

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.09.1082

富氢水对结直肠癌荷瘤小鼠肿瘤的生长抑制作用及其机制

张 瑶¹, 姜 婧¹, 周海玥¹, 蒋 芮¹, 李雅婷¹, 宋立华^{1,2*}

1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

2. 上海交通大学陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240

[摘要] **目的** 初步探讨富氢水(hydrogen-rich water, [H]H₂O)对结直肠癌荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用及其机制。**方法** 小鼠右腋下接种人结直肠癌 SW480 细胞(4×10⁶/只), 建立移植瘤小鼠模型, 造模的同时给予小鼠自由饮用富氢水(0.8 mg/kg), 每日早、中、晚 3 次更换新鲜富氢水。对照组给予普通水。荷瘤 28 d 后处死小鼠, 取肿瘤组织, 通过检测肿瘤体积和质量判断肿瘤的生长情况。用免疫组化法检测肿瘤组织中 Ki-67 蛋白的表达, TUNEL 法检测细胞凋亡情况, 比色法检测谷胱甘肽(GSH)及氧化型谷胱甘肽(GSSG)水平, 基因芯片和 qRT-PCR 方法筛选并验证差异表达基因。**结果** 与对照组相比, 富氢水干预后可抑制小鼠肿瘤的形成, 减小肿瘤体积和质量($P<0.01$, $P<0.05$), 降低 Ki-67 蛋白的表达($P<0.05$), 促进细胞凋亡($P<0.05$), 增高 GSSG/GSH 比值($P<0.05$); 富氢水干预可调节 γ -干扰素(IFN- γ)相关基因的表达。**结论** 在结直肠癌中, 富氢水可通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡、调节细胞内氧化还原环境及 IFN- γ 相关基因的表达而发挥抗肿瘤活性作用。

[关键词] 氢; 结直肠癌; 细胞凋亡; 氧化性应激; γ -干扰素相关基因

[中图分类号] R 735.3

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2016)09-1082-06

Inhibitory effects of hydrogen-rich water against tumor growth in tumor-bearing mice with colorectal cancer and the molecular mechanisms

ZHANG Yao¹, JIANG Jing¹, ZHOU Hai-yue¹, JIANG Rui¹, LI Ya-ting¹, SONG Li-hua^{1,2*}

1. College of Agricultural and Biological Sciences, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

2. Bor S. Luh Food Safety Research Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effects of hydrogen-rich water ([H]H₂O) against tumor growth in mice with colorectal cancer and the related molecular mechanisms. **Methods** Mice were vaccinated with SW480 cells suspension (4×10⁶ cells/mice) to establish mouse model of colon cancer. The mice in [H]H₂O intervention group were freely allowed to drink [H]H₂O (0.8 mg/kg), which was refreshed three times daily, and the mice in control group were given light water. The tumor weight and volume were measured 28 d after bearing tumor to assess tumor growth, the expression of Ki-67 protein was examined by immunohistochemical method, the apoptosis of tumor cells was observed by TUNEL, and the levels of oxidized glutathione (GSSG) and glutathione (GSH) were analyzed using colorimetric method. Micro array was used to screen the differentially expressed genes between control group and [H]H₂O intervention group, and the levels of those genes were verified with qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, [H]H₂O intervention significantly inhibited the tumor growth, reduced tumor weight and volume ($P<0.01$, $P<0.05$); moreover, it also reduced the expression of Ki-67 protein ($P<0.05$) and promoted tumor cell apoptosis ($P<0.05$). In addition, the ratio of GSSG/GSH was significantly increased in [H]H₂O intervention group compared with that in the control group ($P<0.05$). [H]H₂O intervention could also regulate the expression of interferon γ -related genes. **Conclusion** [H]H₂O may exert its antitumor activity via inhibiting proliferation, inducing apoptosis of colon cancer cells, and regulating the intracellular redox state and the expression of interferon γ -related genes.

