓慢下降。Ono等的另一篇文章中检测了吸入2%和4%氢气后皮肤释放的氢气,发现皮肤周围空气中氢气浓度上升缓慢,即使停止吸入氢气后,氢气仍会继续释放一段时间,推测可能是皮肤组织处血流速度缓慢以及脂-水层渗透屏障阻碍了氢气的释放,抑或是皮肤本身具有蓄积氢气、延缓其释放的功能^[14]。

动物实验中的相关数据也可以作为参考。大鼠吸入2%氢气,动脉血和心肌中氢气浓度2 min后开始上升,约5 min达到峰值^[15]。Liu等^[16]测定了

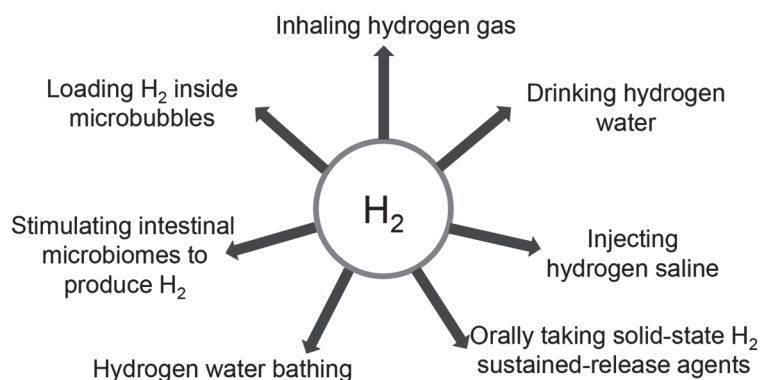


图 1. 发挥氢生物医学效应的氢分子供体种类

Fig. 1. Types of molecular hydrogen donors for exerting the effect of hydrogen biomedicine.

大鼠吸入 4% 氢气前和吸入后 30 和 60 min 不同组织中氢气的浓度，在肌肉中测得的氢气浓度最高，其次是脾脏和肾脏；吸入氢气后肌肉中氢气浓度显著高于其他给氢方式。由此可见，如果靶组织是肌肉，吸入是最好的给氢方式。

1.2 饮用氢气水溶液(氫水)

氢分子在水中有一定的溶解度。在标准条件(20℃、101.325 kPa)下 100 mL 水中可以溶解 1.83 mL 氢气(约 0.8 mmol/L、1.6 mg/L 或 1.6 ppm)，因此氢气可以通过饮用氫水摄入。一般实验研究中采用浓度为 0.6 mmol/L 以上的氫水^[17]。制作氫水的方法主要有水中直接通入氢气^[18](或加压助溶^[19])、电解水反应^[20]以及金属镁与水反应^[21]等。采用微米气泡技术助溶，可使氢气浓度达 2 mmol/L 以上，是一种高效制备高浓度富氫水的物理方法^[22]。富氫水的保存是至关重要的技术，因为氢分子体积小、穿透力强、极易散失。敞口放置的饱和氫水约 2 h 后浓度会降低一半，10 h 后氢气几乎全部散失^[23]。因此目前市面上的富氫水一般采用铝制包装。

氫水被饮用后会通过消化道进入血液循环，并到达全身各处。人体实验表明，饮用氫水后，呼出气体中氢气浓度迅速升高，约 10~15 min 至最高浓度，摄入氫气量越高，呼出气体中氢气浓度也越高，此后氢气浓度下降，约 60~150 min 降低至初始水平^[18, 24, 25]。Shimouchi 等^[24]研究显示，饮用氫水后氢气在上消化道的分压迅速增加，并扩散至消化道黏膜下血管中，并随后呼出；进一步的数据分析表明，饮用氫水中 72% 的氢气随呼吸排出体外，0.1% 的氢气通过全身皮肤排出体外，据此推测至少 20% 的氢气被人体消耗；饮用 300 mL 0.4 mmol/L 氫水，呼出气体中氢气浓度可达 36 ppm 以上。也有研究显示，受试者饮用 300 mL 1.2 mg/L (0.6 mmol/L) 氫水，呼出气体中氢气浓度可达 56.8 ppm^[18]。饮用氫水后呼出气体中氢气浓度差异可能与体重、饮用氫水浓度与速度、以及饮食或禁食情况导致的初始氫气基线水平不同等有关^[24]。

