

编者按 开发氢能源是解决世界环境污染的一项重要措施。同时,氢气生物学也开始受到学术界和社会的广泛关注。氢气作为生命进化过程的助产士,在动物、微生物和植物各种代谢过程中发挥重要的调节作用。因为氢气制造方法相对成熟,且对生物的安全性高,因此也奠定了氢气在生命科学领域运用的基础。本期我们有幸邀请到氢农学方面的专家沈文飏教授和氢医学方面的专家孙学军教授来为我们解读这一新兴神奇的领域。本文旨在阐述氢气生物医学领域的研究历史、分子机制以及当今面临的重要科学问题。



沈文飏教授,南京农业大学博士生导师,上海交通大学氢科学中心兼职教授,江苏省生物化学与分子生物学学会副理事长,2007年入选教育部新世纪优秀人才计划。从事植物气体信号分子信号转导、代谢和功能等方面的研究,尝试开展从大田到餐桌的氢农业理论和实践工作。以通讯作者发表SCI论文110多篇,其中氢气植物学效应论文19篇。授权氢农业国家发明专利1项,获得与氢气植物学效应有关的国家自然科学基金2项。入选2014、2015、2016、2017和2018年爱思唯尔发布的“中国高被引学者”榜单。



孙学军教授,海军军医大学海军医学系,博士生导师,上海交通大学氢科学中心兼职教授。兼任中国医疗保健国际交流促进会常务理事,中国医疗保健国际交流促进会氢分子生物医学分会主任委员,中国健康促进基金会氢分子生物医学发展专项基金副理事长和专家委员会主席。

主要从事气体生物学研究,在氧气和氢气的生物学效应研究方面取得系列成果,受到国际同行的广泛关注。先后主持国家自然科学基金3项,发表学术论文260余篇,其中SCI收录论文145篇,2013年主编《氢分子生物学》,2015年主编英文版《氢分子生物医学》。长期致力于氢气生物医学科普宣传和健康促进领域的应用推广。

主要从事气体生物学研究,在氧气和氢气的生物学效应研究方面取得系列成果,受到国际同行的广泛关注。先后主持国家自然科学基金3项,发表学术论文260余篇,其中SCI收录论文145篇,2013年主编《氢分子生物学》,2015年主编英文版《氢分子生物医学》。长期致力于氢气生物医学科普宣传和健康促进领域的应用推广。

崭露头角的氢气生物学

沈文飏^{1),2)}*, 孙学军^{2),3)}

(¹⁾ 南京农业大学生命科学学院生物化学与分子生物学系,南京 210095; (²⁾ 上海交通大学氢科学中心,上海 200240;

(³⁾ 海军军医大学海军医学系,上海 200433)

摘要 氢气(hydrogen gas, H₂)是新发现的生物气体信号分子。自2007年开始,有关H₂的生理调控活性及信号转导功能受到广泛的关注,并逐步形成了研究氢气生物学效应和分子机理的一门新学科——氢气生物学。按照实际运用范围的不同,氢气生物学也可以划分为氢医学和氢农学。在医学方面,通过多种动物模型研究和部分临床试验,发现H₂具有抗氧化、抗炎和抗凋亡的作用,而且H₂对缺血/再灌注以及以炎症为基础的急性组织缺血性疾病和慢性退行性疾病(如帕金森病、阿尔茨海默病和动脉粥样硬化等氧化应激相关疾病)均具有较为理想的正面效果。在农学方面,相关报道还发现H₂可以提高苜蓿、水稻和拟南芥对非生物胁迫的耐性,调控黄瓜、番茄、猕猴桃、

收稿日期: 2019-08-01; 修回日期: 2019-08-23; 接受日期: 2019-08-27

佛山市农业科技项目(佛财预2019[140]号)和国家自然科学基金项目(No.31371546, No.31972396)以及上海交通大学氢科学中心的经费支持

* 通讯作者 Tel: 025-84396542; E-mail: wbsenh@njau.edu.cn

Received: August 1, 2019; Revised: August 23, 2019; Accepted: August 27, 2019

Supported by Foshan Agriculture Science and Technology Project (Foshan City Budget No. 140, 2019.) and the National Natural Science Foundation of China (No.31371546, No.31972396) and the Funding from Center of Hydrogen Science, Shanghai Jiao Tong University, China

* Corresponding author Tel: 025-84396542; E-mail: wbsenh@njau.edu.cn

芽苗菜、黑大麦和食用菌的生长发育和营养品质,延长洋桔梗、玫瑰和百合切花的保鲜以及提高家畜对病原微生物的抗性。本文首先探究了氢气生物学的发展历史,提出氢医学研究思路的源头是电解水,结合 H_2 测定方法、内源 H_2 的产生途径以及氢气生物学效应的分子机理和信号转导的研究成果,从给氢方式、生物学效应以及安全性等方面,介绍了氢医学和氢农学的现状,提出选择性抗氧化机制不能完全解释现有的氢生物学效应,反映相关分子机制的复杂性和多样性。最后,针对氢气生物学的若干重要的科学和实践问题进行了展望,并提出氢医学的进一步发展还依赖于大量且可信度高的临床试验,氢农业还需要完成多年多点的大规模大田实践。

关键词 氢气生物学;发展现状;氢医学;氢农业;展望

中图分类号 Q1;S1

Hydrogen Biology: It is just Beginning

SHEN Wen-Biao^{1), 2)}*, SUN Xue-Jun^{2), 3)}

¹⁾ Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

²⁾ Center of Hydrogen Science, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

³⁾ Faculty of Naval Medicine, Navy Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract Hydrogen gas (H_2) is a novel gaseous signaling molecule. Since 2007, more attention has been paid to the physiological functions and signal transduction pathways of H_2 . Thus, a new discipline, called hydrogen biology, has been gradually developed to elucidate the biological functions and corresponding molecular mechanisms of H_2 . Hydrogen biology can be divided into hydrogen medicine and hydrogen agronomy, according to its actual scope of application. In medicine, the anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects of H_2 have been discovered based on studies in multiple animal models and thereafter some clinical trials. In fact, H_2 has ideal positive effects on ischemia/reperfusion, inflammatory-based acute tissue ischemic diseases and chronic degenerative diseases, such as Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and atherosclerosis. In plants and agronomy, it was found that H_2 could enhance plant tolerance against abiotic stress in alfalfa, rice and Arabidopsis, regulate growth, development, and nutritional values of cucumber, tomato, kiwifruit, sprouting vegetable, black barley and edible fungi. It is also demonstrated that H_2 could extend the vase life of lisianthus, rose and lily cut flowers, and improve the resistance of livestock against pathogens. In this paper, the history of hydrogen biology is described firstly, and it is proposed that electrolyzed water might be the first source of hydrogen medicine. The determination approaches of H_2 , the synthetic pathway(s) of endogenous H_2 , and the progresses of molecular mechanism and corresponding signal transduction of hydrogen biology were reviewed. Subsequently, the application status of hydrogen medicine and hydrogen agronomy was introduced from the perspectives of delivery, biological effects and safety of H_2 . It is very interesting that the selective antioxidant mechanism of molecular hydrogen can not fully explain the existing biological effects of H_2 , reflecting the complexity and diversity of this discipline. Finally, some important scientific and practical issues of hydrogen biology are proposed. Importantly, we pointed out that further development in hydrogen medicine depends on a large number of clinical trials with high reliability. Meanwhile, hydrogen agriculture also relies on large-scale field trials with multi-year and multi-site experiments in the future.

Key words hydrogen biology; developmental status; hydrogen medicine; hydrogen agriculture; prospect

由于氢气(hydrogen gas, H_2)是低排放、环境友好、可再生、能量密度高以及不产生任何温室气体的清洁燃料,因此 H_2 在工业中,尤其是在新能源汽车中的运用具有明显的优点^[1]。通常观点认为 H_2 是一种对高等生物没有任何效应的生物惰性分子。由于氢元素是自然界最简单和最丰富的元素,根据黑

格尔哲学思想“存在即合理”的观点,很难理解 H_2 没有生物学效应。虽然早期的研究发现,藻类、微生物、动物和植物均具有产生并释放 H_2 的现象,但是一直不清楚其生物学功能^[2-4]。2007 年日本科学家太田成男(Shigeo Ohta)教授等在《Nature Medicine》撰文,报道外源 H_2 可以选择性地清除羟基自由基

($\cdot\text{OH}$)和亚硝酸阴离子自由基(ONOO^-),从而缓解大鼠大脑中动脉缺血再灌注导致的氧化损伤^[5]。这是一个具有里程碑意义的发现,并开始引起科学界的广泛关注。

最近十多年的研究提示, H_2 是一种新的生物气体信号分子,由于其具有各种生理调控活性及信号转导功能,因此也被初步运用于临床医学和农业^[6-10],从而出现了“氢气生物学”的概念。截至到2019年8月24日,国家自然科学基金委资助的与氢气生物学功能相关的自然基金项目达85项,分布于42家科研单位。2019年1月上海交通大学率先成立了以丁文江院士为主任的氢科学中心,重点支持氢能源和氢生物学研究,并受到了国家科技部、上海市委及国内外同行专家的高度关注,该中心的成立也是氢生物学发展历史上的一个里程碑事件。

本文首先介绍了氢气生物学的发展历史以及研究现状,并结合相关测定方法、内源 H_2 的来源以及生物学效应的分子机理和信号转导,介绍了氢医学和氢农学的现状,提示氢气生物学已经逐渐形成了医学、农学、化学、材料学和营养学等多学科的交叉和融合发展的趋势,最后对氢气生物学今后值得重点关注方向进行了探讨和展望。

1 氢气生物学的发展历史

氢生物学,顾名思义,就是研究氢气生物学效应和分子机制的一门新兴学科,主要包括氢气微生物学、氢气动物学和氢气植物学。按照实际的运用,氢生物学可以简单的划分为氢医学和氢农学。