[Key words] hydrogen; colorectal neoplasms; apoptosis; oxidative stress; interferon- γ -related genes

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(9): 1082-1087]

结直肠癌是常见消化道恶性肿瘤之一, 其发病率在全世界范围内处于恶性肿瘤第 3 位, 在西方发

[收稿日期] 2015-12-21 **[接受日期]** 2016-04-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81472770, 30972460). Supported by National Natural Science Foundation of China (81472770, 30972460).

[作者简介] 张 瑶, 硕士生. E-mail: zhangyaodandan@126.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-34205717, E-mail: lihuas@sjtu.edu.cn

达国家中处于第2位^[1-2]。在我国,随着近年来居民生活水平的提高和饮食习惯的改变,结直肠癌的发病率也呈上升趋势,位居恶性肿瘤和致死因素的第4位^[3]。结直肠癌早期诊断率低,术后易复发,具有高侵袭性和高病死率的特点,所以从膳食营养干预的角度寻找能有效抑制结直肠癌细胞增殖的功能性物质具有重要意义。

研究发现氢分子具有良好的选择性抗氧化及抗炎作用^[4]。富氢水(hydrogen-rich water, [H]H₂O)含有较高浓度的氢气,目前关于富氢水的研究大多围绕其良好的抗氧化及抗炎活性,及其在缺血再灌注损伤、糖尿病等代谢性疾病的应用^[5-6],将其应用于肿瘤的预防及治疗方面的研究较少。有研究表明富氢水可显著抑制放疗引起的氧化应激反应,减轻放疗的不良反应,有效改善接受放疗的肝癌患者的生活质量,提示富氢水可辅助用于恶性肿瘤患者的放化疗^[7];Li等^[8]证明富氢水可减轻化学毒性物质所致的大鼠肾脏损伤,并抑制早期肿瘤的发生。我们前期在动物实验中发现,富氢水对葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的慢性结肠炎及结肠癌具有较好的预防作用,能显著抑制肿瘤的发生(未发表数据)。本研究利用皮下接种人结直肠癌细胞系 SW480 细胞建立荷瘤小鼠动物模型,初步探讨富氢水对肿瘤形成、生长的抑制作用及其分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 BALB/c 雄性裸鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司[动物许可证号:SYXK(沪)2010-0101],4 周龄,体质量(20±2)g;结直肠癌细胞系 SW480 购于中国科学院上海细胞库;DMEM 培养基购于上海源培生物科技有限公司;胎牛血清(FBS)购于 Gibco 公司;鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体工作液及 EnVision™二抗均购于上海长岛生物技术有限公司;TUNEL 试剂盒购于瑞士罗氏公司;活性氧(ROS)检测试剂盒(S0033)、谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)检测试剂盒(S0053)均购于上海碧云天生物技术研究所;焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)购自上海索宝生物科技有限公司;TRIzol®试剂购于 Life Technologies 公司;无水乙醇、三氯甲烷、异丙醇均为国产优级纯,购自上海晶纯生化科技股份有限公司;引物由 Invitrogen 公司合成;荧光定量 PCR

(qRT-PCR)试剂盒 PrimeScript® RT Reagent Kit (Perfect Real Time, RR037A)购于宝生物工程(大连)有限公司;富氢水(0.8 mg/kg, 还原电位 500 mV)由北京活力氢源饮品有限公司提供。

1.2 实验动物分组及模型建立 将 16 只 4 周龄的 BALB/c 雄性裸鼠随机分为对照组(Ctrl, $n=8$)和富氢水干预组([H]H₂O, $n=8$)。首先,取对数生长期的 SW480 细胞,于裸鼠右腋皮下接种(4×10^6 /只)。接种后,为保证水中氢气浓度,富氢水干预组每天早、中、晚 3 次更换新鲜富氢水供小鼠自由饮用;对照组给予普通水。观察肿瘤的生长情况,用直尺测量肿瘤长度(a)、宽度(b),用公式 $V=ab^2\pi/6$ 计算其体积。荷瘤 28 d 后处死小鼠,取肿瘤组织,称质量后进行后续实验。