学者们在动物实验中也测得了饮用氫水后的相关数据。大鼠灌胃 4 mL 富氫水，5 min 内心房血中氢气浓度达到最高值(4 μmol/L)，并于约 30 min 后回到基线水平；主动脉血中氢气最高浓度约为心房的 1/10，而当在采血时夹紧气道，主动脉血中氢气浓度与心房血中基本一致，这说明了大量氢气会通过呼吸排出体外；各组织中氢气浓度检测结果显

示，肝脏中氢气的最高浓度远高于肾脏^[20]。Nagata 等研究^[19]显示，大鼠(体重约 230 g)灌胃 3.5 mL 0.8 mmol/L 的氫水，3 min 后心脏静脉血中氢气浓度可达 5 μmol/L。Liu 等^[16]检测发现灌胃氫水后氢气在大鼠脾脏、胰腺、肠道及肝脏中浓度较高。

1.3 使用富氫生理盐水

生理盐水是与人体血浆、组织液渗透压基本一致的 0.9% 氯化钠水溶液，常用于静脉注射或外用清洁。氢生理盐水将氢气溶于生理盐水，拓展了氢气在临床和实验中的使用方式。氢生理盐水的制作步骤包括生理盐水脱气处理、低温预处理、注入氢气及氢气加压助溶^[12, 26]。直接将氢气以 1 L/min 的速度通入 400 mL 普通生理盐水，10 min 即可接近饱和^[27]。也有学者将普通聚乙烯袋装注射用生理盐水完整浸入饱和氫水中，利用氢气的浓度差和穿透能力，长时间浸泡后，可得到袋装氢生理盐水，根据浸泡时间长短以及温度不同，所得氢气浓度为 250 μmol/L 至饱和浓度^[28]。饱和氢生理盐水的浓度约为 0.8 mmol/L，在铝袋中保存的饱和氢生理盐水约三个月后浓度降低一半^[25]。

氢生理盐水用于人体的方式主要是静脉注射。与吸入氢气和饮用富氫水相比，注射氢生理盐水可以准确控制氢气摄入量。在人体实验中，30 min 静脉注射 500 mL 富氫生理盐水，动脉血和静脉血中氢气浓度约 15 min 至最高点，皮肤释放的氢气在 30 min 内一直上升；注射停止后，各部位氢气浓度均立刻下降^[14]。

氢生理盐水也可通过注射或外用的方式直接作用于相关部位。Oharazawa 等^[27]在动物实验中将氢生理盐水应用于大鼠视网膜缺血再灌注的研究，他们将饱和氢生理盐水(0.8 mmol/L)连续滴于大鼠眼表，可测得大鼠眼表氢气浓度约 0.5 mmol/L；连续滴氢生理盐水 2 min 后，玻璃体中氢气浓度开始升高，15 min 达到平衡，约为饱和浓度的 20% (0.16 mmol/L)；停止滴加后，玻璃体中氢气浓度逐渐降低，约 15 min 后消失。

在动物实验中，也常常采用腹腔注射氢生理盐水的方法^[26, 29, 30]。Sun 等^[31]以 8 mL/kg 的剂量对小鼠腹腔注射富氫生理盐水，在肝脏和肾脏中，氢气浓度于注射后约 5 min 达到最高值，分别约 20 和 15 μmol/L，注射后约 40 min 氢气浓度降至初始浓度。Liu 等通过不同给氢方式(灌胃氫水、静脉注射氢生理盐水、腹腔注射氢生理盐水、呼吸 4% 氢气)

在大鼠体内进行实验,结果显示在动脉血、心脏及大脑中不同给氢方式无显著差异,但在肝脏、脾脏、胰腺、肠道及肾脏中腹腔注射氢生理盐水效果好,氢气浓度较高^[16]。由此可见,腹腔注射氢生理盐水,氢气可直接作用于腹腔内的肝脏、肾脏、脾脏、胰腺、肠道等组织,获得较高的氢气浓度。