1975年美国学者Dole等在《Science》杂志上报道了高压 H_2 对小鼠皮肤癌的改善作用,这是科学界认可的氢医学研究的最早报道^[11]。2007年日本科学家太田成男课题组在《Nature Medicine》发表论文“ H_2 通过选择性减少细胞毒性氧自由基来发挥其治疗性抗氧化剂作用”,发现吸入2%~4%(V/V)的 H_2 可以改善鼠脑缺血氧化损伤^[5]。由于该研究提出 H_2 选择性抗氧化的概念,即 H_2 可以选择性清除毒性活性氧(reactive oxygen species, ROS),而不会与其他必要ROS发生作用,提示 H_2 将成为简单可用的潜在医疗手段,这也是氢医学快速发展的奠基性工作。由于 H_2 对人体的安全性及其潜在的疾病治疗效应,因此 H_2 生物学可能具有较大的应用前景,这也是学术界和产业界广泛关注氢医学的根本原因。

从历史的发展来看,氢医学研究思路的源头是

电解水,而且日本学术界对电解水的研究历史也比较长。电解还原水(electrolyzed reduced water, ERW)是电解水在科学文献中最常用的名称,由于其溶解一定浓度的 H_2 ,因此电解水具有还原性和碱性的特点^[12,13]。在本世纪初,一些学者已经开始逐渐意识到电解水的作用本质可能是 H_2 的效应^[14],这也是日本产业领域早于学术界制造出富氢水(又称为水素水),并推动学术界对 H_2 可能具有治疗疾病效应关注的根本原因。2007年太田成男教授关于氢气效应的研究进一步提示 H_2 可能是电解水发挥作用的基础。

2 氢气的测定方法

生物体内源 H_2 含量的检测技术对于氢气生物学研究具有重要的意义。在药理学研究中,浓度始终是最重要的影响因素之一,因此对 H_2 含量的测定方法也提出更高的要求。对于生物体内 H_2 浓度而言,最理想的检测方法应具备精度达到微摩尔至纳摩尔级、不轻易与其他杂质发生反应、不破坏生物体内环境,以及能够实时反映体内 H_2 动态变化的特点。目前, H_2 的检测方法分为气相色谱法(gas chromatography, GC)、电极法和氧化还原滴定法等三种方法。由于仪器以及生物体内环境的差异,不同测定方法测定的数据也有不小的差异,因此选择合适的测定方法对于特定的生物学效应研究非常重要。

2.1 气相色谱法

气相色谱是目前报道最多的 H_2 测定方法,可以定量检测微量的 H_2 。气相色谱测定原理为样品气体经进样口被分离后,由热导检测器(thermal conductivity detector, TCD)得到相应的输出信号。受分析灵敏度限制,气相色谱不能用于生物样品直接测试,必须结合顶空法使用。2007年太田成男课题组发表的氢气生物学研究论文就是采用这种方法^[5]。气相色谱法可以检测到人吸入 H_2 后血液 H_2 含量的变化^[15]以及苜蓿幼苗响应氧化胁迫后 H_2 含量的变化^[16]。总体而言,气相色谱法具有选择性好的特点,但分析成本相对较高,同时杂质的干扰也会影响出峰时间和峰面积。

2.2 电极法

为了更好地研究氢气的生物学作用,开发一种能够无损伤且实时监测 H_2 变化的技术就显得非常重要, H_2 电极法可以满足上述要求。电极法测定的

基本原理即利用 H_2 的还原性,与氢敏传感器上的钯反应生成钯的氢化物,进而改变密度和导电性,而且这种变化的强弱可以转化为电信号,从而反映 H_2 含量的高低^[17]。根据工作原理的不同,氢敏传感器又分为电化学、半导体、热导和光学型这 4 种类型^[18]。其中,电化学氢敏传感器是将化学信号转化为电信号,从而实现了对 H_2 的有效监测。虽然此类传感器由于易氧化等因素而导致寿命较短,但其选择性好、灵敏度高且便于小型化,仍然是目前应用最为广泛的一种传感器类型。以电化学氢敏传感器为例, H_2 电极直径可以最大缩小到 $2\text{ }\mu\text{m}$,直接插入生物体组织内部实时监测 H_2 含量的微变化。采用上述方法,发现小鼠血液中的 H_2 含量小于 $7\text{ }\mu\text{mol/L}$ ^[19],小鼠肝脏和肾脏组织的 H_2 含量则为 $5\sim 25\text{ }\mu\text{mol/L}$ ^[20],而拟南芥幼苗根部组织在响应脱落酸(abscisic acid, ABA) 信号时 H_2 含量范围在 $0\sim 20\text{ }\mu\text{mol/L}$ ^[21]。

虽然电极法测定 H_2 含量具有准确和灵敏的特点,能够基本满足实时监测 H_2 的需求,但是该方法对环境要求极为严格,包括稳定的电场、温度和 pH 等。另外,由于物种、组织和内环境的差异,以及较高的成本,电极法并不适用于检测所有的生物组织。

2.3 氧化还原滴定法

为了更加快速地检测 H_2 含量,便捷和低成本 的 H_2 氧化还原测定法应运而生。例如,日本研究 人员利用 H_2 的还原性,建立了一种检测 H_2 浓度的 简易方法^[22]。该方法属于典型的氧化还原滴定法, 通过胶体白金(纳米铂)催化 H_2 还原亚甲蓝,由于 该反应可使蓝色的氧化型亚甲蓝溶液还原为无色的 还原型亚甲蓝,通过简单的换算便可以知道溶液中 H_2 的含量。由于上述滴定法虽然容易操作,但很难 进行 H_2 浓度的精确定量。针对上述问题,结合分 光光度计测定可以显著提高其准确性^[23]。

必须承认,滴定法能够快速、低成本的初步检测 溶液中 H_2 的含量。但是,氧化还原滴定法也有不 可避免的缺陷,即应用范围受到相当大的限制,例如 对于血液或细胞培养液等,此方法并不适用。

3 内源 H_2 的产生途径

生物体内源 H_2 的产生途径是比较复杂的(见 Fig.1)。在藻类和细菌中首先发现依赖于氢酶的 H_2 产生和释放的现象。已经知道,氢酶主要包括 $[\text{Ni-Fe}]$ 和 $[\text{Fe-Fe}]$ 两类,其中 $[\text{Ni-Fe}]$ 氢酶主要存

在于绿藻和产氢细菌, $[\text{Fe-Fe}]$ 氢酶则主要存在于 蓝藻和厌氧细菌^[2,24,25]。此外, H_2 也是细菌固氮 酶催化反应的副产物^[26],曾有学者根据这一现象 提出了“氢肥”的概念^[8,26]。动物体 H_2 的产生主 要来源于肠道细菌的发酵产物^[3],但是目前在动 植物基因组中并未发现类似于藻类氢酶的相关编 码基因^[7]。

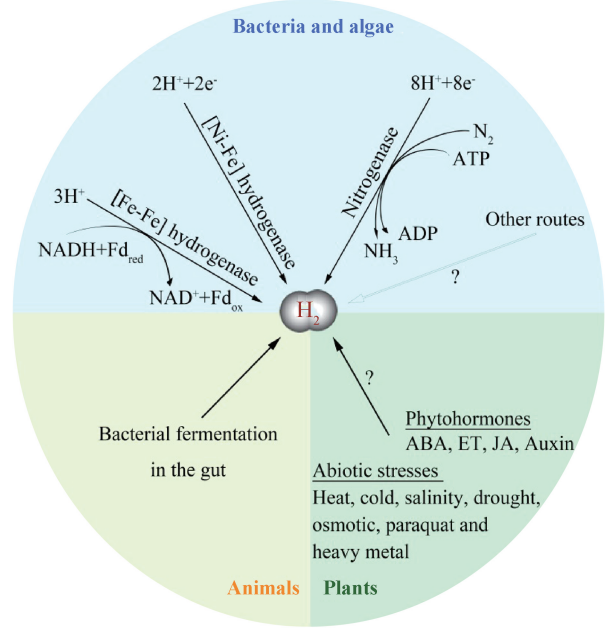


Fig.1 Biosynthesis of H_2 in microbes, animals and plants ABA, abscisic acid; ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; ET, ethylene; Fd_{red} , reduced ferredoxin; Fd_{ox} , oxidized ferredoxin; JA, jasmonic acid; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NAD^+ , oxidized nicotinamide adenine dinucleotide; N_2 , nitrogen; NH_3 , ammonia

据报道,逆境胁迫(极端温度^[27,28]、干旱^[29]、渗透胁迫^[30]、盐害^[31]、百草枯^[16]和重金属胁迫^[32])和某些植物激素,包括 ABA^[21]、乙烯(ethylene, ET)^[31]、茉莉酸(jasmonic acid, JA)^[31]和生长素(auxin)^[33]等,均可诱导植物产生 H_2 ,其中部分还能检测到氢酶活性的变化。另外,也有文献报道 H_2 通过抑制 ET 代谢从而延长猕猴桃的保鲜期^[34]。由于光合电子传递链的抑制剂也可以抑制植物 H_2 的产生^[35],推测植物 H_2 的产生可能来源于酶学和非酶学两种途径,并与光合作用有关,同时也不排除植物体内存在类似于藻类氢酶功能的蛋白质^[7]。

4 氢气生物学的现状以及分子机制

氢医学和氢农学不仅在应用上存在差异,在作

用机制等方面也各有特点。下面分别叙述相关的研究现状及其分子机理。

4.1 给氢方式

H₂ 的供应方式是氢气生物学研究和运用的第一步。目前,生物体摄取 H₂ 主要有气体、液体和固体途径三种方式。其中,气体给氢途径主要是通过 H₂ 吸入^[5]。高压吸入 H₂ 需要特殊的加压舱^[11],因技术复杂危险性高,一般仅见于潜水和科研活动。常压吸入 H₂ 包括纯 H₂ 吸入和氢氧混合气吸入,它们各有优缺点。纯 H₂ 吸入安全性高,但吸入量过大会造成氧分压下降,并不适合用于低氧可能会产生危害的情况,如在高原低氧环境,纯 H₂ 吸入不能用于肺活量低的儿童和肺功能障碍患者等。另一方面,虽然氢氧混合气吸入不会造成低氧,但会提高发生燃烧的风险,因此对设备的安全技术要求更高。通常,H₂ 的来源包括罐装、电解水和化学制备。由于罐装和化学方法制造 H₂ 存在一定的安全隐患,目前主流的生物应用制氢是电解水技术^[12-14],包括纯水质子膜和碱性溶液电解水技术,这些技术也各有优缺点,一般纯 H₂ 吸入多采用纯水电解,氢氧混合气吸入则采用碱性溶液电解。

