

肝硬化相關的門脈高壓症患者食用益生菌的安全性-臨床試驗

林詩偉¹，陳炎鍊¹，許勝傑¹，林錫璋²，陳勁初^{1*}

葡萄王生技股份有限公司¹中壢市；成功大學創新醫療科技中心²台南市；台灣

摘要

近日之醫學研究指出，益生菌可刺激腸道之免疫力而具有多項益生功效，包括緊縮腸道腸細胞間隙，因此可以減少細菌穿透腸壁進入血流的機會，進而改善全身的發炎。康貝兒(+)乳酸菌(GK#10)為市面上保健食品，其購買者大多皆為健康者，而對患有潛在疾病的高風險族群如低免疫力的肝硬化尤其併有門脈高壓之病人，若攝取高量益生菌，是否會有安全上的疑慮，值得嚴格地加以評估。基於此安全與應用範圍的考量，本臨床研究以複合性益生菌株與高乳酸菌菌數產品應用於高風險族群患者。本臨床實驗一共蒐集高風險患者 49 位患者進行試驗與血液分析，追蹤受試者經八周的口服試驗物（GK#10 或 placebo）與停用四周後，分別於第 0、5、9 及 13 周抽血檢驗血液生化值進行分析與評估。經由血液生化值統計可知，連續八周攝取康貝兒(+)乳酸菌 GK#10 或安慰劑組臨床試驗血液生化值分析統計顯示該乳酸菌產品安全無虞，不會對高風險患者族群造成任何併發症。

關鍵字：益生菌、門脈高壓、臨床試驗

前言

肝臟中具有兩條主要的血管，分別是肝動脈與肝門靜脈，肝動脈輸送的血液為肝臟帶來豐富的氧氣與養分^[3]，而肝門靜脈在血管運輸中，是個比較特殊的存在，一般血管的運輸由大動脈輸送至小動脈再至微血管進行氧氣與養分的交換成廢棄物與二氧化碳，經小腸系統吸收後，腸道中大量養分被微血管吸收後匯集至靜脈中，持續輸送至肝臟，故此條靜脈血管氧氣濃度較低但也充滿了養分但是同時也帶了大量毒物與雜質。

肝臟是身體中主要的解毒器官，肝門靜脈肩負著這項重任，輸送養分至肝臟的靜脈

血管。輸送至肝臟後的靜脈分化為微血管進行有毒物的交換與解毒作用，以清除微血管中的有毒物濃度，因此肝門靜脈負責提供有毒物至肝臟中的職責。肝臟中的微血管進行有毒物的清理與交換後再匯集成靜脈血管，由靜脈轉化微血管再匯集成靜脈的特殊系統被稱為肝門靜脈系統^[4]。肝門靜脈因銜接於上、下腸繫膜靜脈和脾靜脈之後，血液中含氧量雖然較低，但因流量大卻提供了肝臟所需總氧氣量約 60%與血液流量 75%，腸子吸收的養分，優先由肝門脈送入肝臟之中，肝門靜脈的重要性不亞於肝動脈。

肝門靜脈肩負著將血液送至肝臟的責任，源源不絕的身體廢棄物與小腸中獲得的養分運送至肝臟中，當肝門脈中之血壓升高時，即稱為肝門靜脈高壓。靜脈血液運送至肝臟時肝門靜脈高壓將影響血液運送的總量。

康貝兒(+)乳酸菌(GK#10)（葡萄王生技

*通訊地址：葡萄王生技股份有限公司
桃園市中壢區龍岡路三段 60 號陳勁初
電話：(03)4572125 ext. 2994
Email：gkbioeng@grapeking.com.tw

股份有限公司，中壢市）的組成共有 10 個益生菌菌種，係由單菌落培養到量產，和現在國際上醫學文獻上最廣為研究的 VSL # 3（葡萄王生技股份有限公司，中壢市）有類似點^[5]。VSL # 3 合併有 8 種菌種 (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*)。近年的研究潮流指向多種益生菌一起食入人體腸道，它使得外加益生菌群聚生長的機會增加，這也是 VSL # 3 具有功效性的重要原因之一^[6]。