1.3 免疫组化检测 Ki-67 表达 Ki-67 是反映肿瘤细胞增殖活性、判断肿瘤侵袭力的重要参考指标^[9-10]。取裸鼠肿瘤组织,多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋。蜡块连续切片,切片厚度 4 μm,脱蜡、水化,加 3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗,用 EDTA(pH=8)高温高压修复抗原。滴加鼠抗人 Ki-67 单克隆抗体工作液,37℃水浴箱内孵育 1 h, PBS 冲洗;加 EnVision™二抗,37℃水浴箱内孵育 30 min, PBS 冲洗;加新配制的 DAB 显色液,显微镜下观察,阳性显色为棕黄色。自来水冲洗,苏木素复染,0.1%盐酸分化,自来水冲洗, PBS 冲洗返蓝。梯度乙醇脱水干燥,中性树脂封片。由专职病理科医师盲法独立阅片。根据细胞核染色定义为淡黄至棕黄色为 Ki-67 阳性细胞,随机选择 10 个视野,于 400 倍镜视野进行计数,每个视野计数 500 个细胞,计算 Ki-67 阳性细胞数占总细胞数的百分数。Ki-67 阳性细胞数 0~20%为 Ki-67 低表达,大于 20%为 Ki-67 高表达。

1.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡 取裸鼠肿瘤组织,冰冻切片,用 4%多聚甲醛常温下固定 20 min, PBS 漂洗 30 min,细胞通透液 0.1% Triton X-100 冰上通透 2 min, PBS 漂洗;加 TUNEL 反应液(TdT+荧光素标记的 dUTP),37℃湿盒中避光孵育 1 h, PBS 漂洗;加 DAPI,4 min 后用 PBS 漂洗,防荧光淬灭封片剂封片。对照 TUNEL 反应液中不加 TdT,其余反应同前。荧光显微镜下观察,选取 5 个非重叠 400 高倍镜视野观察,计算凋亡细胞数。

1.5 氧化应激相关指标的检测 冰冻切片加入 5 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 荧光探针溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 90 min, 用缓冲液清洗切片, 显微镜下观察细胞荧光强度。用“+”或“-”表示荧光强弱:(-)无荧光;(±)极弱的可疑荧光;(+)荧光较弱, 但清楚可见;(++)荧光明亮;(+++~++++)荧光闪亮。待检标本特异性荧光强度达“++”以上, 而各种对照显示为(±)或(-), 即可判定为阳性。

取肿瘤组织制备裂解液, 按照试剂盒操作说明测定 GSH 和 GSSG 含量, 计算 GSSG/GSH 的比值, 实验重复 3 次。

1.6 差异表达基因检测 富氢水干预组和对照组各随机取 3 个移植瘤组织, 送欧易生物科技有限公司进行基因表达谱检测。简述如下: 抽提肿瘤组织 RNA, 利用 Agilent Bioanalyzer 进行毛细管电泳检测 RNA 质量。利用 Affymetrix GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array (包含 47 000 个转录本, 代表 38 500 个明确的人类基因) 基因表达谱芯片进行检测、分析。

1.7 qRT-PCR 方法验证部分基因的表达 按照 TRIzol 试剂盒操作说明抽提肿瘤组织总 RNA, 按照 PrimeScript[®] RT Reagent Kit (Perfect Real Time) 试剂盒操作说明进行反转录操作合成 cDNA, 按照 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒说明进行 qRT-PCR。目的基因引物序列如表 1 所示。PCR 反应液体系 (20 μL): SYBR[®] Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10.0 μL , PCR 上游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , PCR 下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.8 μL , cDNA (<100 ng) 2.0 μL , ddH₂O 6.4 μL 。PCR 反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环。熔解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。基因扩增结果采用相对定量法分析对照组和富氢水干预组中目的基因相对表达量, 计算表