液体给氢主要是(富)氢水的使用^[14,21],使用方法包括饮用、注射、全身和局部的浸泡,通过血液和透析腹膜技术给氢也属于这一范围,结合膜肺也可以建立新的液体给氢途径。这些方法大多是将 H₂ 预先溶解在水等液体中,再利用气体分子布朗运动产生的从高浓度向低浓度扩散的作用来摄取 H₂^[20]。由于 H₂ 在液体中的溶解度有限,这种方法给氢的剂量往往低于 H₂ 吸入的方法,不过氢水饮用对肠道菌群的影响比较明显,且饮水在应用监管方面的门槛相对较低,这是其特有的优势。氢水的核心是气液混合技术,气液混合在化工和环保等领域属于成熟技术,但转接到氢气生物学领域还需要进行适当的改进,在氢水储存方面还需要解决压力和气密性两个问题,同时在设备材料和消毒等方面也需要进行优化和改进。

固体给氢途径则包括:1)口服促进肠道细菌代谢产 H₂ 的营养物质;2)口服可储存并释放 H₂ 的材料,如钯金和新型纳米材料,也有能和水反应产生 H₂ 的金属或金属氢化物^[10]。营养物质虽然在促进肠道细菌产生 H₂ 方面有一定的可行性,但长期使用对肠道菌群的影响还需要进一步深入研究。另一方面,新材料产氢则需要重视材料本身的生物安全性。

4.2 氢医学的现状

氢医学是一门研究通过 H₂ 改善人类疾病症状以及促进人类健康的学科,主要研究领域包括 H₂ 改善人类疾病症状的基础医学和临床医学,其中与氢气生物学效应直接有关的是其剂量、使用方法和效果,以及可能的毒副作用等。

通过 Web of Science 核心合集的数据分析发现,涉及 H₂ 改善疾病症状和损伤的论文在 2016 年就超过 300 篇,通过多种动物模型研究和部分临床试验,发现 H₂ 具有抗氧化^[5]、抗炎^[36]和抗凋亡^[37]的作用;H₂ 不仅可以抑制肿瘤^[38],而且对缺血/再灌注^[5]以及以炎症为基础的急性组织缺血性疾病^[39]和慢性退行性疾病(包括帕金森病^[40]、阿尔茨海默病^[41]和动脉粥样硬化^[42]等氧化应激相关疾病)均具有较为理想的正面效果。由于上述研究往往采用吸氢、氢水饮用、含氢溶液静脉注射以及含氢透析液透析,且大多属于细胞和动物疾病模型研究,从循证医学的角度考虑,相关的证据还不够充分,包括还缺乏大样本和高等级的人体临床研究,以及双盲随机对照等。

有关氢医学的研究,已经有不少相关综述^[6,43]。本文结合多种动物模型研究和部分临床研究的结果,进行了分类整理,以帮助读者快速了解相关进展。

4.2.1 H₂ 对急性心脑血管疾病的改善作用 H₂ 对脑缺血和心肌缺血的动物实验研究属于最早期的研究。例如,H₂ 盐水通过清除脑组织中的·OH 来缓解脑干梗死症状^[44];急性脑缺血早期每天吸入 H₂ 持续 1 周对脑损伤具有保护作用^[45],以及心肌梗塞后早期吸入 H₂ 对后期心脏衰竭有缓解效果,上述可能与 H₂ 对氧化应激、炎症、细胞死亡和代谢的影响有关^[46]。这些研究结果提示:通过早期进行 H₂ 干预,对急性组织缺血再灌注损伤这种典型氧化炎症损伤的病理状态,可能有一定的临床应用前景。日本学者目前正在对 H₂ 吸入预防心脏骤停综合征开展大规模临床研究,但是目前还没有最终结果的报道^[47]。

4.2.2 H₂ 对慢性病的干预 慢性病主要指包括广泛流行代谢性疾病和神经退行性疾病。前者主要包括糖尿病、动脉硬化、高血压,神经退行性疾病包括阿尔茨海默病和帕金森病等,这些慢性病是当前人类健康面临的最危险疾病。早在 2008 年就有学者开展饮用氢水对二型糖尿病的小规模干预研究,发

现氦水对糖耐量受损有比较好的纠正效果^[48]。此外,小规模研究发现,连续饮用氦水 48 周能明显改善帕金森综合评分,但后来进行的验证性临床研究发现氦水对这一疾病没有明显效果,因此 H₂ 对帕金森病是否有治疗作用还存在争议^[49]。日本学者发现 饮用 氦水和吸入 H₂ 对 载脂蛋白 E4 (apolipoprotein E4, APOE4) 突变类型阿尔茨海默病有一定的预防效果^[50]。另一方面,尽管氦水对动脉硬化和高血压的治疗缺乏直接的研究数据,但不少学者发现饮用富氦水能改善血脂紊乱,提高血浆中前-β-高密度脂蛋白 (pre-beta-high-density lipoprotein, pre-β-HDL) 的水平,增强对低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 氧化的保护作用,从而抑制氧化型低密度脂蛋白 (oxidized-low-density lipoprotein, oxidized-LDL) 引起的炎症反应和血管内皮细胞的凋亡^[51]。这些发现提示 H₂ 对预防动脉硬化有一定的应用潜力。

H₂ 对慢性病的干预,是氢医学最有前景的运用领域之一。饮用氦水和吸入 H₂,作为安全和经济方便的健康手段,有希望为当今健康中国行动作出特殊的贡献。

4.2.3 H₂ 控癌 广州复大肿瘤医院总院长徐克成教授提出的 H₂ 控癌是氢生物学研究中最期待的运用。尽管早在 1975 年就发现 H₂ 对动物癌症症状的改善作用,但人体实验证据至今还比较少见。2019 年有学者报道,连续 3 个月每天 3 小时吸入 H₂ 可显著提高晚期结肠癌患者自身抗肿瘤免疫功能,从而提高患者生存时间等预后^[52]。H₂ 改善癌症放射和化疗的副作用也有不少的报道。例如,饮用氦水可预防放疗导致的生活质量下降,预防头面部放疗导致的口腔溃疡以及化疗导致的肝脏毒性^[53,54]。2019 年日本学者在《The Lancet》发表论文,证明 H₂ 吸入对癌症患者逆向调强放疗 (intensity modulated radiation therapy, IMRT) 所导致的血小板和白细胞损伤有明显的缓解作用,这种作用可能与 H₂ 能够选择性地清除因 IMRT 而产生的·OH 和 ONOO⁻有关^[55] (预出版中)。

4.2.4 H₂ 对皮肤病和运动损伤的干预 氦水泡浴能显著改善银屑病的皮肤病变,这与氦水的抗氧化功能相关^[56],氦水沐浴还可以通过减少 ROS 产生和促进真皮 I 型胶原蛋白合成来减少皮肤皱纹^[57],也有科学家发现氦水对皮肤烧伤后的色素沉着有一定的改善效果,并与 H₂ 的抗氧化作用、对组织炎症反应的抑制以及阻止和延缓细胞凋亡进程有关^[58]。

另外,氦水能减少运动疲劳,促进运动后体力的恢复,除了氦水能够减少运动产生的氧化应激外,还可能与其中和运动产生的酸毒性有关^[59]。把饮用和沐浴氦水作为促进健康的手段,不仅能减少可能的运动损伤,还能强化运动的健康促进效果,因此可以作为一种新的健康生活方式。

4.2.5 H₂ 对眼的保护作用 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, AMD) 是导致欧美国家老年人视力丧失的首要原因。随着我国人口老龄化和智能手机的广泛使用,该病在人群中的发病率也逐年增加。氧化应激损伤是 AMD 发病的重要机制。H₂ 对大鼠视网膜光损伤具有保护作用,并可能与去乙酰化酶 1 (sirtuin 1, Sirt1) 信号通路有关^[60,61]。在 N-甲基-N-亚硝脲 (N-methyl-N-nitrosourea, MNU) 诱导的视网膜退行性病模型上,也观察到 H₂ 对视网膜损伤具有明显的保护作用^[62,63]。运用大鼠视网膜分支静脉阻塞模型观察到了 H₂ 对大鼠视网膜缺血/再灌注损伤有减轻作用,并与 H₂ 对血管内皮生长因子-α (vascular endothelial growth factor-α, VEGF-α) 的调控作用有关^[64]。此外,在视神经损伤模型中也观察到了 H₂ 的保护作用^[65]。但是在对内毒素诱导的大鼠葡萄膜炎动物模型上,未观察到 H₂ 的作用^[66,67],同样在氧诱导视网膜新生血管小鼠动物模型也未观察到明确的防治效果^[68]。

4.3 氢医学效应的分子机制

效应机制是理解 H₂ 作用及其应用的理论基础,但目前并不完全清楚氢医学效应中抗氧化、抗炎和抗凋亡的分子基础。由于当前最受学术界认可的假说是 H₂ 的选择性抗氧化,这里仍然围绕这一假说来梳理氢医学分子基础的发展历史和最新进展 (见 Fig.2)。

4.3.1 氢医学分子基础的发展历史 1975 年高压 H₂ 治疗肿瘤研究根据 H₂ 是弱还原剂,从而采用高压提高 H₂ 抗氧化能力的方式来产生抗氧化作用^[11]。2007 年小剂量 H₂ 吸入治疗脑缺血再灌注损伤也是根据 H₂ 弱还原作用,首次提出 H₂ 只能中和强氧化自由基的选择性抗氧化作用^[5]。大量研究发现 H₂ 具有抗氧化、抗炎和抗凋亡的效应^[5,36,37],并对细胞内相关信号分子及其基因表达产生广泛的影响。但是氢医学作用最受公认的解释仍然是选择性抗氧化作用,主要是因为选择性抗氧化假说可对多种氢生物学效应提供初步合理的解释。

