

葡萄原花青素体内外抑制乙型肝炎病毒表面抗原和 e 抗原的初步研究

王者令 殷璐 柳富会 侯青顺 钟进义 尹衍玲

【摘要】 目的 探讨葡萄原花青素体内外对乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)的抑制作用。方法 体外分别取不同浓度(50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L)的葡萄原花青素各 0.25 ml,以 1:1 的比例与 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者血清共孵育 4 h 后检测其 HBsAg 和 HBeAg 的含量,并以生理盐水孵育组作为对照组。体内研究选择 60 例 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者随机分为阿德福韦酯单药治疗组(对照组)和阿德福韦酯联合葡萄原花青素治疗组(试验组),每组各 30 例患者(其中对照组失访 1 例)。阿德福韦酯剂量为 10 mg/d,葡萄原花青素剂量为 100 mg/次,3 次/d,疗程均为 8 周。治疗前后分别检测其血清 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 水平以及患者的肝功能,同时观察各组患者不良反应情况。结果 体外 3 个浓度葡萄原花青素组与 HBeAg 阳性血清共孵育后 HBsAg 和 HBeAg 含量均较对照组降低($P < 0.05$)。体内研究中,两组患者治疗后 HBsAg 水平差异无统计学意义($P > 0.05$),但试验组患者治疗后 HBeAg 定量水平低于治疗前和对照组治疗后的水平($P < 0.05$)。结论 葡萄原花青素对 HBsAg 和 HBeAg 具有一定程度的抑制作用,值得进一步深入研究。

【关键词】 葡萄原花青素;肝炎病毒表面抗原,乙型;肝炎病毒 e 抗原,乙型

Inhibition of grape procyanidins on HBsAg and HBeAg in vitro and in vivo WANG Zhe-ling, YIN Lu, LIU Fu-hui, HOU Qing-shun, ZHONG Jin-yi, YIN Yan-ling. Infectious Diseases Hospital of Qingdao, Qingdao 266033, China

Corresponding author: LIU Fu-hui, Email: lfhen16@163.com

【Abstract】 Objective To observe the inhibition of grape procyanidins on hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and e antigen (HBeAg) in vitro and in vivo. **Methods** In vitro, 0.25 ml grape procyanidins in different concentrations (50 mg/L, 100 mg/L and 200 mg/L) were incubated with the serums from HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B (CHB) with the ratio of 1:1 for 4 hours, and then to detect the levels of HBsAg and HBeAg in serum of each group. The physiological saline group was taken as the control group. In vivo, sixty cases of HBeAg positive CHB patients were randomly divided into the control group who were treated with adefovir dipivoxil (ADV) alone ($n = 30$, but one case was failed to be followed-up) and the treatment group who were treated with ADV and grape procyanidins ($n = 30$). The ADV dose was 10 mg/d and the grape procyanidins dose was 100 mg, three times per day. The treatment period of both groups were 8 weeks. The serum levels of HBsAg, HBeAg, HBV DNA and the liver function were detected before and after the treatment. The side effect of treatments were observed simultaneously. **Results** The serum levels of HBsAg and HBeAg after incubated with the three concentrations of grape procyanidins were significantly lower than that in control group in vitro ($P < 0.05$). In vivo, there were no significant difference between the levels of HBsAg before and after treatment in the two groups ($P > 0.05$). But the serum levels of HBeAg after treatment in treatment group were significantly lower than that before treatment in treatment group and after treatment in control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Grape procyanidins has a certain degree of inhibition on HBsAg and HBeAg and is worthy for further study.