达水平比率 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$)。

表 1 PCR 扩增引物序列

Tab 1 PCR amplification primer sequence

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>Mmp9</i>	F: GGG CTT AGA TCA TTC CTC AGT GCC R: GAA GAT GTT CAC GTT GCA GGC ATC
<i>Il12rb1</i>	F: TAG GGA CCT GAG ATG CTA TCG R: CCC GGA GCT AAG GCA ACA C
<i>Csf2rb</i>	F: ACA GAG AAC CTA GAT CGA GCC R: GTG TAC TCT TCG CTC CAC TTG
<i>Tnfrsf8</i>	F: CGG CAC TTA GCT TTG GTG AG R: GAG TGA AGT CAG GCC CAT AGA
<i>Cxcl9</i>	F: GGA GTT CGA GGA ACC CTA GTG R: GGG ATT TGT AGT GGA TCG TGC
<i>Cdk6</i>	F: TCT CAC AGA GTA GTG CAT CGT R: CGA GGT AAG GGC CAT CTG AAA A
<i>Nrp2</i>	F: GCT GGC TAC ATC ACT TCC CC R: GGG CGT AGA CAA TCC ACT CA
<i>Cldn24</i>	F: CCA CAC CGC TGA CTC TCT TG R: GTT AAC CAT GCC GGG AGA CA
<i>βactin</i>	F: AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC R: CGA TAG TGA TGA CCT GAC CGT

F: Forward; R: Reverse

1.8 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 one-way ANOVA 进行组间比较。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 富氢水对荷瘤小鼠肿瘤体积和质量的影响 与饮用普通水的对照组相比, 富氢水干预组小鼠整体成瘤情况受到抑制 (图 1A、1B), 具体表现为富氢水干预组小鼠的肿瘤体积和质量均低于对照组 (图 1C、1D; $P < 0.01$, $P < 0.05$); 第 28 天时, 富氢水干预组小鼠的肿瘤体积为 (587 \pm 64) mm^3 , 质量为 (0.262 \pm 0.028) g, 均低于对照组 [平均肿瘤体积为 (892 \pm 108) mm^3 , 质量为 (0.438 \pm 0.034) g; $P < 0.01$]。

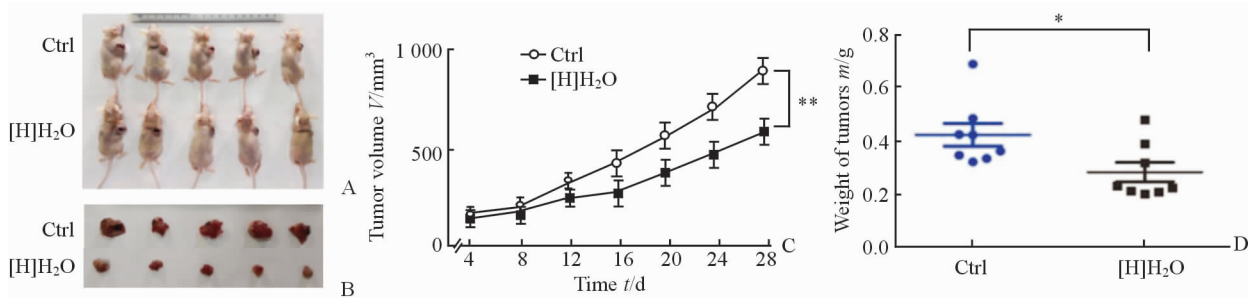


图 1 富氢水对裸鼠体内成瘤能力的影响

Fig 1 Inhibitory effects of hydrogen-rich water on the growth of tumor in nude mice

A: Tumor formation; B: Tumor morphology; C: Tumor volume; D: Tumor weight; [H]H₂O: Hydrogen-rich water; Ctrl: Control. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n=8$, $\bar{x} \pm s$

2.2 富氢水对荷瘤小鼠结直肠癌组织中 Ki-67 蛋白表达及细胞凋亡的影响 富氢水干预组 Ki-67 蛋白表达阳性细胞率为(11.0 ± 2.8)%, 而对照组为(28.0 ± 3.6)%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 说明富氢水干预后小鼠结直肠癌细胞的增殖能力减弱。采用 TUNEL 法检测两组小鼠结直肠癌组织的细胞凋亡情况, 结果表明, 富氢水干预组凋亡细胞率为(14.8 ± 2.2)%, 而对照组仅为(2.6 ± 0.4)%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 表明富氢水可促进结肠癌细胞凋亡, 见图 2。