ROS 和氧化应激本身就是炎症反应的一部分,许多 ROS 也参与炎症的信号调节,具有抗氧化作用的药物一般都具有抗炎症效应,因此 H_2 抗炎症可纳入 H_2 抗氧化效应的继发效应^[36]。同样道理,各种损伤导致的细胞凋亡也是组织损伤的表现形式,而氧化应激损伤往往处于细胞损伤病理过程的核心地位,因此细胞凋亡也可以作为抗氧化损伤的表现形式。不过,氢医学效应目前很难全部归入其选择性抗氧化作用,其原因是许多细胞信号的改变是在疾病和损伤背景下的变化,这些改变大多混杂有细胞的损伤效应,无法确定是 H_2 本身的效应,还是 H_2 保护的细胞损伤以及产生细胞损伤特征后信号的逆转。

4.3.2 抗氧化和抗炎症的分子机理 在 H_2 效应机制研究中,有一类典型分子效应是促进了细胞自身抗氧化能力。细胞自身抗氧化能力主要受到核-红细胞系 2p45 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2p45-related factor, Nrf2) 转录系统的调控,其调控的信号主要是与各种氧化应激有关,这类信号也可以用 H_2 选择性抗氧化假说来解释。研究发现, H_2 能激活 Nrf2 转录系统, Nrf2 基因敲除降低 H_2 抗氧化效应^[69]。细胞学研究进一步发现, H_2 也可以提高细胞内早期的 ROS 信号,通过促进氧化应激水平,来调动后期的抗氧化系统,从而减低氧化损伤。总之, H_2 抗氧化作用主要是整体效应和长期效应。

此外, H_2 还可以调控多种细胞信号通路以及下游信号,其中抗氧化效应涉及 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated protein kinase 1/2, ERK1/2)^[70] 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)^[71] 通路。 H_2 抗炎症效应涉及白介素 (interleukin, IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 在内的促炎性细胞因子、巨噬细胞趋化蛋白 1 (macrophage chemoattractant protein 1, MCP-1)^[72]、细胞间黏附分子 (intercellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 等炎症介质和高迁移率族蛋白 (high-mobility group box protein 1, HMGB-1)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等促炎性转录因子的表达^[73-75]。 H_2 还可以被 Toll 样受体 4 (Toll-Like Receptor 4, TLR4) 介导的信号通路调控,从而发挥抗炎症作用^[76]。

4.3.3 抗凋亡的分子机理 H_2 还可以通过提高磷酸化 AMP 活化的蛋白激酶 (phosphorylated AMP-

activated protein kinase, p-AMPK)、凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (caspase3, CASP3) 的表达水平,从而增强 5-氟尿嘧啶诱导癌细胞凋亡的作用,提高细胞存活率^[77]。富氢生理盐水可以减少因缺血再灌注引起的心肌细胞凋亡,包括显著改善左心室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP) 和左心室舒张压 (left ventricular diastolic pressure, LVDP) 在内的心功能参数。相关的机理包括减少中性粒细胞浸润,降低 3-硝基酪氨酸和 ICAM-1 的表达水平,以及减少大鼠心脏高风险区域 (area at risk zones, AAR) 中髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 的活性等^[74]。

另外,越来越多的证据已经发现了氢医学效应的大量下游途径或靶点,包括自噬、组蛋白修饰以及线粒体未折叠蛋白质应答、运动后的急性氧化应激等^[75]。不过总体而言,氢医学的相关分子机理的研究还处于起步阶段。

4.4 与材料科学相结合的氢医学前沿

与材料科学的融合是氢医学发展的新趋势。目前,用于氢医学的新材料包括纳米含氢新材料和新型高效的镁基储氢材料等。

4.4.1 纳米氢医学 随着氢医学研究的深入和延伸,近年来纳米氢医学应运而生^[78]。纳米氢医学是指利用纳米技术和新型纳米材料尝试解决氢医学中遇到的科学技术问题^[78,79],包括但不限于:1) H_2 靶向传输;2) H_2 可控释放;3) 尝试基于 H_2 的多模式联合作用。利用纳米材料的靶向性可以实现 H_2 的靶向传输,增加病灶组织局部氢浓度,从而增强药效;通过调控纳米材料的尺寸和表面分子识别特性可以尝试实现肿瘤主动/被动靶向 H_2 治疗^[80,81]。另外,通过介孔二氧化硅等纳米载体高效负载 H_2 前药,或者将 H_2 前药直接纳米化,可以增加 H_2 负载量,尝试提高 H_2 的生物学效应^[82-84];同样,通过调控纳米材料的敏感性也可以实现可控 H_2 释放^[79-81];运用分子影像技术,开发纳米造影剂,可以示踪释氢纳米材料体内代谢^[79-81]。借助铂和钯等纳米催化剂,可以增强 H_2 还原性以及高氧化性自由基的清除效果,提高 H_2 的生物学效果^[79,80]。另外,基于纳米材料的多功能特性,可以方便地将 H_2 与常规治疗方式进行有效整合,从而尝试基于 H_2 的多模式联合作用^[80,85]。

4.4.2 氢化镁在氢医学上的运用 氢化镁 (magnesium hydride, MgH_2) 是一种新型高效的镁基

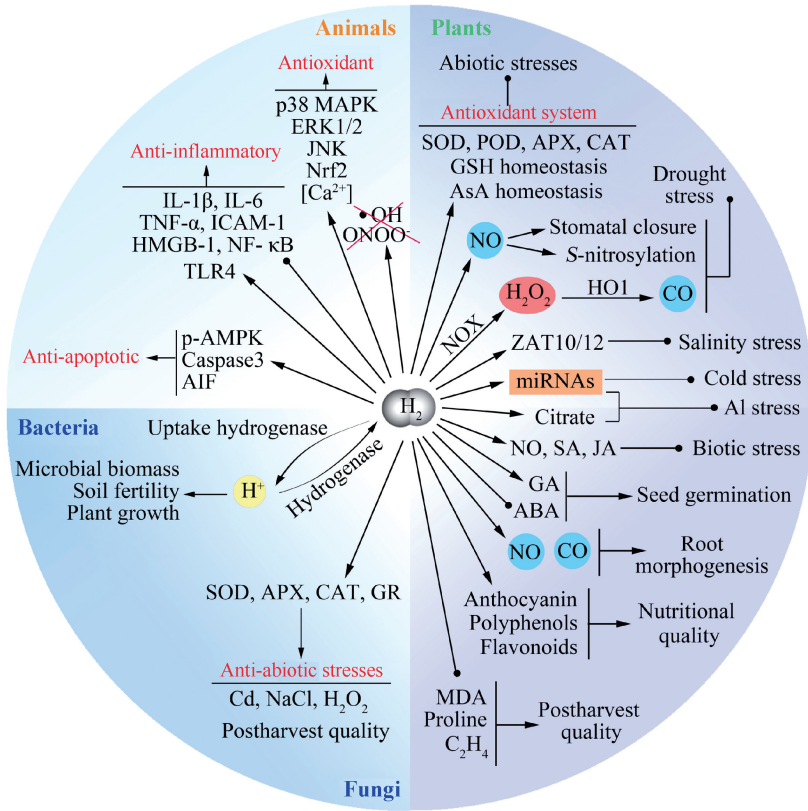


Fig.2 Possible mechanism related to physiological effects of hydrogen gas Arrow heads indicate positive regulation and solid-ball heads indicate negative regulation. ABA, abscisic acid; AIF, apoptosis inducing factor; APX, ascorbate peroxidase; AsA, ascorbic acid; C₂H₄, ethylene; CAT, catalase; CO, carbon monoxide; ERK1/2, extracellular signal-regulated protein kinase 1/2; GA, gibberellin; GSH, glutathione; HMGB-1, high-mobility group box protein 1; HO1, heme oxygenase 1; H₂O₂, hydrogen peroxide; ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; IL-1β, interleukin 1 beta; IL-6, interleukin 6; JA, jasmonic acid; JNK, c-Jun N-terminal kinase; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; MDA, malondialdehyde; NF-κB, nuclear factor kappa B; miRNA, microRNA; NO, nitric oxide; NOX, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase; Nrf2, nuclear factor-erythroid 2p45-related factor; p-AMPK, phosphorylated adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase; POD, guaiacol peroxidase; SA, salicylic acid; SOD, superoxide dismutase; TNF-α, tumor necrosis factor α; ZAT10/12, zinc-finger transcription factor 10/12

储氢材料,因其高储氢密度、质量轻、来源丰富和价格相对低廉,可能成为燃料电池的原料而备受关注。同时,MgH₂ 安全无毒,且稳定性较好,通过水解产生氢纳米气泡,并能够维持相对较长的时间^[86],因此可以作为氢生物学的潜在产氢材料。采用氢化镁混悬液喂施小鼠,发现其能减少氧化产物 4-羟基壬烯酸(4-hydroxynonenal,4-HNE)的产生,并调节 *Pgc-1α* 基因以及成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21,FGF21) 编码基因的表达,从而促进脂肪酸代谢和胆固醇代谢^[87]。另外,在喂施果蝇的食物中加入 MgH₂,发现其能够延长果蝇的寿命;同时喂食线粒体过氧化物酶低表达基因突变的果蝇,可以推迟其肠道功能障碍的发生,延长生存时间^[88]。Chao 等^[89]在反应体系中加入了柠檬酸作为催化剂和螯合剂,大大提高了 MgH₂ 的产氢率,使得

其比其他电解法更具有潜在的临床应用价值。

4.5 氢农学的现状及其分子机制

氢农学即结合采用生理生化、分子生物学、遗传学和组学等手段,研究氢农业相关规律的科学。从实施的对象看,氢农学还包括氢气微生物学效应、氢气植物学效应以及氢气动物学效应。由于氢农学还涉及新材料和新能源等,因此还具有综合性的特点。