益生菌乃是保健食品，故它們不能宣稱具有療效，使用者也多是健康人。有病的人，例如肝硬化併門脈高壓的病人，免疫力不佳，常受細菌轉位 (bacterial translocation) 穿透腸壁之苦，因此常發生感染症^[7]，呈現全身性高發炎狀態而伴隨有高動力循環狀態的門脈高壓。如果益生菌能減少細菌轉位，將可能是食用者的受益。因此肝硬化併門脈高壓的病人是否可用或應該用益生菌，亟待評估。

本試驗主要目的為測試葡萄王康貝兒(+) 益生菌產品(GK#10)應用於高風險族群在肝硬化併門脈高壓病人中的安全性，再進一步觀察康貝兒(+)應用在高風險族群患者中是否可因腸道菌相的改變而具有改善肝功能，以及減少併發症而有益健康的功效^[7]。

材料與方法

試驗方法

本臨床試驗採介入性研究，隨機分組分配，以雙盲試驗進行試驗，病人分成以下兩組康貝兒(+) 乳酸菌(GK#10)試驗組受試者每日接受葡萄王所生產之乳酸菌產品康貝兒(+) 乳酸菌(GK#10)之鋁箔條包。口服 8 週，每條 1.5 克，一日三次，三餐飯後食用，每次一包。內含十株乳酸菌，每條總菌數達

1500 億以上，每條鋁箔調中內含以下 10 種益生菌：

Bifidobacterium bifidum、*Bifidobacterium longum*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus reuteri*、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium* 及 *Pediococcus pentosaceus*。

安慰劑組(placebo)每日接受與葡萄王所生產康貝兒(+) 乳酸菌(GK#10)相同之鋁箔條包口服 8 週，內為不含乳酸菌之空白顆粒，劑量如同益生菌組，1 包含 1.5 克重，每天服用三次，每次一包。

收案條件

受試者收案流程：年滿 25 歲以上之病人，性別不拘，經臨床診斷肝硬化且具有以下兩者其中病徵之一者：

過去曾有肝硬化之主要合併症，包括腹水、細菌性腹膜炎、靜脈瘤出血與肝性腦病變。及有門脈高壓的證據：如肝硬化合併脾腫大（超音波或電腦斷層攝影），並且有血小板低下症（少於 100,000/mL）。

由試驗主持人從門診病人或住院病人挑選符合上述兩項病徵之一合適的受試者，當病人同意參加此試驗，門診病人看診結束由醫師與臨床護士介入，並講解參加試驗之流程，並簽署受試者同意書；住院病人待出院前一天由臨床護士介入，告知整個試驗流程，並簽署受試者同意書。

排除條件包括具有如下之一疾病者

(1) 在進入研究時，身體出現敗血性休克情形（因感染導致收縮壓 < 90 mmHg），或進展為失常性肝硬化。

(2) 洗腎病人、心肌梗塞、危及生命之心律不整或中風。

(3) 肝癌已超越米蘭基準 (Milan criteria)：

單一腫瘤不大於 5 公分或 2 至 3 顆腫瘤且最大者小於 3 公分，及不可肝臟移植者（生命預期少於 6 個月）。

(4)門靜脈栓塞。

(5)在進入研究時，有活動性肝性腦病變，或肝功能ALT>3x UNL（3 倍正常值上限），T-bilirubin>4.0mg/dL。

(6)過去一周內有胃腸道靜脈瘤出血不穩定者。

(7)酒精或禁藥品濫用者。及

(8)未簽同意書者。

*在試驗過程中，病人如有發生再次入院、自行退出或死亡情況，立即退出此試驗。

受試者抽血流程

當病人確定進入試驗，簽署完受試者同意書後，由臨床護士採集第一次血液，服用 4 周 GK#10（或安慰劑）後於第五週採集第二次血液樣品。試驗完成了八周攝取後，於試驗第九週及第十三週，再進行第三、四次血液採集，並交由檢驗相關人員進行分析。

一般抽血項目：WBC、Hb、Plt、T-Bil、GOT、GPT、PT，於試驗時間第 0、5、9 及 13 週進行抽血檢驗。

特殊抽血項目：血液中bacteria -DNA之測定、TNF- α 、Total oxidative stress (MDA)、VEGF（受試者進入試驗期間第 0 及 9 週進行抽血）

特殊抽血檢體離心條件：採血後需等凝血 30 分鐘以上再離心，3000rpm，10 分鐘。

結 果

本計畫於 101 年 04 月 05 日收入第一個病人，於 102 年 05 月 30 日收入最後一位病人，共篩選了 57 位病人，其中 8 位因不符合收案標準，故排除此於人體試驗計畫之外。本試驗總收案人數為 49 人，採隨機分組，受試者性別與年紀統計如表 1，GK#10 與 placebo

