

# 调节单胺类神经传导物质之新颖性精神益生菌筛选

林诗伟<sup>1</sup>, 王启宪<sup>1</sup>, 邱俊纮<sup>2</sup>, 李正玮<sup>3</sup>, 赵 敞<sup>3</sup>, 陈炎炼<sup>1</sup>, 陈劲初<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>葡萄王生技股份有限公司, 台湾 桃园

<sup>2</sup>弘光科技大学生物科技学系, 台湾 台中

<sup>3</sup>上海葡萄王企业有限公司, 上海

<sup>4</sup>国立台湾大学食品科技研究所, 台湾 台北

Email: gkbioeng@grapeking.com.tw

收稿日期: 2020年12月24日; 录用日期: 2021年1月7日; 发布日期: 2021年1月20日

## 摘 要

长期暴露于高压环境下将影响大脑中具有调控情绪、行为表现的单胺类神经传导物质如多巴胺和血清素的浓度。精神益生菌被认为可在肠道中刺激神经传导物质的产生, 再经由脑肠轴线的途径而对心理或行为方面产生正面有益的帮助, 因此可利用身心压力的方式诱导类忧郁发生的模式来进行精神益生菌的筛选作业。在实验中, 选用了ICR小鼠进行益生菌喂食两周后执行两周禁饲之测试, 区分为禁饲组(RS)与乳酸菌补充之组别。比较每日管喂 $1.0 \times 10^9$  CFU乳酸菌株对禁饲鼠产生的影响。实验结束后牺牲小鼠, 检测脑部中多巴胺与血清素的浓度, 发现摄取GKF3四周后的小鼠脑中多巴胺与血清素显著的增加( $p < 0.05$ )。这个结果表明了, 发酵乳杆菌GKF3具有精神益生菌的特质, 可应用在预防多巴胺或血清素低落所导致忧郁的脑部疾病预防方面具有的应用潜力。

## 关键词

5-羟色胺, 类忧郁症症状, 多巴胺, 发酵乳杆菌GKF3, 精神益生菌

# A Screen for a Novel Psychobiotic Strain Modulating Monoamine Neurotransmitter

Shih-Wei Lin<sup>1</sup>, Ci-Sian Wang<sup>1</sup>, Chun-Hung Chiu<sup>2</sup>, Cheng-Wei Lee<sup>3</sup>, Chang Zhao<sup>3</sup>, Yen-Lien Chen<sup>1</sup>, Chin-Chu Chen<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering Center, Grape King Bio Ltd., Taoyuan Taiwan

<sup>2</sup>Research Institute of Biotechnology, Hungkuang University, Taichung Taiwan

<sup>3</sup>Shanghai Grape King Enterprise Co., Ltd., Shanghai

<sup>4</sup>Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei Taiwan

**文章引用:** 林诗伟, 王启宪, 邱俊纮, 李正玮, 赵敞, 陈炎炼, 陈劲初. 调节单胺类神经传导物质之新颖性精神益生菌筛选[J]. 生物医学, 2021, 11(1): 1-7. DOI: 10.12677/hjbm.2021.111001

## Abstract

Long-term exposure to stress can affect the concentration of monoamine neurotransmitters such as dopamine (DA) and serotonin (5-HT) in the brain which is linked to certain symptoms of depression. Psychobiotics, the probiotics which stimulate the neurotransmitters via gut-brain axial and benefit the mental health, were screened by the stress-induced depressive-like behavior in mice. Twenty-five ICR mice were divided into five groups as follows: restraint-stressed group (RS), RS+ probiotics *Lactobacillus plantarum* GKM3 group, RS+ probiotics *L. reuteri* GKR1 group, RS+ probiotics *L. fermentum* GKF3 group, and RS+ probiotics *L. plantarum* group (isolated from a commercial product). After two weeks of probiotics consumption at dosage  $1.0 \times 10^9$  CFU/mice/day, mice were immobilized in restrainers for two hours once a day for two weeks. The probiotics strain GKF3 was selected as shown significant increases in levels of DA and 5-HT in the brain after four weeks of the experiment ( $p < 0.05$ ). These results suggested the potential applications of psychobiotics, *L. fermentum* GKF3, in the prevention of depression-related brain diseases.

