

冬蟲夏草複方輔助治療慢性C型肝炎 之血中硒含量及氧化壓力之研究

柯萬盛^{1*} 郭志宏²

光田醫療社團法人光田綜合醫院 內科部¹；

弘光科技大學 營養醫學研究所²

摘要

目的：先前研究我們發現 C 型肝炎患者，其血液中礦物質硒 (Selenium, Se)之濃度，較對照組有明顯減低，且與 HCV-RNA 病毒量呈明顯負相關性。另外，我們也觀察到患者接受干擾素與 Ribavirin 併用治療，在治療第一個月其血硒含量較治療前為低。因此，補充冬蟲夏草複方是否可以改善病人硒缺乏，故進行此研究。

方法：本研究收集了12位慢性 C 型肝炎患者及 8 位正常人，患者於治療期間接受短效型干擾素/ribavirin 併用冬蟲夏草複方，分別在治療前、治療期間的第三個月與第六個月，檢測病毒數清除率，氧化壓力與血中硒的濃度變化。

結果：結果發現患者其血硒濃度於治療前明顯低於對照組 ($p < 0.05$)，氧化壓力 (oxidative stress) 則顯著較高。然而，在治療期間第 3 與第 6 個月的血硒濃度，明顯較治療前高。未檢測出 HCV 病毒數患者的血硒濃度，顯著高於 HCV 被檢測出者。氧化壓力於第3個月達到最高，第6個月比治療前低。

結論：冬蟲夏草複方的輔助治療可使患者血硒含量明顯上升，抑制病毒的複製，進而有效增加病毒的清除及降低氧化壓力。因為冬蟲夏草複方富含硒，推測患者血硒濃度上升與服用冬蟲夏草複方有關，但真正的原因可能需要進行大型雙盲隨機研究。

關鍵字：慢性 C 型肝炎，硒，冬蟲夏草複方

* 通訊作者

收件日期：2009年1月5日；接受日期：2009年2月4日

前言

C型肝炎在許多國家是一常發生的慢性病毒肝炎，患者會發展成肝硬化、肝衰竭、與肝細胞癌 (1,2)。目前已被接受的 C型肝炎傳統治療方式是注射干擾素 (interferon, IFN) 合併服用抗病毒藥物 ribavirin，然而其治癒率僅約為 30~50% (3)。因此，在臨床上尋求提高治癒率的輔助方法，一直是大家所重視的。

目前許多醫療模式與抗病毒的複雜機制都處於試驗及假說階段 (4)，對於那些復發者 (relapser) 或無反應者 (nonresponder)，仍無法找出真正原因。近來報告指出，病毒型肝炎患者的營養狀態可能與抗病毒、免疫能力或氧化壓力有關 (5)。

相關文獻指出，補充鋅 (zinc) 搭配 IFN 治療，可以明顯降低血清中的 HCV-RNA 含量 (6,7)。患者血漿中硒與 Se-dependent GSH peroxidase 均明顯較對照組低 (8)。此外，抗氧化物質 (glutathione, vitamin C, E, Se) 的降低，使得肝炎更易惡化 (9)。對於 IFN/ribavirin 無反應者，其尿液中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量與血液中總抗氧化能力指標均明顯較有病毒反應者來的低 (10)。本實驗室研究發現，冬蟲夏草複方具有降低氧化壓力、抗病毒與護肝功能，對於提高 C型肝炎的持續性病毒反應者 (sustained virus response, SVR)，有加成作用，約增加 20%。因此，冬蟲夏草輔助治療，應視為改善 SVR 的一個好方法。先前研究亦發現，患者治療前血液中硒濃度明顯較低，當硒濃度愈低，HCV-RNA loads 愈高 (11)。顯示治療期間併用冬蟲夏草可能改善了患者硒相關的營養狀態，進而增加抗氧化壓力、免疫能力及抗病毒作用。

因此，本文探討 HCV 肝炎患者，在治療前、治療之第 3 月及第 6 個月結束時的 HCV-RNA 濃度、血漿中 Se 濃度，glutathione

peroxidase (GPX)、glutathione reductase (GR) 及 Superoxide dismutase (SOD) 活性等之變化與其相關性。

材料與方法

一、病患收集

收集 12 位接受 C型肝炎治療的門診患者與 8 位健康受試者，患者來源以竹南、後龍、通霄、苑裡、大甲、清水、沙鹿、后里及彰化為主。患者篩選條件是血清中轉胺酶活性超過正常值且出現 HCV-RNA 陽性者，尚未進行治療者。此外，經腹部超音波判定無肝硬化與肝癌者、或酒精性肝炎，及無腎功能異常者。