【Key words】 Grape procyanidins; Hepatitis B virus surface antigen; Hepatitis B virus e antigen

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.06.017

基金项目:青岛市 2009 科研基金项目(No. 09-1-1-23-nsh)

作者单位:266033 青岛市,青岛市传染病医院(王者令、柳富会、侯青顺、尹衍玲),青岛大学医学院(殷璐、钟进义)

通讯作者:柳富会,Email:lfhen16@163.com

原花青素是存在于植物中的一种多酚类化合物,研究发现原花青素不仅具有抗氧化和保护心血管作用,而且发现不同植物的原花青素对流感病毒和单纯疱疹病毒具有抑制作用,对原花青素药理作用机制的研究表明其可能是通过与酶蛋白的结合而抑制其活性^[1-4]。由于葡萄来源的广泛性及葡萄原花青素提取技术的成熟,目前对葡萄原花青素 (grape procyanidins, GPC) 药理作用的研究已成为热点。近年来,虽然已有多种抗病毒药物可抑制乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 慢性感染者 HBV DNA 的复制,但是如何优化治疗方案来提高乙型肝炎病毒 e 抗原 (HBV e antigen, HBeAg) 和表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 血清学阴转率或血清学转换率仍然是一个难题。为探索葡萄原花青素是否对乙型肝炎病毒的相关蛋白质具有抑制活性,本研究观察了葡萄原花青素分别在体内外对 HBsAg 和 HBeAg 水平的影响。

资料与方法

一、体外研究

1. 主要材料:葡萄原花青素由本实验室制备^[5],其含量 $\geq 99\%$,标准品由日本岛田株式会社提供。血清采集自青岛市传染病医院住院的 10 例 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者,采集血清前均经患者知情同意,每例患者均采集全血 2 ml, 1 h 内分离血清备用。Elecsys-2010 电化学发光全自动免疫分析仪及配套的血清 PRL 试剂盒均为 Roche 公司生产;国华 Hh-42 快速恒温数显箱;海尔冰箱。

2. 方法:体外实验分为 4 组,将葡萄原花青素用生理盐水配置成终浓度为 50 mg/L、100 mg/L 和 200 mg/L,分别为葡萄原花青素低、中、高三个剂量组,以生理盐水为阴性对照。取 3 个剂量组葡萄原花青素 0.25 ml 分别与备用血清按体积比 1:1 的比例混合,以等量生理盐水与血清混合作为阴性对照组。置 37℃ 恒温水浴箱内孵育 4 h,然后采用电化学发光法检测血清中 HBsAg 和 HBeAg 含量。

二、体内研究

1. 病例选择及材料:选择 2010 年 3 月~2010 年 12 月于青岛市传染病医院门诊就诊的 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者 60 例,诊断符合 2005 年慢性乙型肝炎防治指南^[6],HBV DNA $> 10^5$ 拷贝/ml, $80 \text{ U/L} < \text{丙氨酸氨基转移酶 (ALT)} \leq 200 \text{ U/L}$,排除其他原因所致的肝功能异常及合并心肺疾病或肾功能不全者。

葡萄原花青素胶囊为青岛海隆达生化科技有限公司产品(卫生许可证号:鲁卫食证字 2007 第 370000-000405 号),阿德福韦酯胶囊为江苏正大天晴药业有限公司产品。

2. 治疗分组及方法:在患者知情同意的前提下随机分为两组,其中对照组单用阿德福韦酯 10 mg/d 进行抗病毒治疗,试验组在应用阿德福韦酯 10 mg/d 的基础上口服葡萄原花青素,剂量为 100 mg/次,3 次/d。每组患者均为 30 例(其中对照组失访患者 1 例,未纳入结果分析),两组年龄、性别、肝功能及 HBV DNA 载量差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。疗程为 8 周,观察结束后均继续应用阿德福韦酯治疗。

3. 观察指标:观察患者治疗前后的血清 ALT、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBil)、HBsAg、HBeAg、HBeAb、HBV DNA 载量、血尿素氮、肌酐、血糖及心电图情况,同时观察患者的不良反应。

三、统计学处理

所有数据均采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。显著性检验采用单因素方差分析、 q 检验和 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、体外研究结果