1.4 氢分子缓释固态载体

氢分子缓释固态载体能够稳定释放氢气,最常见的材料是氢化珊瑚钙。氢化珊瑚钙由珊瑚钙制得。珊瑚钙是一种常用的钙补充剂,也含有镁及多种微量元素。珊瑚钙中的主要成分为碳酸钙(CaCO_3),在高温下与氢气反应可以生成氢化钙(CaH_2),即为氢化珊瑚钙产氢主要成分。氢化珊瑚钙的优点是储存安全、易于携带,遇水产生氢气可持续较长时间($\text{CaH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} = \text{Ca}(\text{OH})_2 + 2\text{H}_2\uparrow$)^[23]。动物实验显示氢化珊瑚钙具有多种生物学效应:氢化珊瑚钙释放的氢气可提高大鼠大脑海马区抗氧化能力^[32],抑制小鼠衰老速率^[33];氢化珊瑚钙作为线粒体营养素可用于预防高脂饮食所致的大鼠脂肪肝^[23]。

将氢化珊瑚钙制成水悬液敞口放置,随着氢化珊瑚钙浓度升高,水中氢气含量也升高。5、10 g/L 氢化珊瑚钙悬浊液中氢气浓度均可接近 0.6 ppm (0.3 mmol/L),其产氢持续、稳定,保持约 24 h 后浓度才缓慢下降^[23]。Ueda 等^[32]测定,氢化珊瑚钙与水反应,容器内气体中氢气浓度在 2 h 内迅速升高。

Hou 等用氢化珊瑚钙 (50 mg/kg) 灌胃大鼠,在 2 h 内,大鼠呼出气体中氢气总量约为灌胃饱和氢水 (10 mL/kg) 的 3 倍,约 8 h 后回到基线水平;对于大鼠,氢化珊瑚钙会在胃肠道内持续释放氢气,并扩散至全身^[23]。

需要注意的是,尽管珊瑚钙已是常见的补充剂,但氢化珊瑚钙对于人体安全性的数据尚缺乏,若用于人体,其安全性有待进一步评估^[23]。

动物实验中也有使用氢化镁 (MgH_2) 作为氢气缓释剂 ($\text{MgH}_2 + 2\text{H}_2\text{O} = \text{Mg}(\text{OH})_2 + 2\text{H}_2\uparrow$) 的, Kamimura 等^[34]给大鼠灌胃 MgH_2 (90 mg/kg) 后,血液中氢气浓度在 1.5 h 时上升至最高点,约 27 $\mu\text{mol/L}$; 1.5 至 8 h 时氢气浓度降低较快,之后缓慢下降,约 24 h 降低至基线。

1.5 氢水沐浴

沐浴装置一般采用电解水方式制得氢水,氢气初始浓度可达 1.13 ppm (0.57 mmol/L),在 37 °C 下放置 30 min 便会迅速降低至 0.3 ppm (0.15 mmol/L)^[35]。

Kato 等^[35]研究显示,氢水浴可直接作用于皮肤,采用电解水方式制得氢水 (0.19~0.41 ppm,约 0.1~0.2 mmol/L),经过 3 个月每天一次的氢水沐浴,6 位志愿者颈背皱纹得到明显改善。

市场上采用其他方式制得氢水的沐浴装置尚未见动物实验或人群试验的数据。

1.6 内源性氢气

在肠道内,氢气由细菌对未被人体上消化道吸收的碳水化合物(主要包括膳食纤维和低聚糖等)进行分解代谢产生。正常人进食的碳水化合物约 12 h 即被完全消化吸收,因此空腹 12 h 后,呼出气体中氢气的浓度与大气中氢气浓度接近^[36]。只要有少量的碳水化合物在肠道内发酵,呼出气体中氢气含量明显升高^[37]。多种动物实验证明了内源性氢气也可以发挥一定的生物学效应^[38-40]。