組在受試者年紀與性別上無顯著性差異 (P=0.28)，另外檢視受試者過往九種病例，以確保實驗準確性，並統計如表 2 所示，此九種病例與在 GK#10 組與 placebo 組在統計上皆無顯著性差異，代表分組上無差異性，完成分組後隨即進行試驗。

表 1. 受試者基本資料分析

0	5.20E+06	6.716003
1	8.60E+06	6.934498
2	1.20E+07	7.079181

本次試驗共為期十三周，分別於第 0、5、9 及 13 周進行血液採集分析，受試者經四次抽血後進行血液生化值分析。分析統計於表 3：完成一個月攝取試驗物 GK#10 或 placebo 的組別進行受試者分析報告，統計整理於表 3。完成八周之試驗物質攝 GK#10 或 placebo 組受試者回診後進行血液生化值分析後，比較第 0 周及第九周血液生化分析報告差異於表 4。完成全程試驗之受試者，持續追蹤觀察，於第 13 周回診抽血檢驗後，結果整理於表 5。在信賴區間 95% 下，受試者在服用 GK#10 的抽血資料與服用四週後（表 3）比較，PT 有顯著的差異，p-value 分別為 0.01。受試者在服用 GK#10 前的抽血資料與服用八週後比較（表 4），TNF- α 有顯著的差異 (p=0.04)。

討 論

綜觀所有受試者服用 GK#10 或 placebo 共八周後及停用一個月後的血液學及生化學數據分析，並無造成任何併發症與非預期效果。由此可知，肝硬化併門脈高壓的高風險患者使用益生菌 GK#10，經臨床試驗調查是安全的。另外，GK#10 組服用 4 週後，PT（凝血酵素原時間）正常數值範圍為：9.8 ~

表 2. GK#10 及 placebo 受試者過往潛在疾病病例

No. (%)	GK#10, (N=25)	Placebo, (N=24)	p -value
無	4(9.1)	3(7.0)	0.95
酗酒	2(4.5)	2(4.7)	
B 型肝炎	9(20.5)	11(25.6)	
C 型肝炎	8(18.2)	6(14.0)	
腹水	9(20.5)	7(16.3)	
靜脈曲張出血	0(0)	1(2.3)	
肝性腦病變	2(4.5)	4(9.3)	
糖尿病	6(13.6)	6(14.0)	
高血壓	4(9.1)	3(7.0)	
中風	0(0)	0(0)	

表 3. GK#10 與 placebo 受試者在使用前 Week 0 & Week 5 的血液學及生化學的部分測項結果

	GK#10			Placebo		
	Week 0 mean±SD	Week 5 mean ±SD	p-value	Week 0 mean ±SD	Week 5 mean±SD	p-value
WBC (μL) $\times 10^3$	4940±1944	5435±2440	0.06	5232±2109	5127±1941	0.75
Hb (g/dL)	12.7±1.9	12.8±1.9	0.45	12.8±2.4	12.5±2.2	0.18
Plt (103/ μl)	106.3±56.8	116.0±76.1	0.32	112.5±50.9	105.0±40.8	0.08
Cr (mg/dL)	0.9±0.4	0.9±0.4	0.88	1.0±0.2	0.9±0.2	0.09
T-Bil (mg/dL)	1.1±0.6	1.2±0.5	0.63	1.2±0.6	1.2±0.6	0.49
AST (U/L)	60.3±32.3	50.5±15.0	0.61	54.5±21.9	52.2±20.0	0.46
ALT (U/L)	44.8±29.2	45.6±22.1	0.81	31.0±15.7	33.8±15.6	0.08
PT (seconds)	12.5±1.1	12.1±0.9	0.01	11.9±1.8	12.1±1.3	0.32
hsCRP (mg/L)	8.4±3.5	7.0±0.0	0.11	8.4±3.3	9.1±3.7	24

11.5，受試者數值偏高至 12.5，四周後降低至 12.1，具有顯著差異($p=0.01$)；Placebo 組，並無顯著差異（表 3）。受試者於 GK#10 組服用 8 週後，TNF- α 由 12.0±3.9 下降至 10.0±2.7，統計上達顯著的差異($p=0.04$)；Placebo 組中的 ALT 及 VEGF，雖然統計上有顯著上的差異（表 4），但臨床並無實際意義，皆屬正常範圍內。服用 12 週，完成整