各剂量组葡萄原花青素与 HBeAg 阳性的慢性乙型肝炎患者血清共孵育后的 HBeAg 和 HBsAg 的定量结果见表 1。

表 1 各剂量组葡萄原花青素体外抑制 HBsAg 和 HBeAg 定量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HBeAg (PEI U/ml)	HBsAg (mIU/ml)
高剂量组 (200 mg/L)	10	533.10 \pm 2.38 ^{abc}	3160.67 \pm 14.74 ^{abc}
中剂量组 (100 mg/L)	10	594.49 \pm 2.06 ^{ab}	3335.67 \pm 14.0 ^{ab}
低剂量组 (50 mg/L)	10	657.34 \pm 2.31 ^a	3409.40 \pm 12.23 ^a
对照组	10	736.87 \pm 2.15	3683.00 \pm 14.00

注:^a 与阴性对照组比较, $F = 1.09 \sim 1.23, q = 43.70 \sim 111.96, P < 0.05$; ^b 与低剂量组比较, $F = 1.23 \sim 1.27, q = 34.53 \sim 68.13, P < 0.05$; ^c 与中剂量组比较, $F = 1.09 \sim 1.35, q = 33.73 \sim 78.02, P < 0.05$

二、体内研究结果

1. 肝功能和 HBV DNA 的检测:在观察期中对照组有 1 例患者失访,此例未纳入统计。两组治疗前后的肝功能变化见表 2。对照组 HBV DNA 载量治疗前平均为 $6.724 \log_{10}$ 拷贝/ml,治疗后为 $5.910 \log_{10}$ 拷贝/ml,试验组由 $6.904 \log_{10}$ 拷贝/ml 降至 $5.849 \log_{10}$ 拷贝/ml,两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2. HBsAg 和 HBeAg 检测:8 周观察期内,两组患者均未出现 HBsAg 和 HBeAg 阴转病例,其治疗前后的定量检测结果见表 3。

3. 不良反应:观察期内,对照组中有 5 例患者,试验组有 3 例患者出现恶心症状,未经特殊处理而数日后缓解,两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组患者于治疗前后均未发现有肾功能、血糖及心电图异常者。

表 2 两组患者治疗前后的肝功能指标 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ALT (U/L)	AST (U/L)	TBil ($\mu\text{mol/L}$)
试验组	30			
治疗前		116 \pm 51	110 \pm 44	13.0 \pm 5.2
治疗后		71 \pm 37 ^a	74 \pm 37 ^a	10.2 \pm 5.8
对照组	29			
治疗前		122 \pm 43	108 \pm 57	11.9 \pm 6.3
治疗后		93 \pm 34 ^a	87 \pm 39	11.6 \pm 5.3
<i>t</i>		3.05	3.27	1.76
<i>P</i>		0.003 ^b	0.002 ^b	0.08

注:^a 同组患者治疗前后比较, $P < 0.05$; ^b 两组患者治疗前后降幅比较, $P < 0.05$

表 3 两组患者治疗前后 HBsAg 和 HBeAg 的定量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HBsAg (mIU/ml)	HBeAg (PEI U/ml)
试验组	30		
治疗前		5294 \pm 232	642 \pm 49
治疗后		4978 \pm 196	579 \pm 46
对照组	29		
治疗前		5217 \pm 255	748 \pm 55
治疗后		5015 \pm 192	717 \pm 47

注:两组间治疗前 HBsAg 和 HBeAg 及治疗后 HBsAg 比较, F 分别为 0.018、1.940 和 2.096, $P > 0.05$; 两组患者治疗后, HBeAg 水平的比较, $F = 4.344$, $P = 0.042$; 试验组患者治疗前后, HBeAg 水平的比较, $F = 6.219$, $P = 0.016$; 对照组患者治疗前后, HBeAg 水平的比较, $F = 1.640$, $P = 0.206$

讨 论

本研究发现,葡萄原花青素在体外对 HBeAg 阳

性的慢性乙型肝炎患者血清 HBsAg 和 HBeAg 水平具有一定的抑制作用,且呈剂量依赖性趋势。葡萄原花青素在 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗过程中对 HBeAg 也有一定的抑制作用。