人体日常呼出氢气的浓度变化很大,从极微量至 50 ppm 不等,甚至更高^[41]。临床应用中有氢气呼吸实验,通过检测口服果糖后患者呼出气体中氢气浓度变化,用来评估胃肠道动力。饮用牛奶即可提高肠道产氢量,与饮用富氢水相比,饮用牛奶后呼出气体中氢气约 7 h 时达到最高浓度,并可在较长时间内维持较高水平^[24]。一些功能性食品可以用于日常饮食,提高人体氢气产量。Matsumoto 等^[42]向牛奶中添加低聚半乳糖、麦芽糖醇和葡甘露聚糖,制成功能性牛奶,与饮用富氢水 (1.57 ppm,约 0.79 mmol/L) 或普通牛奶相比,引用功能性牛奶后呼出气体中氢气含量更高,持续时间更长。

Nishimura 等^[40]在大鼠体内的研究结果显示,大肠内产生的氢气部分会扩散至腹腔内,并停留在不同组织中,尤其是脂肪组织;而主动脉血中氢气含量低,说明氢气主要从大肠内通过扩散作用进入腹腔内组织;氢气含量最高部位的是肾周脂肪。因氢分子是一种非极性分子,其在脂质中的溶解度是在水中的 3 至 5 倍,故在体内其更容易进入脂肪组织中。

1.7 基于超声成像的纳米氢气泡定点释放

通过常规的呼吸或饮用氢水等方法,氢气在体内目标组织的浓度可能较低。将氢气储存于微气泡内,并通过超声成像氢气递送技术,使氢气作用于目标组织,可大大提高氢气浓度,目前此方法已有效治疗大鼠心肌缺血再灌注损伤^[43]。

2 展望

氢气是非极性、小分子气体,在体内易扩散、

不易检测, 其体内含量相关研究往往缺乏时间相关分析。对于人体, 一般采用定时检测呼出气体及血液样本中的氢气含量间接反映其在体内的代谢(氢分子主要摄入方式与人体氢气最高浓度见表 1)。动物实验可采用氢电极组织穿刺法连续测定氢气在组织中的含量, 随着仪器稳定性和灵敏度的提高, 其应用将更加广泛。动物实验也可直接取动物组织, 在密封容器内使氢气释放并使用高灵敏度的配有氢气传感器的气相色谱仪检测^[15]。建立可靠的、可操作性强的体内氢气检测方法是研究氢气代谢的必要条件。

过去氢气一直被认为是一种生理学惰性气体, 随着氢分子生物学的发展, 证明了氢气在体内是可以被利用的。这决定了氢气在体内的运行规律与常见惰性气体体内运行规律不会完全一样。因此我们需要进一步研究氢气的作用靶点及氢气的作用机制。

不同的氢分子供体, 在体内有各自的代谢动力

学特点, 因此其适应的病症也会不同。例如, Ito 等研究显示, 对于 6-羟多巴胺诱导的单侧帕金森病大鼠模型, 饮用氢水产氢的治疗效果最好, 其次是间隙呼吸 2% 氢气, 而连续呼吸 2% 氢气或口服乳果糖促进肠道产氢效果不理想^[25]。目前氢生物学实验一般只使用单一的供氢方式。如果对于同种病症采用多种供氢方式, 然后进行对比治疗效果, 有利于找到最佳方法。

3 结语

发挥生物学效应的氢分子供体多种多样, 其在体内的代谢动力学特点也不同。针对病症选择合适的氢分子摄入方法的研究成果值得我们密切关注。虽然已有大量关于氢生物学效应的文章发表, 但氢气在人或动物体内的代谢动力学数据较为零散, 期待更为系统的氢气代谢动力学数据出现, 以便更科学地指导氢气在生物医学领域的应用。

表 1. 氢分子主要摄入方式与人体氢气最高浓度

Table 1. Main methods for administration of H₂ and highest hydrogen concentrations in human