體試驗後進行調查，顯示兩組並無統計上顯著差異，進一步觀察 GK#10 與 placebo 組，比較血液學及生化學的檢驗數值，同樣的皆無達到顯著性差異（表 6 及表 7）。探討原因，可能因為此次受試者病況較輕微，加上樣本數較少，故無法明顯看出顯著的差異。但在最後的問券調查中（表 8），顯示 GK#10 組別患者具顯著性感受身體變好($p=0.03$)，

表 4. GK#10 與 placebo 受試者在使用前 Week 0 & Week 9 的血液學及生化學的部分測項結果

	GK#10			Placebo		
	Week 0 mean ±SD	Week 9 mean±SD	p-value	Week 0 mean±SD	Week 9 mean±SD	p-value
WBC (μL) x 10 ³	5019±2027	5106±2027	0.76	5406±2224	5078±1860	0.2
Hb (g/dL)	13.0±1.7	12.8±1.8	0.64	13.3±2.4	13.2±2.1	0.87
Plt (10 ³ /μl)	104.2±60.4	108.3±58.2	0.34	112.2±48.8	112.3±45.9	0.98
Cr (mg/dL)	0.9±0.3	0.8±0.3	0.26	0.9±0.2	0.9±0.2	0.94
T-Bil (mg/dL)	1.0±0.6	1.2±0.6	0.12	1.2±0.6	1.2±0.6	0.63
AST (U/L)	59.5±34.6	58.4±24.8	0.84	48.8±15.3	51.1±20.9	0.55
ALT (U/L)	42.1±31.4	48.2±29.3	0.09	31.9±16.5	39.5±21.3	0.01
PT (seconds)	12.5±1.0	12.4±1.1	0.49	11.6±1.4	11.8±1.5	0.25
hsCRP (mg/L)	8.2±3.3	7.1±0.5	0.15	7.2±0.8	7.4±1.3	0.75
TNF-α(pg/mL)	12.0±3.9	10.0±2.7	0.04	10.8±2.9	12.8±7.2	0.23
MDA(μM)	0.6±0.2	0.6±0.2	0.16	0.6±0.3	0.6±0.2	0.64
VEGF(pg/mL)	200.8±190.9	252.3±181.5	0.11	262.5±183.8	196.0±192.5	0.02

表 5. GK#10 與 placebo 受試者在使用前 Week 0 & Week 13 的血液學及生化學的部分測項結果

	GK#10			Placebo		
	Week 0 mean±SD	Week 13 mean ±SD	p-value	Week 0 mean± SD	Week 13 mean ±SD	p-value
WBC (μL) x 10 ³	5007±2168	5286±2559	0.39	5424±2291	4882±1755	0.2
Hb (g/dL)	13.1±1.8	13.1±2.0	0.89	13.4±2.4	13.2±2.0	0.66
Plt (10 ³ /μl)	106.1±64.6	104.9±50.3	0.83	114.5±49.2	103.2±53.7	0.29
Cr(mg/dL)	0.9±0.3	0.9±0.3	0.16	0.9±0.2	0.8±0.2	0.2
T-Bil (mg/dL)	1.1±0.6	1.2±0.6	0.34	1.2±0.6	1.1±0.6	0.56
AST (U/L)	47.2±16.7	46.5±14.6	0.86	48.8±15.3	50.4±28.7	0.78
ALT (U/L)	32.4±8.0	36.4±8.1	0.16	31.9±16.5	38.1±19.9	0.02
PT(seconds)	12.5±1.0	12.3±1.2	0.25	11.2±0.6	11.5±1.2	0.39
hsCRP(mg/L)	7.2±0.5	7.4±1.6	0.64	7.2±0.8	7.1±0.4	0.7

證明雖然血液及生化學分析上無顯著差異，但仍對受試者產生一定良性影響而感受正向的改變。

此次收案過程中，雖然肝病病人多，但要符合脾腫大且血小板低下至 100,000 / mL

的病人，確不如預期的多。本次試驗結束，發現對病人並無嚴重的併發症，且具有降低發炎的趨勢。在下次的試驗中，可以提高臨床病人病況嚴重程度，以便進一步了解評估 GK#10 對於受試者的益處。