与氢农学相对应的实践概念是氢农业,即运用 H₂ 或产氢材料,以富氢水或 H₂ 熏蒸等方式,提高农林牧副渔等相关产品产量以及品质的实践,其跨度可以从田间到餐桌,同时还涉及食品与营养学等学科^[90-94]。氢农业可以划分为设施园艺氢农业、大田氢农业、家庭氢农业等。由于氢农业也具有绿色和环保的特性,因此也是综合应用于种植业、畜牧业及水产业的一种新生态农业。

特别需要提出的是,人类大健康离不开动物、植物和微生物的健康。因此,分别属于理论与实践的氢农学和氢农业也是人类大健康的重要保障。

4.5.1 H_2 的微生物效应以及分子机理 H_2 是豆科植物根瘤菌固氮反应产物之一,豆科作物产生的 H_2 可以促进农作物轮作^[26]。 H_2 通过促进土壤有益微生物(如氢氧化细菌)的群落生长,从而改变微生物的群落结构。此外, H_2 还可以减缓土壤中有机质的降解速度,提高根际二氧化碳固定量。上述结果提示, H_2 可以增强土壤肥力,从而提高农作物产量。因此,科学家把土壤中发挥肥料作用的 H_2 称为“氢肥”^[8,26]。

此外,外源 H_2 通过降低脂质过氧化以及细胞内 ROS 水平,提高丙酮酸激酶活性,从而缓解非生物胁迫对真姬菇的伤害^[95]。 H_2 还能参与调节醋酸胁迫下灵芝的形态学变化、生长发育以及次生代谢,并与其对谷胱甘肽过氧化物酶的调节有关^[96]。外源 H_2 也可以提高真姬菇的采后品质,延长其货架期^[97]。

4.5.2 H_2 的植物学效应及其分子机理 H_2 的植物学效应包括提高植物对胁迫的抗/耐性、改善植物生长发育和营养品质,以及调控水果和花卉采后生理等。

4.5.2.1 H_2 提高植物对非生物胁迫的耐性

盐害、干旱、渗透胁迫、重金属污染以及极端温度等非生物胁迫是影响植物生长和发育的不利因素。已经知道, H_2 可以通过诱导气孔关闭来提高拟南芥耐旱性,采用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶基因的突变体材料,证实 NADPH 氧化酶催化合成的 ROS 是 H_2 提高耐旱性的下游信号分子^[21],这与氢医学选择性抗氧化机制存在明显的差异。另外,富氢水提高植物耐旱性部分来源于低氧^[21]。进一步的遗传学和药理学实验提示,依赖于硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)的一氧化氮(nitric oxide, NO)也参与了 H_2 提高植物的耐旱性^[21,98],同时还伴随着依赖于 NO 的蛋白质亚硝基化^[98]。与 NO 相类似,药理学实验发现依赖于血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的一氧化碳(carbon monoxide, CO)也是 H_2 提高苜蓿耐旱性的下游信号分子^[16]。外源 H_2 提高拟南芥耐盐性还涉及锌指转录因子(zinc-finger transcription factor 10/12, ZAT10/12)和抗氧化酶基因表达的上调,以

及重建细胞离子稳态^[99]。

来自于土壤和农化品的金属污染一直是农业生产中的问题。通过食物链,重金属污染还能严重影响人类健康。镉和汞是常见的环境污染物, H_2 可以降低镉和汞的积累,同时提高植物幼苗的抗氧化能力,减少 ROS 积累,从而缓解金属污染对幼苗生长的抑制^[100,101]。 H_2 缓解小白菜镉毒害可能与其对离子转运蛋白(IRT1 和 Nramp1)编码基因的调节有关^[102]。此外,铝对植物的最明显毒害是抑制根的生长,而 H_2 处理可以通过抑制苜蓿幼苗 NO 的合成,从而缓解铝胁迫引起的根生长抑制^[103]。此外, H_2 缓解铝胁迫对水稻种子萌发的抑制与调控 miRNA(*miR528*, *miR160a*, *miR398a* 和 *miR159a*)的表达有关^[104]。

冷害作为农业生产的不利环境因素,也会严重降低农作物的产量。研究证明, H_2 介导的水稻耐寒性与 miRNA(*miR398* 和 *miR319*)调控的氧化还原平衡有关^[105]。此外,能够诱导 ROS 爆发的百草枯引起的苜蓿幼苗氧化伤害能够被 H_2 所缓解,其中 HO-1/CO 信号系统是其下游信号分子^[16]。过量硼会影响植物生长, H_2 可以通过调控水通道蛋白基因的表达,降低水稻种子萌发及幼苗生长过程中的硼毒害^[106]。

4.5.2.2 H_2 提高植物对生物胁迫的抗性

属于生物胁迫范畴的植物病害是指植物在病原菌等生物因子的侵染下,产生阻碍其生长和发育,甚至死亡的病理表型。 H_2 可以调控与植物抗病有关的水杨酸(salicylic acid, SA)和 JA 受体蛋白基因的表达^[31]。此外, H_2 还通过提高多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性和 NO 含量来增强番茄果实对灰霉菌的抗性^[107]。

4.5.2.3 H_2 改善植物生长发育和营养品质

早在 1964 年,就有研究发现 H_2 能够促进黑麦种子的萌发^[4]。近年来的研究发现, H_2 预处理显著缓解盐害对水稻种子萌发以及幼苗生长的抑制^[108]。进一步研究发现, H_2 提高铝胁迫下水稻种子的萌发率与其能抑制 ABA 的合成以及提高赤霉素(gibberellin, GA)含量有关^[104]。

侧根和不定根发生对于植物生长发育、无性繁殖以及园艺生产具有重要意义。生长素诱导番茄和拟南芥侧根发生与其能提高 H_2 产生有关,而且依赖于 NR 催化产生的 NO 是其下游信号分子^[33]。 H_2 可以缓解生长素极性运输受抑导致的黄瓜外植体不定根发生的抑制,提示 H_2 可能与生长素信号转导

有关^[33]。CO 还参与了干旱胁迫下 H₂ 介导的黄瓜不定根发生^[109]。与 CO 相类似,NO 也可能作为 H₂ 的下游信号分子从而参与 H₂ 诱导的黄瓜不定根发生^[110,111]。此外,H₂ 还可以促进万寿菊和猪笼草的不定根发生^[90,91]。

H₂ 还可以提高蔬菜的营养品质。富氢水可以提高 UV-A 下萝卜芽苗菜的花青素和多酚的积累,且前者的积累是通过提高花青素合成酶基因表达来实现的^[112]。转录组分析结果提示,上述效应与 H₂ 调控转录因子表达有关^[113]。H₂ 还可以提高 UV-B 下苜蓿幼苗的类黄酮含量^[114]。最近的研究证实,外源 H₂ 可以提高发芽黑大麦营养物质含量和抗氧化能力^[115]。

4.5.2.4 H₂ 调控水果和花卉采后生理

水果和花卉在采后储藏和销售过程中易失水萎蔫、腐烂和变质,从而营养品质降低。与传统保鲜技术相比,低浓度的 H₂ 作为保鲜剂具有安全、无毒和无污染的特性。例如,H₂ 可以提高超氧化物歧化酶活性维持较低的 ROS 水平,从而延长猕猴桃货架期^[92]。此外,H₂ 通过抑制乙烯合成相关酶活性以及降低乙烯释放量,延缓猕猴桃的成熟和衰老^[34]。与水果采后保鲜相类似,鲜切花保鲜也是另外的一个研究热点。H₂ 可以通过保持水分平衡和膜稳定性,以及降低叶绿素分解和细胞膜损伤,从而延缓百合和玫瑰鲜切花的衰老^[93,94]。另外,H₂ 可以延长香石竹切花的盛开期^[116]。最近的研究证实,内源 H₂ 延缓采后洋桔梗鲜切花衰老与其能够提高切花抗氧化能力有关^[35]。

4.5.3 H₂ 的动物效应及其分子机理 动物消化道厌氧细菌能够产生内源 H₂^[3,117],暗示其在动物体内可能有独特的生理效应。最近的研究显示,H₂ 能够缓解镰刀菌真菌毒素对猪仔胃肠道菌群稳态和多样性的破坏作用,降低真菌毒素诱导的氧化应激、细胞凋亡和肠道渗漏,最终改善镰刀菌真菌毒素对猪仔生长的抑制^[118-120]。H₂ 通过降低氧化应激,从而缓解猪肝脏缺血和肝切除后的损伤^[121,122]。此外,可产生 H₂ 的金属镁也能影响山羊胃部菌群的组成和代谢^[123]。总体而言,上述研究结果为后续 H₂ 在畜牧中的实际利用提供了部分理论依据。

必须指出的是,有关氢农学中使用的 H₂ 浓度远低于爆炸范围,因此具有较高的安全性。

5 氢气生物学的若干重要的科学和实践问题的展望

迄今为止,氢气生物学发展已经逐渐呈现医学、

农学、化学、材料学和营养学等多学科的交叉和融合发展的趋势。例如,欧盟、日本和中国均明确规定 H₂ 可以作为食品添加剂;金属镁和氢化镁钙就可以作为口服产氢的方法^[88]。不过,氢气生物学还存在不少重要的科学问题,诸如:1) H₂ 在生命进化过程中的作用和地位? 2) H₂ 是否是健康的必要条件? 3) H₂ 参与菌群调控的方式? 4) 肠道细菌产氢和寿命的关系? 5) H₂ 和重要人类疾病如糖尿病、动脉硬化和癌症的关系? 6) H₂ 在高等生命体内代谢规律? 例如,高等动物细胞是否能合成 H₂? 植物是如何产生并释放 H₂? 高等动植物细胞是否能分解和利用 H₂? H₂ 是否参与或调节基本的生化代谢? H₂ 是否对酶和蛋白质具有直接的调控作用? 其具体的生物化学机制是什么? 7) H₂ 是否存在生物效应饱和现象? 8) 以富氢水和富氢生理盐水供氢时,如何排除低氧生物学效应的干扰? 9) H₂ 细胞学研究技术,例如开发 H₂ 特异的细胞学研究探针,这对于研究 H₂ 在生物体中的运输途径、以及氢生物学效应的可能受体以及直接的靶酶(靶蛋白)是至关重要的。