Method	Dosage	Detected object	Peak time	Detection method	Reference
Inhalation of hydrogen gas	4%, 30 min	Arterial blood	24 μmol/L, 30 min	The blood sample (1 mL) was placed in a glass bottle (12 mL) immediately for the gas chromatographic measurement (TRIIlyser, mBA-3000, Taiyo Co. Ltd., Osaka, Japan)	[13]
Drinking hydrogen water	0.4 mmol/L, 300 mL	Breath	36 ppm, 15 min	The breath was immediately transferred to a gas-tight glass syringe, and 1 mL was injected into the gas chromatograph (TRIIlyser, mBA-3000, Taiyo Co. Ltd., Osaka, Japan)	[24]
	0.6 mmol/L, 300 mL	Breath	56.8 ppm, 15 min	Not mentioned	[18]
Injection of hydrogen saline	> 0.67 mmol/L, 500 mL	Arterial blood	1.8 ppm, 18 min	The blood sample (1 mL) was placed in a glass bottle (12 mL) immediately for the gas chromatographic measurement (TRIIlyser, mBA-3000, Taiyo Co. Ltd., Osaka, Japan)	[14]
		Venous blood	1.8 ppm, 18 min		
		Skin	1.8 ppm, 30 min	The leg was placed in a plastic bag, and gas was collected by the glass bottles in the bag at different time and measured by a gas chromatograph (TRIIlyser, mBA-3000, Taiyo Co. Ltd., Osaka, Japan)	

参考文献

- Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 2007; 13(6): 688–694.
- Nicolson GL, de Mattos GF, Settineri R, Costa C, Ellithorpe R, Rosenblatt S, La Valle J, Jimenez A, Ohta S. Clinical effects of hydrogen administration: From animal and human diseases to exercise medicine. *Int J Clin Med* 2016; 7(1): 32–76.
- Ichihara M, Sobue S, Ito M, Ito M, Hirayama M, Ohno K.