表 6. 比較 GK#10 與 placebo 受試者服用後的生化分析數據變化與改善人數比較

No. (%)	GK#10, N=24	Placebo, N=25	p-value
Cr	13 (52.0)	12 (50.0)	0.18
AST	8 (32.0)	13 (54.2)	0.27
PT	7 (28.0)	6 (25.0)	0.61
hsCRP	5 (20.0)	3 (12.5)	0.82
TNF- α	11 (44.0)	11 (45.8)	0.63

表 7. GK#10 vs. placebo 受試者的血液學及生化學的部分測項比較

No. (%)	GK#10, N=25	Placebo, N=24	p-value
WBC	9 (36.0)	6 (25.0)	0.29
Hb	8 (32.0)	10 (41.7)	0.58
Plt	8 (32.0)	11 (45.8)	0.45
T-Bil	10 (40.0)	7 (29.2)	0.55
ALT	13 (52.0)	11 (45.8)	0.56
MDA	10 (40.0)	13 (54.2)	0.45
VEGF	11 (44.0)	7 (29.2)	0.16

表 8. GK#10 與 placebo 受試者自覺身體變化情形

No. (%)	GK#10, N=25	Placebo, N=24	p-value
better	7 (28.0)	2 (8.3)	0.03
No change/ Not sure	18 (72.0)	22 (91.7)	

參考文獻

- Kang HJ, Im SH. Probiotics as an Immune Modulator. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015; 61:103-5.
- Hinze J, Mahan T. Probiotics and their effect on leaky gut syndrome and associated diseases. *Int J Pharm Compd*. 2000; 4:349-50.
- Shiba H, Zhu X, *et al*. Oxygen consumption predicts outcome in porcine partial liver grafts. *J Surg Res*. 2014; 189:335-9.
- Chen D, Yang Z. Tissue toxicity following the vaginal administration of nanosilver particles in rabbits. *Regen Biomater*. 2015; 2:261-5.
- Chapman TM, Plosker GL *et al*. VSL#3 probiotic mixture: a review of its use in chronic inflammatory bowel diseases. *Drugs*. 2006; 66:1371-87.
- Facchinetti F, Dante G, *et al*. The role of oral probiotic for bacterial vaginosis in pregnant women. *Minerva Ginecol*. 2013; 65:215-21.
- Bai CH, Ma XL. Ultrastructural study on route of gut bacterial translocation in a rat after spinal cord injury. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue ZaZhi*. 2015;31:561-6.
- Sheehy EC, Beighton D, *et al*. The oral microbiota of children undergoing liver transplantation. *Oral Microbio*

- Immunol.* 2000; 15:203-10.
9. Gratz SW, Mykkanen H *et al.* Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2010; 16: 403-10.
10. Haque TR, Barritt AS 4th. Intestinal microbiota in liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016;30:133-142.

致謝：本試驗臨床試驗由成功大學醫學院附設醫院人體研究倫理委員會核准，IRB 編號為：ER-100-162；執行期間：民國 100 年 11 月至民國 101 年 10 月；Clinicaltrials.gov 登記號碼為：NCT01598064；本計畫由葡萄王生技公司經費支持，於成功大學醫學院附設醫院執行。

The Safety of Probiotics for Patient with Cirrhosis-related Portal Hypertension: Clinical Studies

Abstract

Recent medical studies indicate that probiotics can stimulate the intestinal immunity and have many beneficial effects. GK#10, a functional food launched by domestic company, is popular among Taiwanese. The usual consumers are healthy. However, the safety in cirrhotic patients, especially in high risk patients, is not well evaluated. We conducted a clinical trial at National Cheng Kung University Hospital. Forty-nine cirrhotic patients were invited using probiotics, GK #10, when they were discharged from hospital. They were randomized into probiotics using group and non-using group (control) group. The placebo and the probiotics looks the same in appearance and the same taste.

The dose is 4.5×10^{11} cfu/day in probiotics-using group. All patients received blood tests on entering the trial and week 5, 9, and 13, respectively. Our data showed that GK #10 is safe in the high risk cirrhotic patients, as in liver function tests, renal function tests, and clinical outcome. Our study has some limitations because use of not so many patients are recruited, and the observation period was short. However, even in such high risk patients, GK# 10 shows safety in all patients and some beneficial effects in some disease parameters.

Keywords: Probiotics, portal hypertension, clinical trial