原花青素是一种植物多酚类活性物质,具有抗氧化、清除自由基、抗微生物以及抗辐射等生物学活性,在医学领域有很广阔的应用前景^[1]。近年来有学者发现,山楂提取的原花青素对单纯疱疹病毒 1 型具有明显的抑制活性^[2],野樱桃原花青素对流感病毒的复制具有抑制作用^[3]。本研究提示葡萄原花青素可能对 HBsAg 和 HBeAg 在翻译后水平上具有一定的抑制作用。目前研究表明,原花青素可与某些蛋白质结合而抑制其活性^[4],因此推测葡萄原花青素对病毒蛋白的抑制作用可能也是通过此种方式,但其详细机制有待进一步研究。

HBeAg 可通过阻断细胞毒 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 与 HBV 核心抗原相关表位的免疫结合,而使感染 HBV 的肝细胞逃避免疫清除^[7]。本研究发现葡萄原花青素在体内外对 HBeAg 均有抑制作用,提示其可促进机体对 HBV 特异性免疫,而提高 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者的 HBeAg 血清学转换率或持续应答率,但需进一步研究进行证实。体外研究发现葡萄原花青素对 HBsAg 具有一定抑制作用,而在体内研究中未发现此作用,可能与体内病毒复制和 HBsAg 翻译活跃、治疗时间较短等因素有关,其确切原因尚需进一步探讨。同时本研究在体内研究中发现葡萄原花青素具有改善 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者肝功能的作用,可能与其清除氧自由基、抗脂质过氧化和抑制炎症因子等抗炎作用有关^[1,8-10]。本研究未发现葡萄原花青素在 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎患者治疗过程中有明显不良反应发生,提示其安全性良好。

HBV 感染是一个重要的全球性公共卫生问题。虽然目前抗 HBV 治疗可使慢性乙型肝炎患者的 HBV DNA 复制得到一定控制,但是血清 HBeAg 和 HBsAg 阴转率或血清学转换率均较低,而血清 HBV 标致物的下降与治疗持续应答相关^[11-13],因此,本研究为深入探索抗 HBV 优化治疗方案提供了新思路。

参 考 文 献

- 1 国植,徐莉. 原花青素:具有广阔发展前景的植物药. 国外医学植物药分册,1996,11(5):196-204.
- 2 Shahat AA, Cos P, De Bruyne T, et al. Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinica*. *Planta Med*,2002,68(6):539-541.
- 3 Chrubasik C, Li G, Chrubasik S. The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytotherapy Research*, 2010, 24

- (8):1107-1114.
- 4 Moini H, Guo Q, Packer L. Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich french maritime pine bark extract, pycnogenol; effect on xanthine oxidase. *J Agric Food Chem*, 2000, 48 (11):5630-5639.
- 5 孙建平, 钟进义, 王可平. 一种葡萄籽原花青素的制备方法. 中国专利: CN101781279A, 2010-07-21.
- 6 中华医学会肝病学会, 感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(12):881-891.
- 7 骆抗先主编. 乙型肝炎基础和临床. 2版. 人民卫生出版社, 2003:49.
- 8 Bagchi D, Bagchi M, Stohs S, et al. Cellular protection with proanthocyanidins derived from grape seeds. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 957:260-270.
- 9 Li WG, Zhang XY, Wu YJ, et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12):1117-1120.
- 10 丰佃娟, 徐贵发. 葡萄籽提取物对人体抗氧化能力的影响. *山东大学学报(医学版)*, 2007, 45(10):985-987.
- 11 Kwon H, Lok AS. Hepatitis B therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(5):275-284.
- 12 卫清琪, 谢青. 血清乙型肝炎表面抗原定量在慢性乙型肝炎诊治中的临床应用和价值. *国际流行病学传染病学杂志*, 2011, 38(4):257-261.
- 13 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 2010年更新版. *中华实验与临床感染病杂志: 电子版*, 2011, 5(1):79-100.

(收稿日期:2012-01-14)

(本文编辑:孙荣华)

王者令, 殷璐, 柳富会, 等. 葡萄原花青素体内外抑制乙型肝炎病毒表面抗原和 e 抗原的初步研究[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2012, 6(6):583-586.