## Keywords

5-Hydroxytryptamine, Depressive-Like Behavior, Dopamine, *Lactobacillus Fermentum* GKF3, Psychobiotics

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

益生菌(probiotics)在全球由成千上万的科研团队研究下,接二连三地被发现、被开发、被验证其机能性并广受肯定。至今,最新的研究进一步显示益生菌对于脑部调控具有密切的关联性,其由 Logan 及 katzman 在 2005 年首次提出了益生菌可能与忧郁症具有关联性的论述[1]。后来在 Barrett 进一步的提出了具有改善短链脂肪酸浓度而减缓精神相关压力所引起的肠胃道敏感性腹泻的潜力[2]重此开启了益生菌用于脑部代谢相关研究的新蓝海。

综合多年研究的积累,于 2013 年 Timothy G. Dinan [3]提出了精神益生菌(Psychobiotics)的定义,被认为精神益生菌是一种新机能性益生菌,具有产生或影响具有神经传导活性之功能,透过这些物质能影响肠-脑之间的双向沟通,不再是单向传递讯息。因双向沟通而经由肠道影响脑部活性,进而产生类似抗忧郁或焦虑的机能性。

菌-脑-肠轴线是现在精神益生菌研究的理论基础,目前肠道菌数量比人体细胞总数多了一倍,但肠道菌调控基因总数比人体增多了 150 倍以上!是个非常复杂与难解的微生物菌相生态圈。随着神经科学的研究,更发现肠道周遭除了免疫细胞之肠道免疫外,更是含有充沛与复杂的神经系统,超过一亿个以上神经细胞,散布在肠道周遭。因此在 1999 年,Michael [4]即提出了第二大脑的概念,认为肠道因具有大量神经细胞,因此具有独自思考、感觉、学习及记忆的功能性。近年来,更因肠道中富

含的菌相及基因产生了, 各种神经传导物质因此可反馈影响大脑的活性, 因此菌 - 肠 - 脑轴线的概念就此产生[5] [6] [7] [8]。

在菌肠脑轴线中, 负责联系沟通的物质即是神经活性船讨物质, 具有神经传导活性的物质被定义为:

1) 于神经元内被制造出来; 2) 该神经活性物质在神经元内储存; 3) 可被刺激而释放, 进行神经细胞间的讯息传递; 4) 具有回收机制或在体内可被分解而改变活性; 5) 可被人工调节, 产生之生物效应影响神经细胞活性。

目前跟肠道有关的神经活性物质大致可分为三大类:

1) 单胺类(monoamine): 如多巴胺(dopamine、DA)、血清素(Serotonin、5-HT)、正肾上腺素(noradrenaline、NA)、肾上腺素(epinephrine)、及褪黑激素(melatonin)。

2) 氨基酸类: 如氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid、GABA)、麸胺酸(glutamate)、丝胺酸(serine)及天门冬胺酸(aspartate)。

3) 其他类如: 乙酰胆碱(acetylcholine)、一氧化氮(nitric oxide)及组织胺(histamine)等等。

神经传导物质过多或过少都可能产生失调现象, 最常见的神经传导物质中, 以血清素、多巴胺及正肾上腺素为代表:

1) 血清素: 使人产生满足感的重要贺尔蒙, 浓度不足时, 容易产生焦虑或情绪低落等等的行为表现。

2) 多巴胺: 为脑部维持活动力的关键贺尔蒙, 使人散发热情与活动力, 浓度低时, 容易产生丧志等特性, 浓度高时却又容易较为亢奋甚至癫痫等副作用。

3) 正肾上腺素: 具有振奋人心的关键贺尔蒙, 通常处于高压紧张状态下容易提升正肾上腺素浓度, 但久易导致中枢神经或心血管相关病变。

肠道表面树突中的神经细胞与肠道细胞存在着交互作用关系, 受到肠内菌相引起的免疫系统调控[9], 能防止细菌在肠道引起发炎或感染等等相关疾病。另一方面指出, 树突细胞受到肠道细胞所调控之免疫系统细胞激素所影响[10], 能够通过细胞激素调节肠道神经, 分泌上述多种神经传导物质。

因此推论益生菌透过脑 - 肠 - 调控之可能性为: 1) 益生菌分泌相关神经传导物质或脑源性滋养因子; 2) 调控肠道附近神经; 3) 保护肠道黏膜完整性, 降低肠漏现象; 4) 调控肠道黏膜免疫系统。