分別紀錄患者的性別與年齡，患者在治療前、治療之第 3 個月及第 6 個月結束後，分別抽血並收集血液樣本。此外，患者接受常規的干擾素/ribavirin 與冬蟲夏草複方 (3.9 g/day) 的合併治療，治療時間共 12 個月。短效干擾素是使用 alpha-interferon-2a (3 MU，一週施打三次)，ribavirin 是每日 1000-1200 mg，時間為 6 個月。配合門診，參與該計劃的對象，均簽署受試者同意書。參與本次實驗者均能夠了解實驗目的與其血液樣品將用來分析的項目。

二、分析項目

HCV-RNA 定量反應：利用商業組套進行 RNA 的萃取 (QIA- amp viral RNA kit from Qiagen Inc.) (11)，使用 Amplicor (Roche Molecular Diagnostics) 進行反應並以 copies of RNA/mL log 值來表示。HCV-RNA 檢測的極限是 100 copies/mL。

血中硒 (Se) 濃度測定：血清及紅血球樣品經濕式酸分解後，使其中的有機硒轉變成無機硒後，再以稀酸為還原劑，將六價硒還原成四價硒。利用 2,3-diaminonaph-thalene (DAN) 將其螯合成 Se-DAN 之錯合物，最後利用環己烷萃取



Se-DAN 錯合物進行螢光分析。

脂質過氧化產物(malondialdehyde,MDA) 分析：將 RBC 與 PBS and 50mM BHT 先行混合，加入 30% TCA 溶液後進行震盪並置在冰浴上，經離心後取出上層液，在沸水浴中反應 50 分鐘後，加入EDTA (0.1M) + 1% TBA (in 0.05 N NaOH) 終止反應。最後在 532 nm 下測量其吸光值。

穀胱甘肽過氧化酶 (Glutathione peroxidase,GPX)：血漿及紅血球的 SeGPX 以 glutathione 為還原當量來源，將過氧化物質 t-butyl-hydroperoxide 還原成醇類。反應產生的 GSSG 經 glutathione reductase 催化及 NADPH 的消耗還原為 GSH。測定每單位時間 NADPH 氧化成 NADP 的速率 (340 nm) 得知 SeGPX 活性。GSH reductase：利用系統之磷酸緩衝溶液所含的 GSSG、NADPH 與肝臟上清液中原本所含的 glutathione reductase 作用，在 340 nm 下測量二分鐘內 NADPH 的降低速率。超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase,SOD) 是利用 RNASODkits(Randox,San Diego) 測定，測定值是以units/g Hgb表示，一單位SOD代表造成50%抑制p-iodonitrotetrazolium reduction之量，測定量越低代表有高的SOD活性。

三、統計分析

實驗結果之數據以平均值 \pm 標準誤差 (Mean \pm SEM) 表示。以 Leven's 同質性考驗、pair t-test、變方分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 進行驗證並以鄧肯氏多變域測驗 (Duncan's Multiple Range Test) 事後比較測驗 ($p < 0.05$)。此外，並以多重迴歸分析 (multiple regression analysis) 分析相關指標之相關性。

結果與討論

文獻指出，微量元素硒缺乏，可能加速肝病

變之嚴重性 (12)，亦與組織的氧化壓力增加有關 (13,14)。Look (15) 指出，同時感染 HCV 及 HIV 患者，其血清硒濃度明顯較單獨感染HIV 低。本研究亦比較治療前與健康受試者的血硒含量，HCV 感染患者其血液中的硒濃度明顯較對照組低 (表一, $p < 0.05$)。此外，在治療期間各個時間點的血硒含量，有明顯增加的現象。顯示治療期間，冬蟲夏草併用之患者其血液中硒濃度顯著較治療前增加。

Zhang 等人 (16) 指出，包括HIV-1, HCV, Coxsackie's virus B3, 與 HIV病毒的RNA，利用線性迴歸比較，發現治療前其血硒濃度與病毒數呈明顯的負相關性。Ko 等人 (11) 指出，血清硒含量高時其病毒數比血硒濃度較低的患者為低。顯示感染 HCV 患者的硒狀態，可能影響日後治療過程對病毒的清除率。本實驗室研究發現，併用冬蟲夏草複方可以有效提高患者的持續性病毒清除率約20%。推測病毒清除率與血硒含量可能有密切關係。