2.3 富氢水对荷瘤小鼠结直肠癌组织氧化应激状态的影响 如图 3 所示, 与对照组相比, 富氢水干预后并未显著降低小鼠结直肠癌细胞内 ROS 的含量, 而是通过降低 GSH 和升高 GSSG 水平($P < 0.05$)发挥抗肿瘤作用。与饮用普通水的对照组相比, 富氢水干预组 GSH 水平降低了 22%, 而 GSSG 含量升高了 38%, 从而显著提高了 GSSG/GSH 的比值($P < 0.05$)。

2.4 富氢水对荷瘤小鼠结直肠癌组织部分基因表达的影响 为了进一步探究富氢水抑制结肠癌细胞增殖、促进其凋亡的分子机制, 本研究利用基因芯片

对比了富氢水干预组与饮用普通水的对照组小鼠肿瘤组织的差异表达基因(图 4A、4B), 其差异表达基因的验证结果如图 4C 所示。从图中可以看出, 与对照组相比, 富氢水干预可上调 *Mmp9*、*I112rb1*、*Csf2rb*、*Tnfai8l2*、*Cxcl9* ($P < 0.05$), 下调 *Cdk6*、*Nrp2* 及 *Cldn24* 等 γ -干扰素相关基因($P < 0.05$)。

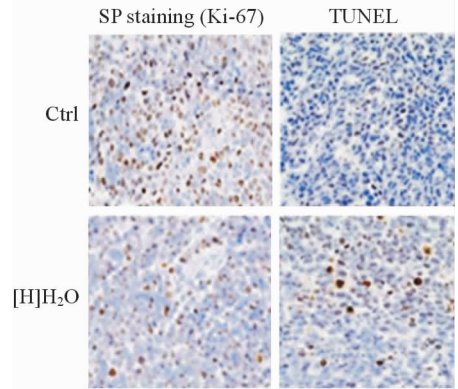


图 2 富氢水对荷瘤小鼠结肠癌组织 Ki-67 蛋白表达及细胞凋亡的影响

Fig 2 Expression of Ki-67 protein and the apoptosis in colon tumor tissues of [H]H₂O and Ctrl groups

[H]H₂O: Hydrogen-rich water; Ctrl: Control. Original magnification: ×400

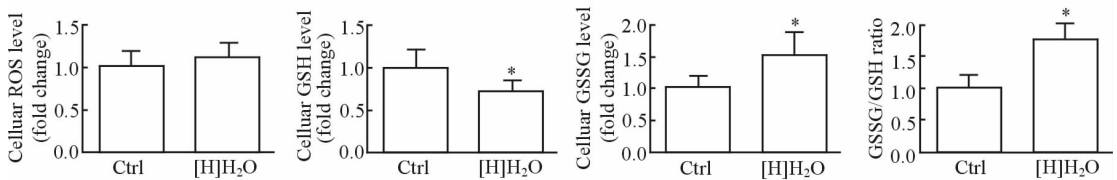


图 3 富氢水对荷瘤小鼠结肠癌组织氧化应激状态的影响

Fig 3 Effects of hydrogen-rich water on oxidative stress in tumor bearing mice

ROS: Reactive oxygen; GSH: Glutathione; GSSG: Oxidized glutathione; [H]H₂O: Hydrogen-rich water; Ctrl: Control. * $P < 0.05$ vs Ctrl group. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