从脑部开始调控改变肠道菌项之可能性为: 1) 影响肠道黏膜细胞活性; 2) 调控肠道蠕动; 3) 影响肠道通道性; 4) 调控免疫系统。

目前研究推论为的关键在于迷走神经(vagus nerve), 其负责联系菌 - 肠 - 脑轴线之反应, 主要原因是迷走神经具有大脑与肠道双向沟通之特性, 在肠道中更可受到肠内菌之内毒素、肿瘤坏死因子- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  等等细胞激素之影响, 这些关键性细胞激素, 在肠道中具有调控发炎或抑制发炎等等的相关机能性, 因而经由迷走神经反向联系脑部, 进而改变 ENS-CNS 双向神经讯息[11]。

因此可进一步的运用动物实验模式, 给予刺激伤害后, 诱导实验鼠产生类忧郁或类焦躁行为, 改变神经系统中的神经传导物质浓度改变而产生动物行为上的偏差, 藉此由精神益生菌的介入或预防, 进行实验鼠的治疗或改善特性分析, 以用来开发效果更显著之精神益生菌。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验菌株

经体外细胞实验与动物实验筛选具有降低发炎因子之菌株, 可调控发炎相关细胞激素之益生菌进行下列实验。

1) 植物乳杆菌 GKM3: 自传统发酵泡菜分离筛选获得, 经 16SrRNA 鉴定为发酵乳杆菌并寄存于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 菌种编号: CGMCC NO.14565。

2) 罗伊氏乳杆菌 GKR1: 自婴儿粪便检体中分离筛选获得, 经 16SrRNA 鉴定为发酵乳杆菌并寄存于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 菌种编号: CGMCC NO.15201。

3) 发酵乳杆菌 GKF3: 自传统发酵泡菜分离筛选获得, 经 16SrRNA 鉴定为发酵乳杆菌并寄存于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 菌种编号: CGMCC NO.15203。

4) 市售品分离植物乳杆菌 PS 株: 市售多国专利具有神经调节机能性之益生菌株, 经 16SrRNA 鉴定确认为植物乳杆菌, 以进行对照组设定使用。

## 2.2. 益生菌冻干粉未制备

实验所用从 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻库中取出保存管, 经  $37^{\circ}\text{C}$  水浴退冰后, 在无菌操作台中, 菌液经四分画线分离于 MRS agar 平板后反置, 经过  $37^{\circ}\text{C}$  40~48 小时培养后, 挑取单一菌落于各别培养于 1 L MRS 培养基中, 经  $37^{\circ}\text{C}$ 、16 小时静置培养后, 以 5000 RPM、 $25^{\circ}\text{C}$ 、离心 10 分钟取得菌泥, 混入菌泥重量相当之 20% 脱脂乳粉水溶液后冷冻干燥而得。冷冻干燥研磨过筛 20 目之粉末, 调整菌数为  $1 \times 10^{11}$  cfu/g 保存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 备用。

## 2.3. 试验动物与饲养

本次试验遵守动物伦理委员会 3R 规范, 以八周大 SPF 级 ICR 小白鼠进行试验, 体重介于 20~25 g 之雄性小白鼠经一周稳定其后进行六周的实验饲养。动物房温度控制在  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 湿度控制在 60%~80%, 光照与黑暗各十二小时(07:00~19:00 为光照期; 19:00~07:00 为黑暗期)。

## 2.4. 样品分析试剂

1) 血清素(5-HT) ELISA 套组: BioVision, Inc. Milpitas, CA。

2) 多巴胺(DA) ELISA 套组: BioVision, Inc. Milpitas, CA。

## 2.5. 实验流程

ICR 小鼠经过 7 天适应期之后随机分为五组, 造症组每日喂食 0.85% 食盐水 100  $\mu\text{L}$ /mice, 其余四组每组分别喂食不同乳酸菌样品, 乳酸菌喂食剂量为  $1.0 \times 10^9$  cfu/mice, 连续 14 天。经过 14 天喂食后开始, 开始进行类忧郁模式造症。每只小鼠禁锢于 30 mm  $\times$  100 mm 之小鼠抽血固定器中, 每天禁锢 2 小时并每日喂食试验物。连续禁锢 14 天后牺牲, 随即取出脑部组织, 并以液态氮冻结后研磨均质化, 所得之脑部组织保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中, 再以商业套组 ELISA 进行脑部组织中, 多巴胺(DA)与血清素(5-HT)含量分析。