硒是 GPX 的輔因子，與氧化還原有關。氧化自由基(Reactive Oxygen Species,ROS)在肝病變的誘發與發展扮演相當重要的角色。ROS 可以誘發細胞素 (cytokines) 的活化與轉譯。一些研究指出，補充硒與鋅可以改善肝炎患者的發炎反應 (17,18)。此外，脂質過氧化產物 (MDA) 濃度與慢性肝炎的嚴重性有關 (19)。本文結果顯示，C 型肝炎患者治療前血漿及紅血球的 MDA 含量均顯著較正常人高。患者的 SOD 與 GR 活性較對照組高，顯示體內需要更多的 SOD 或GR 來清除自由基。此外，治療前的 GPX 活性較正常人低，顯示氧化壓力明顯較高 (表二)。

C型肝炎患者紅血球 SOD與 GR 活性在治療第三個月較治療前高 (表三)。然而，患者 SOD 與 GR 活性在治療第 6 個月時則比治療前低。在治療第 3 月的 GPX 活性較治療前低，但在治療第 6 個月時其活性則顯著比治療前及治

療第 3 月時高。推測在治療過程中，宿主體內為清洗 HCV 病毒引發體內之氧化壓力（表三）及細胞素 (cytokines) 分泌有關。然而，在第六個月時，體內病毒已清除，所以其氧化壓力及細胞素濃度均降低 (10,16)。

患者在治療第 3 個月，有 25% 患者 (3/12) 未檢測出 HCV-RNA 量。然而，有 84 % 的患者 (10/12) 在第 6 個月時未檢測出 HCV 病毒數。在第 6 個月未檢出病毒數患者其血硒濃度 (351.25 ± 17.21 ng/ml) 顯著較被檢出病毒患者的血硒含量高 (298.73 ± 14.36 ng/ml, $p < 0.05$)。此外，我

們發現如患者治療前的血硒濃度較高時，其治療結束後未被檢測出病毒率亦高。但此部份需收集更多的數據，才能進一步來證明。

綜合以上結果顯示，使用短效干擾素與 Ribavirin 併用冬蟲夏草複方可以有較高的病毒反應率，且維持較高的血硒含量可能具有對抑制 HCV 病毒複製有加成作用。冬蟲夏草輔助治療可以使得患者的血硒含量明顯上升可能是冬蟲夏草複方富含硒，但其真正原因並不清楚，是值得再進一步進行大量雙盲隨機研究。

Table 1. The blood concentrations of selenium (Se) in patients with chronic hepatitis C and healthy controls^{1,2}

Group	Se concentration (ng/ml)
Healthy subjects	355.77 ± 10.55^d
pretreatment	214.80 ± 17.88^a
1st month during treatment	294.47 ± 10.88^{bc}
3rd month	283.92 ± 19.91^b
6th month	325.13 ± 15.27^c

¹ Results expressed as mean \pm SEM

² Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

Table 2. The MDA levels, SOD, GR and GPX activities in patients with chronic hepatitis C (before treatment, n=12) and healthy controls (n=8)^{1,2}

Groups	Parameters ³			
	MDA (nmol/g protein)	SOD (U/g Hb)	GR (mU/g Hb)	GPX (nmol/min/mL)
Patients	0.45 ± 0.11^a	20.34 ± 0.65^a	34.32 ± 1.98^a	31.45 ± 2.54^b
Healthy Controls	0.21 ± 0.09^b	14.87 ± 0.36^b	23.52 ± 2.01^b	45.58 ± 3.98^a

¹ Results expressed as mean \pm SEM

² Values in the same column with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

³ MDA: malonyldialdehyde; SOD: superoxide dismutase; GR: glutathione reductase; GPX: glutathione peroxidase.



Table 3. The activities of SOD and MDA product in patients with chronic hepatitis C before and after 3 and 6 month of therapy^{1,2}

	pretreatment	3 month	6 month
SOD (U/g Hb)	20.34 ± 0.65 ^b	24.76 ± 0.55 ^c	15.45 ± 0.36 ^a
GR (mU/min/ml)	33.08 ± 9.73 ^a	47.45 ± 7.70 ^a	25.03 ± 3.31 ^b
GPX (nmol/min/ml)	33.32 ± 10.20 ^a	23.90 ± 9.17 ^a	40.14 ± 7.50 ^b
MDA (umol/ml)	0.48 ± 0.09 ^b	0.61 ± 0.07 ^c	0.32 ± 0.03 ^a

¹ Results expressed as mean ± SEM

² Values with different superscripts were significantly different. ($p < 0.05$)