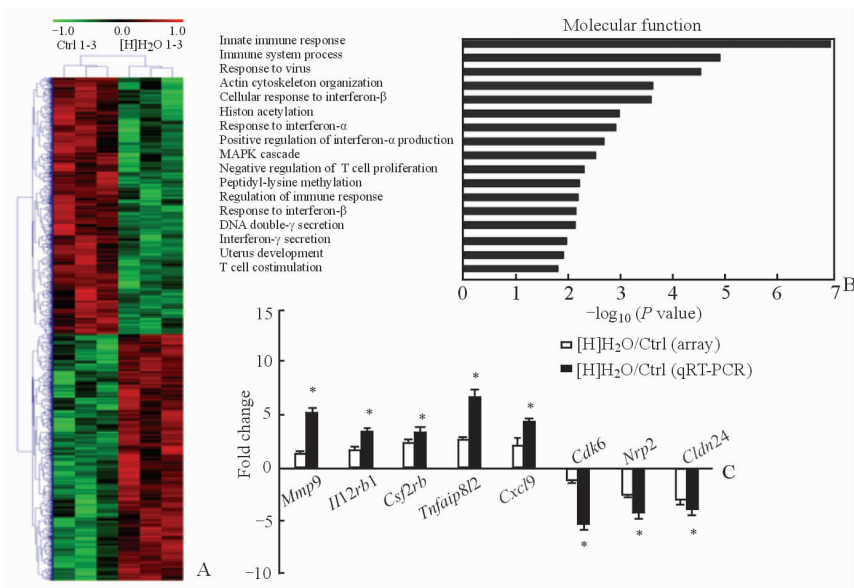


图 4 富氢水对荷瘤小鼠结肠癌组织部分基因表达的影响

Fig 4 Effects of hydrogen-rich water on gene expression profiles in colon tumor tissues of [H]H₂O and Ctrl groups

A: Microarray analysis of gene expression profiles; B: Cluster analysis; C: qRT-PCR analysis of the expression level of some of the genes. [H]H₂O: Hydrogen-rich water; Ctrl: Control. * $P < 0.05$ vs Ctrl group. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

早在1975年,Dole等^[11]将患有鳞状细胞癌的无毛小白鼠放于高压氢气舱内(8 MPa, 2.5%氧气, 97.5%氢气),发现氢气可使皮肤肿瘤消退。但由于高压氢气用于临床治疗存在安全隐患,此类研究并未引起广泛注意。直至2007年,日本学者采用化学反应、细胞学等手段,证明氢气溶解在液体中可选择性中和羟自由基和亚硝酸阴离子(两者皆为氧化损伤的重要介质)^[12]。这一发现引起了研究氢气治疗疾病的热潮,大量研究相继发现氢在脑组织缺血再灌注损伤^[13]、炎症^[14]、电离辐射损伤^[15]、神经系统损伤以及代谢综合征^[16-17]等疾病中均发挥一定的作用。

近年来,通过采用增加压强等技术将氢气溶解于水中,制备获得了给予方便且安全的富氢气,推动了氢在临床研究中的应用。研究发现富氢气可减轻组织氧化应激和炎症反应^[18-19]。另有少量研究表明,富氢气对肾癌^[8]及非酒精性脂肪肝引发的肝癌具有一定的预防作用^[20]。本研究利用结肠癌荷瘤小鼠动物模型,研究了富氢气对结肠癌肿瘤细胞增殖、凋亡及氧化应激状态的影响,结果表明富氢气可有效抑制肿瘤细胞的增殖,抑制肿瘤的生长,诱导肿瘤细胞凋亡,并进一步证明了富氢气抗肿瘤生物学活性的发挥与其对肿瘤组织氧化应激状态的调节作用有关。

机体尤其是线粒体产生的 ROS 在各种细胞信号转导中扮演重要角色。一方面,危险因素如吸烟、环境污染物、辐射、病毒感染等可通过诱导产生大量 ROS 引发慢性病如恶性肿瘤的发生;另一方面 ROS 可通过激活 NF- κ B、AP-1(activator protein-1)等转录因子,调控炎症反应以及肿瘤细胞增殖、侵袭、转移及血管生成等。ROS 还可调控抑癌基因如 p53、PTEN 及 Rb 基因的表达;然而肿瘤的放、化疗又是通过产生大量 ROS 发挥杀伤肿瘤细胞的作用,另外一些功能性抗肿瘤活性物质又通过清除 ROS 减轻氧化应激状态,以发挥预防肿瘤的活性。这提示 ROS 的功能类似于 TNF- α 、炎症反应及 NF- κ B,具有“抑癌”及“促癌”的“双刃剑”效应,提示机体氧化应激状态的调控在肿瘤治疗中可能具有重要的作用^[21]。已有研究表明 GSH 的损耗对细胞氧化应激平衡的调节及细胞死亡通路的激活发挥重要的中枢调控作用^[22],本研究发现富氢气干预后,虽然并未降低结肠癌组织细胞内 ROS 的含量,但可降低