同样,氢气生物学的实践也存在不少问题,其中相关的给氢方式和费效比,以及制氢装置与设备的市场定位与准入均是具有挑战性的课题,这需要氢气工业利用领域的力量来参与。目前,广东佛山和云浮、江苏如皋和张家港、以及浙江台州等均有相关的氢能产业园或氢能小镇,如何把相关的加氢站或氢气管道运用于氢农业值得进一步的探索和实践;同时,也应该重视相关的国际和国内专利群的申请。由于广大科学界以及公众对氢气生物学还存在一定程度的认知偏差与误解,因此亟待在相关机理的研究中取得重大突破。尤其重要的是,氢医学的进一步发展还依赖于大量且可信度高的临床试验;氢农业有待于开展并完成多年多点的大规模田间试验以及相关的推广与示范工作。针对目前的氢农业,建议应该紧密围绕高附加值农业(高端水果、蔬菜和中药材以及特种养殖业等)来展开。

致谢 感谢《中国生物化学与分子生物学报》对本领域的重视,感谢尚伟芬编辑的邀约! 感谢深圳大学何前军教授、山东第一医科大学秦树存教授、北京工业大学马雪梅教授、空军军医大学张作明教授、西安交通大学刘健康教授和南京医科大学冯晴教授提供相关资料或对拙稿提出宝贵意见。

参考文献 (References)

[1] Dresselhaus MS, Thomas IL. Alternative energy technologies[J].

- Nature, 2001, **414**(6861): 332-337
- [2] Gaffron H. Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae[J]. Nature, 1939, **143** (3614): 204-205
- [3] Czerkawski JW. Fate of metabolic hydrogen in the rumen[J]. Proc Nutr Soc, 1972, **31**(2): 141-146
- [4] Renwick GM, Giumarro C, Siegel SM. Hydrogen metabolism in higher plants[J]. Plant Physiol, 1964, **39**(3): 303-306
- [5] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, *et al.* Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. Nat Med, 2007, **13**(6): 688-694
- [6] 卢宏涛, 孙学军. 氢气医学研究的进展、争议和挑战[J]. 第二军医大学学报(Lu HT, Sun XJ. Hydrogen medicine: research advance, controversy and challenges[J]. Acad J Second Mil Med Univ), 2018, **39**(11): 1181-1187
- [7] 沈文飏, 苏久广, 孙学军. 氢气植物学效应的研究进展[J]. 南京农业大学学报(Shen W, Su J, Sun X, Research progress in the botanical effects of hydrogen gas[J]. J Nanjing Agric Univ), 2018, **41**(3): 392-401
- [8] Dong Z, Wu L, Kettlewell B, *et al.* Hydrogen fertilization of soils-is this a benefit of legumes in rotation? [J]. Plant Cell Environ, 2003, **26**(11): 1875-1879
- [9] 刘方, 刘勇波, 李俊生, 等. 氢气在植物抗胁迫中的作用[J]. 植物生理学报(Liu F, Liu YB, Li JS, *et al.* The role of hydrogen in plant stress tolerance[J]. Plant Physiol J), 2015, **51**(2): 141-152
- [10] Ueda Y, Nakajima A, Oikawa T. Hydrogen-related enhancement of in vivo antioxidant ability in the brain of rats fed coral calcium hydride[J]. Neurochem Res, 2010, **35**(10): 1510-1515
- [11] Dole M, Wilson FR, Fife WP. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer[J]. Science, 1975, **190**(4210): 152-154
- [12] Bari ML, Sabina Y, Isobe S, *et al.* Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* enteritidis, and *Listeria monocytogenes* on the surfaces of tomatoes[J]. J Food Protect, 2003, **66**(4): 542-548
- [13] Shirahata S, Li Y, Hamasaki T, *et al.* Cell technology for cell products[M]. Dordrecht: Springer, 2007
- [14] Yanagihara T, Arai K, Miyamae K, *et al.* Electrolyzed hydrogen-saturated water for drinking use elicits an antioxidative effect: a feeding test with rats[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, **69**(10): 1985-1987
- [15] Ono H, Nishijima Y, Adachi N, *et al.* A basic study on molecular hydrogen (H_2) inhalation in acute cerebral ischemia patients for safety check with physiological parameters and measurement of blood H_2 level[J]. Med Gas Res, 2012, **2**(1): 21
- [16] Jin Q, Zhu K, Cui W, *et al.* Hydrogen gas acts as a novel bioactive molecule in enhancing plant tolerance to paraquat-induced oxidative stress via the modulation of heme oxygenase-1 signalling system[J]. Plant Cell Environ, 2013, **36**(5): 956-969
- [17] 张兴磊, 花榕, 陈双喜, 等. 低浓度氢气检测方法研究进展[J]. 分析仪器(Zhang X, Hua R, Chen S, *et al.* Progress of research on detection methods of trace hydrogen[J]. Anal Instrum), 2009, **2009**(5): 6-12
- [18] 侯长军, 范小花, 唐一科, 等. 氢敏材料与器件的研究进展[J]. 材料科学与工程学报(Hou C, Fan X, Tang Y, *et al.* Development of hydrogen sensitive materials and hydrogen sensors[J]. J Mater Sci Eng), 2007, **25**(3): 471-475
- [19] Nakashima-Kamimura N, Mori T, Ohsawa I, *et al.* Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anti-cancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, **64**(4): 753-761
- [20] Sun H, Chen L, Zhou W, *et al.* The protective role of hydrogen-rich saline in experimental liver injury in mice[J]. J Hepatol, 2011, **54**(3): 471-480
- [21] Xie Y, Mao Y, Zhang W, *et al.* Reactive oxygen species-dependent nitric oxide production contributes to hydrogen-promoted stomatal closure in Arabidopsis[J]. Plant Physiol, 2014, **165**(2): 759-773
- [22] Seo T, Kurokawa R, Sato B. A convenient method for determining the concentration of hydrogen in water: use of methylene blue with colloidal platinum[J]. Med Gas Res, 2012, **2**: 1
- [23] Kamaya M, Ozawa N, Maete Y. Spectrophotometric determination of hydrogen molecule in drinking water with *o*-phenanthroline in the presence of colloidal platinum[J]. J Environ Eng Sci, 2018, **7**: 209-214
- [24] Gaffron H, Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae[J]. J Gen Physiol, 1942, **26**(2): 219-240
- [25] Khanna N, Lindblad P. Cyanobacterial hydrogenases and hydrogen metabolism revisited: recent progress and future prospects[J]. Int J Mol Sci, 2015, **16**(5): 10537-10561
- [26] Golding AL, Dong Z. Hydrogen production by nitrogenase as a potential crop rotation benefit[J]. Environ Chem Lett, 2010, **8**(2): 101-121
- [27] 刘丰娇, 蔡冰冰, 孙胜楠, 等. 富氢水浸种增强黄瓜幼苗耐冷性的作用及其生理机制[J]. 中国农业科学(Liu FJ, Cai BB, Sun SN, *et al.* Effect of hydrogen-rich water soaked cucumber seeds on cold tolerance and its physiological mechanism in cucumber seedlings[J]. Sci Agric Sin), 2017, **50**(5): 881-889
- [28] Chen Q, Zhao X, Lei D, *et al.* Hydrogen-rich water pretreatment alters photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant activities in heat-stressed cucumber leaves[J]. Plant Growth Regul, 2017, **83**(1): 69-82
- [29] Chen Y, Wang M, Hu L, *et al.* Carbon monoxide is involved in hydrogen gas-induced adventitious root development in cucumber under simulated drought stress[J]. Front Plant Sci, 2017, **8**: 128
- [30] Jin Q, Cui W, Dai C, *et al.* Involvement of hydrogen peroxide and heme oxygenase-1 in hydrogen gas-induced osmotic stress tolerance in alfalfa[J]. Plant Growth Regul, 2016, **80**(2): 215-223
- [31] Zeng J, Zhang M, Sun X. Molecular hydrogen is involved in phytohormone signaling and stress responses in plants[J]. PLoS One, 2013, **8**(8): e71038
- [32] Cui W, Gao C, Fang P, *et al.* Alleviation of cadmium toxicity in *Medicago sativa* by hydrogen-rich water[J]. J Hazard Mater, 2013, **260**: 715-724
- [33] Cao Z, Duan X, Yao P, *et al.* Hydrogen gas is involved in auxin-induced lateral root formation by modulating nitric oxide synthesis[J]. Int J Mol Sci, 2017, **18**(10): pii: E2084
- [34] Hu H, Zhao S, Li P, *et al.* Hydrogen gas prolongs the shelf life of kiwifruit by decreasing ethylene biosynthesis[J]. Postharvest Biol Tech, 2018, **135**: 123-130
- [35] Su J, Nie Y, Zhao G, *et al.* Endogenous hydrogen gas delays petal senescence and extends the vase life of lisianthus cut flowers[J]. Postharvest Biol Tech, 2019, **147**: 148-155
- [36] Zhao L, Wang YB, Qin SR, *et al.* Protective effect of hydrogen-rich saline on ischemia/reperfusion injury in rat skin flap[J]. J Zhejiang Univ-Sci B, 2013, **14**(5): 382-391
- [37] Liu YQ, Liu YF, Ma XM, *et al.* Hydrogen-rich saline attenuates skin ischemia/reperfusion induced apoptosis via regulating Bax/Bcl-2 ratio and ASK-1/JNK pathway[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2015, **68**(7): e147-e156
- [38] Saitoh Y, Okayasu H, Xiao L, *et al.* Neutral pH hydrogen-enriched electrolyzed water achieves tumor-preferential clonal growth inhibition over normal cells and tumor invasion inhibition concurrently with intracellular oxidant repression[J]. Oncol Res, 2008, **17**(6): 247-255
- [39] Du Z, Jia H, Liu J, *et al.* Protective effects of hydrogen-rich saline in uncontrolled hemorrhagic shock[J]. Exp Ther Med, 2014, **7**(5): 1253-1258
- [40] Fu Y, Ito M, Fujita Y, *et al.* Molecular hydrogen is protective against 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal degeneration in a rat model of Parkinson's disease[J]. Neurosci Lett, 2009, **453**(2): 81-85