參考文獻

- Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, et al. Characteristic difference of hepatocellular carcinoma between hepatitis B- and C-viral infection in Japan. *Hepatology* 1995;22:1027-1033
- Chrisite JM, Chapel H, Chapman R w, Rosenberg KP. Immune selection and genetic sequence variation in core and envelope regions of hepatitis C virus. *Hepatology* 1999;30:1037-44
- Hoofnagle JH. Management of hepatitis C : current and future perspectives. *J Hepathol* 1999;31:264-268
- Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999;30: 595-601
- Pak SG, Nikitin EV. Ststua of the processes of free-radical oxidation and the antioxidation system in patients with a severe course of hepatitis B. *Klin Med* 1991;69:54-57
- Nagamine T, Takagi H, Takayama H, et al .Preliminary study of combination therapy with interferon-alpha and zinc in chronic hepatitis C patients with genotype 1b. *Biol Trace ElemRes* 2000;75:53-63
- Takagi H, Nagamine T, Abe T, et al .Zinc supplementation enhances the response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C . *J Viral Hepat* 2001;8:367-371
- Czuczejko J, Zachara BA, Staubach-Topczewska E ,Halota w, Kedziora J. Selenium ,glutathione and glutathione peroxidase in blood of patients with chronic liver disease. *Acta Biochim Pol* 2003; 50:1147-1154.
- Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis . *Free Radic Biol Med* 2003;34:1-10
- Stanzial AM, Benoni G, Cuzzolin L, et al.

- Urinary nitrite/nitrate concentrations and total antioxidant capacity in patients with chronic hepatitis C in therapy with interferon and ribavirin. *J Chemother* 2003;15:584-590
11. Ko WS, Guo CH, Yeh Mset al. Blood Micronutrients, Oxidative Stress, and Viral Loads in Patients with Chronic Hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2005;11:4697-702
 12. Buck WB, Ewan RC. Toxicology and adverse effects of mineral imbalance. *Clin Toxicol* 1973;6(3):459-85
 13. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85
 14. Peterhans E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral disease. *Biol Trace Elem Res* 1997;56:107-116
 15. Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, et al. Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH-Px)- levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infection. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:266-272
 16. Zhang W, Ramanathan CS, Nadimpalli RG, et al. Selenium-dependent glutathione peroxidase modules encoded by RNA viruses. *Biol Trace Elem Res* 1999;70:97-116
 17. Sartori M, Andorno S, Rigamonti C, Boldorini R. Chronic hepatitis C treated with phlebotomy alone: biochemical and histological outcome. *Dig Liver Dis* 2001;33:157-162
 18. Selimoglu MA, Aydogdu S, Unal F, Yuce G, Yagci RV. Serum zinc status in chronic hepatitis B and its relationship to liver histology and treatment results. *Pediatr Inter* 2001;43:396-399
 19. Cunningham-Rundles S, Ahrn S, Abuav-Nussbaum R, Dnistrian A. Development of immunocompetence: Role of micronutrients and micro-organisms. *Nutr Rev* 2002; 60: S68-S72

A Study of Blood Selenium Concentration and Oxidative Stress with Supplementation of Cordyceps Compound in Chronic Hepatitis C Patients Treatment

Wang-Sheng Ko^{1*} and Chih-Hung Guo²

Department of Internal Medicine, Kuan-Tien General Hospital¹, Taichung, Taiwan;

Research Institute of Nutrition Medicine², Hungkuang University, Taichung¹, Taiwan

Abstract

Objectives: Evaluate the effects of Cordyceps compound (TCM-100) Supplement on blood selenium concentration and oxidative stress before, during and end-treatment in chronic hepatitis C patients undergoing interferon (INF) /ribavirin therapy.

Design and methods: Twelve subjects were assigned to receive INF- α -2a/ribavirin for 6 months. Eight healthy controls were enrolled in the study. Blood sample were collected at different points including before, during therapy 3th and 6th month for treatment. These samples were analyzed for blood selenium, oxidative stress and viral clearance rate.

Results: blood selenium levels were significantly lower in chronic hepatitis C than in healthy controls at pretreatment. The levels of blood selenium became higher at 3th month and 6th month of treatment time. The blood selenium levels in viral clearance patients were higher than those without viral clearance.

Conclusions: The Cordyceps compound supplement may be a complementary therapy in chronic hepatitis C patients to increase the serum selenium levels, viral clearance rate and decrease oxidative stress. However, further large-scales randomized study will be need to clarify the effect of Cordyceps compound in chronic hepatitis C patients treated with INF- α and ribavirin.

Key Words: chronic hepatitis C, selenium, Cordyceps compound.

* Corresponding author

Received : 5 Jan 2009 ; Accepted : 4 Feb 2009