GSH 水平、升高 GSSG 水平,提高 GSSG/GSH 的比值,从而打破细胞内的氧化还原平衡,使肿瘤组织处于 ROS 应激状态,这可能是富氢气发挥抗肿瘤活性的机制之一。

为了进一步探究富氢气抑制肿瘤细胞增殖、促进其凋亡的分子机制,本研究还利用基因芯片对比研究了富氢气干预组与对照组的差异表达基因,发现富氢气干预后可影响 γ -干扰素相关基因的表达。干扰素是一类重要的抗病毒、抗肿瘤和免疫调节细胞因子,广泛用于造血系统恶性肿瘤、淋巴瘤及多种实体瘤的临床治疗。研究表明干扰素与细胞表面受体结合后,主要通过 JAK/STAT 信号途径,调节如凋亡相关分子 *Fas/FasL*、*TRAIL/APO-2*、抑癌基因 *bax*、*bak* 及 *p53* 等一系列干扰素刺激基因(IFN-stimulated genes, ISGs)的表达,这些 ISGs 与细胞凋亡及细胞周期密切相关^[23]。此外,干扰素还可放大由 caspase 诱导的线粒体功能紊乱效应,诱导线粒体途径的细胞凋亡。因而,干扰素可通过调节细胞周期、抑癌基因的表达及增强肿瘤细胞对凋亡信号的敏感性,诱导肿瘤细胞凋亡,发挥其抗肿瘤生物学活性。本研究结果表明富氢气干预可上调 *Mmp9*、*Ii12rb1*、*Csf2rb*、*Tnfai*p812、*Cxcl9*, 下调 *Cdk6*、*Nrp2* 及 *Cldn24* 等 γ -干扰素相关基因的表达($P < 0.05$),其中 *Mmp9* 基因参与肿瘤的转移及血管生成^[24]; *Csf2rb* 基因参与 JAK/STAT 信号通路、调控细胞凋亡等^[25]; *Cxcl9* 基因参与 Notch 信号通路,从而参与调控细胞凋亡及细胞周期^[26]; *Nrp2* 基因不仅与血管生成相关,还可调控细胞增殖、细胞周期、细胞运动和细胞迁移、细胞分化、细胞凋亡等^[27]。上述研究结果提示富氢气可能通过影响多个靶基因发挥肿瘤的抑制作用,对上述基因的具体调控机制和途径尚需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Peto J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade[J]. Nature, 2001, 411: 390-395.
- [2] TSUKUMA H, AJIKI W. [Descriptive epidemiology of colorectal cancer - international comparison][J]. Nihon Rinsho, 2003, 61 Suppl 7: 25-30.
- [3] 周晓东,吕农华. 大肠癌的流行病学研究现状[J]. 现代消化及介入诊疗, 2006, 11: 149-151.
- [4] CHEN X, ZHAI X, SHI J, LIU W W, TAO H, SUN X, et al. Lactulose mediates suppression of dextran sodium sulfate-induced colon inflammation by increasing hydrogen production[J]. Dig Dis Sci, 2013,