- [41] Hou C, Peng Y, Qin C, *et al.* Hydrogen-rich water improves cognitive impairment gender-dependently in APP/PS1 mice without affecting A β clearance[J]. *Free Radic Res*, 2018, **52** (11-12): 1311-1322
- [42] Song G, Tian H, Qin S, *et al.* Hydrogen decreases atherosusceptibility in apolipoprotein B-containing lipoproteins and aorta of apolipoprotein E knockout mice[J]. *Atherosclerosis*, 2012, **221**(1): 55-65
- [43] Shen M, Zhang H, Yu C, *et al.* A review of experimental studies of hydrogen as a new therapeutic agent in emergency and critical care medicine[J]. *Med Gas Res*, 2014, **4**: 17
- [44] Ono H, Nishijima Y, Adachi N, *et al.* 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[J]. *Med Gas Res*, 2011, **1**(1): 12
- [45] Ono H, Nishijima Y, Ohta S, *et al.* Hydrogen gas inhalation treatment in acute cerebral infarction: a randomized controlled clinical study on safety and neuroprotection[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2017, **26**(11): 2587-2594
- [46] Katsumata Y, Sano F, Abe T, *et al.* The effects of hydrogen gas inhalation on adverse left ventricular remodeling after percutaneous coronary intervention for ST-elevated myocardial infarction-first pilot study in humans[J]. *Circ J*, 2017, **81**(7): 940-947
- [47] Tamura T, Hayashida K, Sano M, *et al.* Efficacy of inhaled HYdrogen on neurological outcome following BRain Ischemia During post-cardiac arrest care (HYBRID II trial): study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*, 2017, **18** (1): 488
- [48] Kajiyama S, Hasegawa G, Asano M, *et al.* Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance[J]. *Nutr Res*, 2008, **28**(3): 137-143
- [49] Yoritaka A, Takanashi M, Hirayama M, *et al.* Pilot study of H₂ therapy in Parkinson's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial[J]. *Mov Disord*, 2013, **28**(6): 836-839
- [50] Nishimaki K, Asada T, Ohsawa I, *et al.* Effects of molecular hydrogen assessed by an animal model and a randomized clinical study on mild cognitive impairment[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2018, **15**(5): 482-492
- [51] Song G, Lin Q, Zhao H, *et al.* Hydrogen activates ATP-binding cassette transporter a1-dependent efflux ex vivo and improves high-density lipoprotein function in patients with hypercholesterolemia: a double-blinded, randomized, and placebo-controlled trial[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, **100** (7): 2724-2733
- [52] Akagi J, Baba H. Hydrogen gas restores exhausted CD8⁺ T cells in patients with advanced colorectal cancer to improve prognosis[J]. *Oncol Rep*, 2019, **41**(1): 301-311
- [53] Kang KM, Kang YN, Choi IB, *et al.* Effects of drinking hydrogen-rich water on the quality of life of patients treated with radiotherapy for liver tumors[J]. *Med Gas Res*, 2011, **1**(1): 11
- [54] Yang Q, Ji G, Pan R, *et al.* Protective effect of hydrogen-rich water on liver function of colorectal cancer patients treated with mFOLFOX6 chemotherapy[J]. *Mol Clin Oncol*, 2017, **7**(5): 891-896
- [55] Hirano S, Aoki Y, Kurokawa R, *et al.* Hydrogen gas inhalation alleviates radiation-induced bone marrow damage in cancer patients[J]. 2019, Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3349228>
- [56] Zhu Q, Wu Y, Li Y, *et al.* Positive effects of hydrogen-water bathing in patients of psoriasis and parapsoriasis en plaques[J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 8051
- [57] Kato S, Saitoh Y, Iwai K, *et al.* 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]. *J Photochem Photobiol B*, 2012, **106**: 24-33.
- [58] 王锦玲, 骆宁. 富氢水浸浴治疗烧伤患者面部色素沉着疗效观察[J]. *中国临床实用医学* (Wang J, Luo N. Observation on the curative effect of hydrogen-rich immersion bath on facial pigmentation in burn patients[J]. *China Clin Pract Med*), 2015, **6**(3): 67-68
- [59] Ostojic SM. Molecular hydrogen in sports medicine: new therapeutic perspectives[J]. *Int J Sports Med*, 2015, **36**(4): 273-279
- [60] Tian L, Zhang L, Xia F, *et al.* Hydrogen-rich saline ameliorates the retina against light-induced damage in rats[J]. *Med Gas Res*, 2013, **3**(1): 19
- [61] Qi LS, Yao L, Liu W, *et al.* Sirtuin type 1 mediates the retinal protective effect of hydrogen-rich saline against light-induced damage in rats[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015, **56**(13): 8268-8279
- [62] Chen T, Tao Y, Yan W, *et al.* Protective effects of hydrogen-rich saline against N-methyl-N-nitrosourea- induced photoreceptor degeneration[J]. *Exp Eye Res*, 2016, **148**: 65-73
- [63] Yan WM, Chen T, Wang XC, *et al.* The reason for the amelioration of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinitis pigmentosa in rats by hydrogen-rich saline[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, **10**(10): 1495-1503
- [64] Long P, Yan W, He M, *et al.* Protective effects of hydrogen gas in a rat model of branch retinal vein occlusion via decreasing VEGF- α expression[J]. *BMC Ophthalmol*, 2019, **19** (1): 112
- [65] 殷浩, 朱婷婷, 安晶, 等. 氢饱和生理盐水对视神经挫伤大鼠闪光 VEP 的影响[J]. *眼科* (Yin H, Zhu TT, An J, *et al.* Effect of hydrogen-rich saline on flash-VEP after the optic nerve crush in rats[J]. *Ophthalmol Chin*), 2012, **21**(6): 409-413
- [66] Yan W, Chen T, Long P, *et al.* Effects of post-treatment hydrogen gas inhalation on uveitis induced by endotoxin in rats[J]. *Med Sci Monit*, 2018, **24**: 3840-3847
- [67] Yan WM, Zhang L, Chen T, *et al.* Effects of hydrogen-rich saline on endotoxin-induced uveitis[J]. *Med Gas Res*, 2017, **7** (1): 9-18
- [68] Zhang Q, Tao Y, Zhang ZM. Hydrogen-rich saline is ineffective in oxygen-induced retinopathy[J]. *Life Sci*, 2016, **153**: 17-22
- [69] Kawamura T, Wakabayashi N, Shigemura N, *et al.* Hydrogen gas reduces hyperoxic lung injury via the Nrf2 pathway in vivo[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, **304** (10): L646-L656
- [70] Guo SX, Fang Q, You CG, *et al.* Effects of hydrogen-rich saline on early acute kidney injury in severely burned rats by suppressing oxidative stress induced apoptosis and inflammation[J]. *J Transl Med*, 2015, **13**: 183
- [71] Han B, Zhou H, Jia G, *et al.* MAPKs and Hsc70 are critical to the protective effect of molecular hydrogen during the early phase of acute pancreatitis[J]. *FEBS J*, 2016, **283**(4): 738-756
- [72] Xin HG, Zhang BB, Wu ZQ, *et al.* Consumption of hydrogen-rich water alleviates renal injury in spontaneous hypertensive rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, **392**(1-2): 117-124
- [73] Li J, Dong Y, Chen H, *et al.* Protective effects of hydrogen-rich saline in a rat model of permanent focal cerebral ischemia via reducing oxidative stress and inflammatory cytokines[J]. *Brain Res*, 2012, **1486**: 103-111
- [74] Song G, Tian H, Liu J, *et al.* H₂ inhibits TNF- α -induced lectin-like oxidized LDL receptor-1 expression by inhibiting nuclear factor κ B activation in endothelial cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2011, **33**(9): 1715-1722
- [75] Matei N, Camara R, Zhang JH. Emerging mechanisms and novel applications of hydrogen gas therapy[J]. *Med Gas Res*, 2018, **8** (3): 98-102
- [76] Liu GD, Zhang H, Wang L, *et al.* Molecular hydrogen regulates the expression of miR-9, miR-21 and miR-199 in LPS-activated retinal microglia cells[J]. *Int J Ophthalmol*, 2013, **6**(3): 280-285
- [77] Runtuwene J, Amitani H, Amitani M, *et al.* Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer[J].