- Beneficial biological effects and the underlying mechanisms of molecular hydrogen-comprehensive review of 321 original articles. *Med Gas Res* 2015; 5(1): 12.
- 4 Penders J, Kissner R, Koppenol WH. ONOOH does not react with H₂: Potential beneficial effects of H₂ as an antioxidant by selective reaction with hydroxyl radicals and peroxynitrite. *Free Radical Biol Med* 2014; 75: 191–194.
 - 5 Carcassi M, Fineschi F. Deflagrations of H₂-air and CH₄-air lean mixtures in a vented multi-compartment environment. *Energy* 2005; 30(8): 1439–1451.
 - 6 Cui J, Chen X, Zhai X, Shi DC, Zhang RJ, Zhi X, Li XQ, Gu ZR, Cao LH, Weng WZ. Inhalation of water electrolysis-derived hydrogen ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats—A possible new hydrogen resource for clinical use. *Neuroscience* 2016; 335: 232–241.
 - 7 Chen OY, Cao ZY, Li H, Ye ZH, Zhang RJ, Zhang N, Huang JL, Zhang T, Wang LP, Han L. High-concentration hydrogen protects mouse heart against ischemia/reperfusion injury through activation of the PI3K/Akt1 pathway. *Sci Rep* 2017; 7(1): 14871.
 - 8 Li H, Chen OY, Ye ZH, Zhang RJ, Hu HJ, Zhang N, Huang JL, Liu WW, Sun XJ. Inhalation of high concentrations of hydrogen ameliorates liver ischemia/reperfusion injury through A2A receptor mediated PI3K-Akt pathway. *Biochem Pharmacol* 2017; 130: 83–92.
 - 9 Wang RB, Wu JC, Chen ZL, Xia FZ, Sun QL, Liu L. Post-conditioning with inhaled hydrogen promotes survival of retinal ganglion cells in a rat model of retinal ischemia/reperfusion injury. *Brain Res* 2016; 1632: 82–90.
 - 10 He Y, Shi JZ, Zhang RJ, Zhai DX, Zhang D, Yu CQ, Liu YH. Effects of hydrogen gas inhalation on endometriosis in rats. *Reprod Sci* 2017; 24(2): 324–331.
 - 11 Peng ZJ, Chen W, Wang L, Ye ZH, Gao SY, Sun XJ, Guo ZY. Inhalation of hydrogen gas ameliorates glyoxylate-induced calcium oxalate deposition and renal oxidative stress in mice. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(3): 2680–2689.
 - 12 Sun XJ (孙学军). *Hydrogen Molecular Medicine*. 1st ed. Shanghai: The Second Military Medical University Press, 2013 (in Chinese).
 - 13 Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Sakamoto M, Kudo Y, Kaneko K, Nakao A, Imaoka T. A basic study on molecular hydrogen (H₂) inhalation in acute cerebral ischemia patients for safety check with physiological parameters and measurement of blood H₂ level. *Med Gas Res* 2012; 2(1): 21.
 - 14 Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Sakamoto M, Kudo Y, Nakazawa J, Kaneko K, Nakao A. Hydrogen (H₂) treatment for acute erythematous skin diseases. A report of 4 patients with safety data and a non-controlled feasibility study with H₂ concentration measurement on two volunteers. *Med Gas Res* 2012; 2(1): 14.
 - 15 Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(1): 30–35.
 - 16 Liu C, Kurokawa R, Fujino M, Hirano S, Sato B, Li XK. Estimation of the hydrogen concentration in rat tissue using an airtight tube following the administration of hydrogen via various routes. *Sci Rep* 2014; 4: 5485.
 - 17 Han L, Tian RF, Yan HH, Pei L, Hou ZG, Hao SY, Li YV, Tian Q, Liu BY, Zhang Q. Hydrogen-rich water protects against ischemic brain injury in rats by regulating calcium buffering proteins. *Brain Res* 2015; 1615: 129–138.
 - 18 Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, Hosoda H, Fukui M, Nakamura N, Kitawaki J, Imai S, Nakano K, Ohta M. Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Res* 2008; 28(3): 137–143.
 - 19 Nagata K, Nakashima-Kamimura N, Mikami T, Ohsawa I, Ohta S. Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology* 2009; 34(2): 501–508.
 - 20 Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T, Ichihara M. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem* 2015; 403(1–2): 231–241.
 - 21 Song GH, Li M, Sang H, Zhang LY, Li XH, Yao ST, Yu Y, Zong CL, Xue YZ, Qin SC. Hydrogen-rich water decreases serum LDL-cholesterol levels and improves HDL function in patients with potential metabolic syndrome. *J Lipid Res* 2013; 54(7): 1884–1893.
 - 22 Kikuchi K, Tanaka Y, Saihara Y, Maeda M, Kawamura M, Ogumi Z. Concentration of hydrogen nanobubbles in electrolyzed water. *J Colloid Interf Sci* 2006; 298(2): 914–919.
 - 23 Hou C, Wang YY, Zhu EK, Yan CH, Zhao L, Wang XJ, Qiu YF, Shen H, Sun XJ, Feng ZH. Coral calcium hydride prevents hepatic steatosis in high fat diet-induced obese rats: a potent mitochondrial nutrient and phase II enzyme inducer. *Biochem Pharmacol* 2016; 103: 85–97.
 - 24 Shimouchi A, Nose K, Yamaguchi M, Ishiguro H, Kondo T. Breath hydrogen produced by ingestion of commercial hydrogen water and milk. *Biomark Insights* 2009; 4: 27–32.
 - 25 Ito M, Hirayama M, Yamai K, Goto S, Ito M, Ichihara M, Ohno K. Drinking hydrogen water and intermittent hydrogen gas exposure, but not lactulose or continuous hydrogen gas