## 2.6. 统计分析

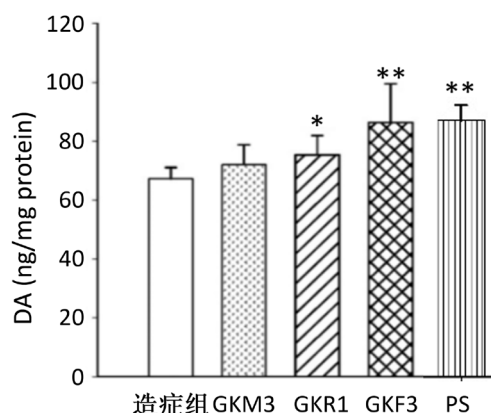
统计分析实验数据使用 SPSS 计算机统计软件进行分析。变异数分析则以 PROC ANOVA 与 Duncan's multiple range test 进行分析,  $p < 0.05$  为具有显着性差异。

# 3. 结果

## 3.1. 多巴胺含量分析

经过类忧郁症试验后可以发现三株乳酸菌对于小鼠脑内多巴胺浓度具有不同程度的调控性, 如图 1 所示。每日喂食 GKF3 发酵乳杆菌之小鼠脑内具有最高浓度的多巴胺, 证明在禁锢试验中, GKF3 发酵乳杆菌可以有效地刺激性脑内多巴胺分泌, 维持多巴胺浓度, 对于外在因素破坏脑内多巴胺浓度具有最佳保护性, 其多巴胺浓度达到统计上的差异, 与造症组相比提高了 27%, 效果显着。其次佳者为 GKR1 罗伊氏杆菌, GKR1 益生菌株在本次试验中, 具有提升多巴胺 15% 之结果且达统计差异( $P < 0.05$ )略差于

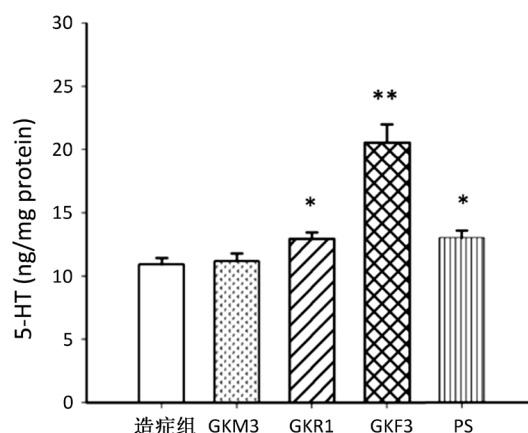
GKF3 株。在先前试验中, 具有消炎能力极佳之 GKM3 植物乳杆菌株则无显著差异, 但是市售调节脑常轴线之植物乳杆菌 PS 株, 在本试验中也被证实具有提升脑内多巴胺的能力, 效果与 GKF3 相当, 两者间无显著差异, 证实乳酸菌对于脑内多巴胺调控具有显著的差异性且其中存在着菌株的差别, 不同株之间植物乳杆菌同时存在着菌株间的差异。



**Figure 1.** The concentration analysis of the dopamine in brain of mice which use probiotics to anti-depression like symptoms  
**图 1.** 乳酸菌株用于预防类忧郁症老鼠试验中, 小鼠脑内多巴胺浓度分析

### 3.2. 血清素浓度分析

在血清素分析的方面发现, GKF3 发酵乳杆菌组具有最高的血清素浓度, 经图 2 的结果可发现, 浓度可达 21 ng/mg, 较造症组 11 ng 增加了 90%, 具有十分显著的提高, 并达到统计上的差异性( $P < 0.01$ )。再次高组中, 可发现 GKR1 及 PS 株同样具有显著的血清素刺激性, 可以刺激血清素浓度达到 13 ng/mg, 对比造症组 18% 的增加。但是 GKM3 植物乳杆菌则无差异。



**Figure 2.** The concentration analysis of the serotonin in brain of mice which use probiotics to anti-depression like symptoms  
**图 2.** 乳酸菌株用于预防类忧郁症老鼠试验中, 小鼠脑内血清素浓度分析