- 58: 1560-1568.
- [5] 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 [J]. *Med Gas Res*, 2015, 5: 12.
- [6] KAJIYAMA S, HASEGAWA G, ASANO M, HOSODA H, FUKUI M, NAKAMURA N, 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: 137-143.
- [7] KANG K M, KANG Y N, CHOI I B, GU Y, KAWAMURA T, TOYODA Y, 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: 11.
- [8] LI F Y, ZHU S X, WANG Z P, WANG H, ZHAO Y, CHEN G P. Consumption of hydrogen-rich water protects against ferric nitrilotriacetate-induced nephrotoxicity and early tumor promotional events in rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 61: 248-254.
- [9] 邵文秀, 丰建国, 杨艳芳, 梁小波, 李耀平, 李佩珍. 增殖细胞核抗原在大肠癌中的表达及预后[J]. *现代预防医学*, 2007, 34: 225-226.
- [10] 林妙霞, 文卓夫, 冯智英, 何 丹. Bmi-1、Ki-67 在大肠肿瘤组织中的表达及其意义[J]. *癌症*, 2008, 27: 1321-1326.
- [11] DOLE M, WILSON F R, FIFE W P. Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer[J]. *Science*, 1975, 190: 152-154.
- [12] OHSAWA I, ISHIKAWA M, TAKAHASHI K, WATANABE M, NISHIMAKI K, YAMAGATA K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13: 688-694.
- [13] ONO H, NISHIJIMA Y, ADACHI N, TACHIBANA S, CHITOKU S, MUKAIHARA S, 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: 12.
- [14] CAI W W, ZHANG M H, YU Y S, CAI J H. Treatment with hydrogen molecule alleviates TNF α -induced cell injury in osteoblast[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 373(1/2): 1-9.
- [15] QIAN L, CAO F, CUI J, HUANG Y, ZHOU X, LIU S, et al. Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice[J]. *Free Radic Res*, 2010, 44: 275-282.
- [16] KAMIMURA N, NISHIMAKI K, OHSAWA I, OHTA S. Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2011, 19: 1396-1403.
- [17] IGNACIO R M, KANG T Y, KIM C S, KIM S K, YANG Y C, SOHN J H, et al. Anti-obesity effect of alkaline reduced water in high fat-fed obese mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36: 1052-1059.
- [18] CAI J, KANG Z, LIU K, LIU W, LI R, ZHANG J H, et al. Neuroprotective effects of hydrogen saline in neonatal hypoxia-ischemia rat model[J]. *Brain Res*, 2009, 1256: 129-137.
- [19] CHEN H, SUN Y P, LI Y, LIU W W, XIANG H G, FAN L Y, et al. Hydrogen-rich saline ameliorates the severity of L-arginine-induced acute pancreatitis in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393: 308-313.
- [20] KAWAI D, TAKAKI A, NAKATSUKA A, WADA J, TAMAKI N, YASUNAKA T, et al. Hydrogen-rich water prevents progression of nonalcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice[J]. *Hepatology*, 2012, 56: 912-921.
- [21] GUPTA S C, HEVIA D, PATCHVA S, PARK B, KOH W, AGGARWAL B B. Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer; the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16: 1295-1322.
- [22] FRANCO R, CIDLOWSKI J A. Glutathione efflux and cell death[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17: 1694-1713.
- [23] 靳淑黎, 李保军, 王一平. γ -干扰素对人结肠癌细胞增殖的影响[J]. *临床内科杂志*, 2006, 23: 636-637.
- [24] 叶立群, 张谢夫, 赵春临, 刘 涛, 顾世敏. 结直肠癌组织 STAT3 和 MMP-9 表达及其与血管生成相关性的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18: 949-952.
- [25] ALEXANDER S P, BENSON H E, FACCENDA E, PAWSON A J, SHARMAN J L, SPEDDING M, et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: catalytic receptors [J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 170: 1676-1705.
- [26] HARTH-HERTLE M L, SCHOLZ B A, ERHARD F, GLASER L V, DÖLKEN L, ZIMMER R, et al. Inactivation of intergenic enhancers by EBNA3A initiates and maintains polycomb signatures across a chromatin domain encoding CXCL10 and CXCL9 [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9: e1003638.
- [27] 毛 东, 付晓光, 陆 航. Adv-shRNA 抑制 NRP2 表达对胃癌 SGC7901 细胞增殖的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 11: 2309-2311.