- exposure, prevent 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease in rats. *Med Gas Res* 2012; 2(1): 15.
- 26 Song GH, Zong CL, Zhang ZQ, Yu Y, Yao ST, Jiao P, Tian H, Zhai L, Zhao H, Tian SY. Molecular hydrogen stabilizes atherosclerotic plaque in low-density lipoprotein receptor-knockout mice. *Free Radical Biol Med* 2015; 87: 58–68.
- 27 Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, Fujii H, Suzuki H, Machide M, Takahashi H, Ohta S, Ohsawa I. Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51(1): 487–492.
- 28 Ono H, Nishijima Y, Adachi N, Tachibana S, Chitoku S, Mukaiharu S, Sakamoto M, Kudo Y, Nakazawa J, Kaneko K. Improved brain MRI indices in the acute brain stem infarct sites treated with hydroxyl radical scavengers, Edaravone and hydrogen, as compared to Edaravone alone. A non-controlled study. *Med Gas Res* 2011; 1(1): 12.
- 29 Song GH, Tian H, Qin SC, Sun XJ, Yao ST, Zong CL, Luo YY, Liu J, Yu Y, Sang H. Hydrogen decreases athero-susceptibility in apolipoprotein B-containing lipoproteins and aorta of apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis* 2012; 221(1): 55–65.
- 30 Song GH, Tian H, Liu J, Zhang HL, Sun XJ, Qin SC. H₂ inhibits TNF- α -induced lectin-like oxidized LDL receptor-1 expression by inhibiting nuclear factor κ B activation in endothelial cells. *Biotechnol Lett* 2011; 33(9): 1715–1722.
- 31 Sun HY, Chen L, Zhou WP, Hu L, Li L, Tu QQ, Chang YX, Liu Q, Sun XJ, Wu MC. The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice. *J Hepatol* 2011; 54(3): 471–480.
- 32 Ueda Y, Nakajima A, Oikawa T. Hydrogen-related enhancement of *in vivo* antioxidant ability in the brain of rats fed coral calcium hydride. *Neurochem Res* 2010; 35(10): 1510–1515.
- 33 Ueda Y, Kojima T, Oikawa T. Hippocampal gene network analysis suggests that coral calcium hydride may reduce accelerated senescence in mice. *Nutr Res* 2011; 31(11): 863–872.
- 34 Kamimura N, Ichimiya H, Iuchi K, Ohta S. Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1 α to enhance fatty acid metabolism. *NPJ Aging Mech Dis* 2016; 2: 16008.
- 35 Kato S, Saitoh Y, Iwai K, Miwa N. Hydrogen-rich electrolyzed warm water represses wrinkle formation against UVA ray together with type-I collagen production and oxidative-stress diminishment in fibroblasts and cell-injury prevention in keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* 2012; 106: 24–33.
- 36 Wolever T, Robb PA. Effect of guar, pectin, psyllium, soy polysaccharide, and cellulose on breath hydrogen and methane in healthy subjects. *Am J Gastroenterol* 1992; 87(3): 305–310.
- 37 Levitt M, Hirsh P, Fetzer C, Sheahan M, Levine A. H₂ excretion after ingestion of complex carbohydrates. *Gastroenterology* 1987; 92(2): 383–389.
- 38 Kajiya M, Sato K, Silva MJ, Ouhara K, Do PM, Shanmugam K, Kawai T. Hydrogen from intestinal bacteria is protective for Concanavalin A-induced hepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386(2): 316–321.
- 39 Zhai X, Chen X, Shi JZ, Shi D, Ye ZH, Liu WW, Li M, Wang QJ, Kang ZM, Bi HD. Lactulose ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inducing hydrogen by activating Nrf2 expression. *Free Radical Biol Med* 2013; 65: 731–741.
- 40 Nishimura N, Tanabe H, Adachi M, Yamamoto T, Fukushima M. Colonic hydrogen generated from fructan diffuses into the abdominal cavity and reduces adipose mRNA abundance of cytokines in rats. *J Nutr* 2013; 143(12): 1943–1949.
- 41 Sone Y, Tanida S, Matsubara K, Kojima Y, Kato N, Takasu N, Tokura H. Everyday breath hydrogen excretion profile in Japanese young female students. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2000; 19(5): 229–237.
- 42 Matsumoto M, Fujita A, Yamashita A, Kameoka S, Shimomura Y, Kitada Y, Tamada H, Nakamura S, Tsubota K. Effects of functional milk containing galactooligosaccharide, maltitol, and glucomannan on the production of hydrogen gas in the human intestine. *J Funct Foods* 2017; 35: 13–23.
- 43 He YJ, Zhang B, Chen YH, Jin QF, Wu JR, Yan F, Zheng HR. Image-guided hydrogen gas delivery for protection from myocardial ischemia-reperfusion injury via microbubbles. *ACS Appl Mater Inter* 2017; 9(25): 21190–21199.