- Peer J, 2015, **3**: e859
- [78] Wu Y, Yuan M, Song J, *et al.* Hydrogen gas from inflammation treatment to cancer therapy [J]. ACS Nano, 2019, **13** (8): 8505-8511
- [79] Zhou G, Goshi E, He Q. Micro/nanomaterials-augmented hydrogen therapy [J]. Adv Healthc Mater, 2019, **8** (16): e1900463
- [80] Zhao P, Jin Z, Chen Q, *et al.* Local generation of hydrogen for enhanced photothermal therapy [J]. Nat Commun, 2018, **9** (1): 4241
- [81] Kou Z, Zhao P, Wang Z, *et al.* Acid-responsive H₂-releasing Fe nanoparticles for safe and effective cancer therapy[J]. J Mater Chem B, 2019, **7**(17): 2759-2765
- [82] Yang T, Jin Z, Wang Z, *et al.* Intratumoral high-payload delivery and acid-responsive release of H₂ for efficient cancer therapy using the ammonia borane-loaded mesoporous silica nanomedicine [J]. Appl Mater Today, 2018, **11**: 136-143
- [83] Zhou G, Wang Y, Jin Z, *et al.* Porphyrin-palladium hydride MOF nanoparticles for tumor-targeting photoacoustic imaging-guided hydrogenothermal cancer therapy[J]. Nanoscale Horiz, 2019, **4**: 1185-1193
- [84] Wan WL, Lin YJ, Chen HL, *et al.* In situ nanoreactor for photosynthesizing H₂ gas to mitigate oxidative stress in tissue inflammation [J]. J Am Chem Soc, 2017, **139** (37): 12923-12926
- [85] Fan M, Wen Y, Ye D, *et al.* Acid-responsive H₂-releasing 2D MgB₂ nanosheet for therapeutic synergy and side effect attenuation of gastric cancer chemotherapy[J]. Adv Healthc Mater, 2019, **8** (13): e1900157
- [86] Xia G, Zhang L, Chen X, *et al.* Carbon hollow nanobubbles on porous carbon nanofibers: An ideal host for high-performance sodium-sulfur batteries and hydrogen storage[J]. Energy Storage Mater, 2018, **14**: 314-323
- [87] Kamimura N, Ichimiya H, Iuchi K, *et al.* Molecular hydrogen stimulates the gene expression of transcriptional coactivator PGC-1 α to enhance fatty acid metabolism[J]. NPJ Aging Mech Dis, 2016, **2**: 16008
- [88] Klichko VI, Safonov VL, Safonov MY, *et al.* Supplementation with hydrogen-producing composition confers beneficial effects on physiology and life span in *Drosophila* [J]. Heliyon, 2019, **5** (5): e01679
- [89] Chao CH. Clinical applications of magnesium hydride. 2018, doi: 10.5772/intechopen.79507
- [90] Zhu Y, Liao W. The metabolic constituent and rooting-related enzymes responses of marigold explants to hydrogen gas during adventitious root development [J]. Theor Exp Plant Physiol, 2017, **29**(2): 77-85
- [91] Wang Y, Wei C. Effect of hydrogen-rich water concentration on rooting of nepenthes [J]. Mod Agric Sci Technol, 2016, **14**: 136-137
- [92] Hu H, Li P, Wang Y, *et al.* Hydrogen-rich water delays postharvest ripening and senescence of kiwifruit [J]. Food Chem, 2014, **156**: 100-109
- [93] 任鹏举, 李雪萍, 徐晓婷, 等. 氢气对切花百合瓶插寿命和品质的影响[J]. 甘肃农业大学学报 (Ren P, Li X, Xu X, *et al.* Effects of hydrogen gas on vase life and quality of cut lily[J]. J Gansu Agric Univ), 2017, **52**(1): 103-108
- [94] Ren P, Jin X, Liao W, *et al.* Effect of hydrogen-rich water on vase life and quality in cut lily and rose flowers [J]. Hortic Environ Biotechnol, 2017, **58**(6): 576-584
- [95] Zhang J, Hao H, Chen M, *et al.* Hydrogen-rich water alleviates the toxicities of different stresses to mycelial growth in *Hypsizygus marmoreus*[J]. AMB Express, 2017, **7**(1): 107
- [96] Ren A, Liu R, Miao ZG, *et al.* Hydrogen-rich water regulates effects of ROS balance on morphology, growth and secondary metabolism via glutathione peroxidase in *Ganoderma lucidum*[J]. Environ Microbiol, 2017, **19**(2): 566-583
- [97] Chen H, Zhang J, Hao H, *et al.* Hydrogen-rich water increases postharvest quality by enhancing antioxidant capacity in *Hypsizygus marmoreus*[J]. AMB Express, 2017, **7**(1): 221
- [98] Su J, Zhang Y, Nie Y, *et al.* Hydrogen-induced osmotic tolerance is associated with nitric oxide-mediated proline accumulation and reestablishment of redox balance in alfalfa seedlings[J]. Environ Exp Bot, 2018, **147**: 249-260
- [99] Xie Y, Mao Y, Lai D, *et al.* H₂ enhances Arabidopsis salt tolerance by manipulating ZAT10/12-mediated antioxidant defence and controlling sodium exclusion[J]. PLoS One, 2012, **7**(11): e49800
- [100] Dai C, Cui W, Pan J, *et al.* Proteomic analysis provides insights into the molecular bases of hydrogen gas-induced cadmium resistance in *medicago sativa* [J]. J Proteomics, 2017, **152**: 109-120
- [101] Cui W, Fang P, Zhu K, *et al.* Hydrogen-rich water confers plant tolerance to mercury toxicity in alfalfa seedlings [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2014, **105**: 103-111
- [102] Wu Q, Su N, Cai J, *et al.* Hydrogen-rich water enhances cadmium tolerance in Chinese cabbage by reducing cadmium uptake and increasing antioxidant capacities[J]. J Plant Physiol, 2015, **175**: 174-182
- [103] Chen M, Cui W, Zhu K, *et al.* Hydrogen-rich water alleviates aluminum-induced inhibition of root elongation in alfalfa via decreasing nitric oxide production [J]. J Hazard Mater, 2014, **267**: 40-47
- [104] Xu D, Cao H, Fang W, *et al.* Linking hydrogen-enhanced rice aluminum tolerance with the reestablishment of GA/ABA balance and miRNA-modulated gene expression: a case study on germination [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2017, **145**: 303-312
- [105] Xu S, Jiang Y, Cui W, *et al.* Hydrogen enhances adaptation of rice seedlings to cold stress via the reestablishment of redox homeostasis mediated by miRNA expression [J]. Plant Soil, 2017, **414**(1-2): 53-67
- [106] Wang Y, Duan X, Xu S, *et al.* Linking hydrogen-mediated boron toxicity tolerance with improvement of root elongation, water status and reactive oxygen species balance: a case study for rice [J]. Ann Bot, 2016, **118**(7): 1279-1291
- [107] 卢慧, 伍冰倩, 王伊帆, 等. 富氢水处理对采后番茄果实灰霉病抗性的影响[J]. 河南农业科学 (Lu H, Wu B, Wang Y, *et al.* Effects of hydrogen-rich water treatment on defense responses of postharvest tomato fruit to *Botrytis cinerea* [J]. J Henan Agric Sci), 2017, **46**(2): 64-68
- [108] Xu S, Zhu S, Jiang Y, *et al.* Hydrogen-rich water alleviates salt stress in rice during seed germination[J]. Plant Soil, 2013, **370** (1-2): 47-57
- [109] Zhu Y, Liao W. A positive role for hydrogen gas in adventitious root development [J]. Plant Signal Behav, 2016, **11** (6): e1187359
- [110] Zhu Y, Liao W, Wang M, *et al.* Nitric oxide is required for hydrogen gas-induced adventitious root formation in cucumber [J]. J Plant Physiol, 2016, **195**: 50-58
- [111] Zhu Y, Liao W, Niu L, *et al.* Nitric oxide is involved in hydrogen gas-induced cell cycle activation during adventitious root formation in cucumber[J]. BMC Plant Biol, 2016, **16**(1): 146
- [112] Su N, Wu Q, Liu Y, *et al.* Hydrogen-rich water reestablishes ROS homeostasis but exerts differential effects on anthocyanin synthesis in two varieties of radish sprouts under UV-A irradiation [J]. J Agric Food Chem, 2014, **62**(27): 6454-6462
- [113] Zhang X, Su N, Jia L, *et al.* Transcriptome analysis of radish sprouts hypocotyls reveals the regulatory role of hydrogen-rich water in anthocyanin biosynthesis under UV-A [J]. BMC Plant Biol, 2018, **18**(1): 227
- [114] Xie YJ, Zhang W, Duan XL, *et al.* Hydrogen-rich water-alleviated ultraviolet-B-triggered oxidative damage is partially associated with the manipulation of the metabolism of (iso) flavonoids and antioxidant defence in *medicago sativa*[J]. Funct Plant Biol, 2015, **42**(12): 1141-1157
- [115] Guan Q, Ding XW, Jiang R, *et al.* Effects of hydrogen-rich water on the nutrient composition and antioxidative characteristics of sprouted black barley[J]. Food Chem, 2019, **299**: 125095

[116] 蔡敏, 杜红梅. 富氢水预处理对香石竹切花瓶插寿命的影响 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版) (Cai M, Du HM. Effects of hydrogen-rich water pretreatment on vase life of carnation (*Dianthus caryophyllus*) cut flowers [J]. J Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci)), 2015, **33**(6): 41-45

[117] Olson JW, Maier RJ. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori* [J]. Science, 2002, **298**(5599): 1788-1790

[118] Zheng W, Ji X, Zhang Q, *et al.* Hydrogen-rich water and lactulose protect against growth suppression and oxidative stress in female piglets fed fusarium toxins contaminated diets [J]. Toxins (Basel), 2018, **10**(6).pii: E228

[119] Zheng W, Ji X, Zhang Q, *et al.* Intestinal microbiota ecological response to oral administrations of hydrogen-rich water and lactulose in female piglets fed a fusarium toxin-contaminated diet [J]. Toxins (Basel), 2018, **10**(6).pii: E 246

[120] Ji X, Zhang Q, Zheng W, *et al.* Morphological and molecular response of small intestine to lactulose and hydrogen-rich water in female piglets fed fusarium mycotoxins contaminated diet [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2019, **10**: 9

[121] Zhang Q, Ge Y, Li H, *et al.* Effect of hydrogen-rich saline on apoptosis induced by hepatic ischemia reperfusion upon laparoscopic hepatectomy in miniature pigs [J]. Res Vet Sci, 2018, **119**: 285-291

[122] Ge YS, Zhang QZ, Li H, *et al.* Hydrogen-rich saline protects against hepatic injury induced by ischemia-reperfusion and laparoscopic hepatectomy in swine [J]. Hepatobiliary Pancreatic Dis Int, 2019, **18**(1): 48-61

[123] Wang M, Wang R, Zhang X, *et al.* Molecular hydrogen generated by elemental magnesium supplementation alters rumen fermentation and microbiota in goats [J]. Br J Nutr, 2017, **118** (6): 401-410