## 4. 讨论

根据世界卫生组织评估, 忧郁症将成为全球导致人类失能疾病的第二位。当全球化的影响, 社会环境变迁加速, 人们面临工作压力或是生活上家庭上的变故, 将更易产生忧郁的情绪, 如同遭禁锢的老鼠般, 易因为内分泌或细胞激素受到压力影响而导致罹患忧郁症的风险增加。此现象的发生被认为与脑内

神经传导物质浓度愈有密切关联性。具有神经传导活性物质主要可在神经系统中被传递、储存或代谢而进行神经细胞间的讯息传递与维护正常机能。目前医学上针对忧郁症患者药物治疗的角度往往锁定于补充神经传导物质、抑制神经传导物质被代谢或较不易被代谢且具有相同活性知之结构物, 以达到提高神经传导方面的活性。但这些方法往往效果较为不佳, 也因此迫切地寻找是否更安全且有效的方法来进行脑部神经传讨方面异常之改善方式。

脑内具有神经传讨因子之活性物质可分为三类: 1) 单胺类: 如多巴胺、血清素、正肾上腺素等; 2) 胺基酸类: 胺基丁酸、麸胺酸、丝胺酸等等; 3) 其他类如: 乙酰胆碱、一氧化氮及组织胺等等。脑内神经传导物质若以摄取的方式补充, 绝大多数因无法通过大脑屏障而无法呈现活性, 因此往往导致口服或静脉注射无效。因此藉由给予刺激物的方式, 提高自体神经传导活性物质浓度, 是目前认为效益较佳的方式。

精神益生菌被认为可以有效提升单胺类神经传导物质, 因此在本实验中, 我们锁定多巴胺与血清素作为评估的依据, 在图 1 脑内多巴胺及图 2 血清素浓度的结果显示了, 禁烟所产生的类忧郁诱导行为, 对实验鼠脑内与忧郁症密切相关的神经传导物产生实质且显著的调降, 而这些忧郁的现象, 可藉由精神益生菌的补充, 而得到了缓解改善, 证实了来自肠道的回馈控制讯号——也就是脑肠轴线的调控[12] [13], 随着科学对肠道的了解, 许多单胺类神经传导物质可由肠道中所合成[14], 合成后的神经传导物质藉由肠道周遭的迷走神经负责联系脑部, 因此过度活耀的肠道或脑部, 都将互相影响。最典型的脑部压力影响肠胃道的案例即是紧张、压力所引起的肠躁症[15]。在这次的实验中, 我们假设环境因素引起肠炎而导致脑部荷尔蒙的变化, 故挑选具抗发炎机能性之菌株, 经由禁烟的方式, 使的小鼠产生类忧郁症。在实验中可以发现摄取 GKF3 发酵乳杆菌具有显着提升单胺类神经传导物质血清素及多巴胺的效果, 在多巴胺的浓度方面与据有神经调节之菌株 PS 株效果类似, 但是在血清素方面, 则 GKF3 及 PS 株具有显着的差异, 这个结果告诉了我们多巴胺与血清素之间, 并无绝对正相关的关系, 两者菌株之间 GKF3 针对血清素的刺激性更佳。若以多巴胺为考虑, 则两者无差异, 但是若希望以血清素为指标的提升, GKF3 株将优于 PS 株。植物乳杆菌 GKM3 在血清素测试中几乎无异于造症组, 证实了刺激脑部荷尔蒙变化的脑肠轴线与免疫系统调节路径具有差异, 提升脑中或肠道中血清素有助于体内发炎的调控, 但是发炎反应的调节与血清素的调控无绝对相关[16]。精神益生菌的筛选与开发工作将随着文明的发展、社会的进步而更显重要, 如何进一步筛选找寻具有更佳脑部神经活性调节之机能性。在初步成功筛选具有大幅度提升脑内单胺类之后, 下一步将持续重复筛选及进行忧郁症行为模式改善评估与下一阶段的临床人体试验评估, 期待能找寻显着且有效的脑部益生菌。

## 参考文献

- [1] Logan, A.C. and Katzman, M. (2005) Major Depressive Disorder: Probiotics May Be an Adjuvant Therapy. *Medical Hypotheses*, **64**, 533-538. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.08.019>
- [2] Barret, E., et al. (2012) Bifidobacterium Breve with Alpha-Linolenic Acid and Linoleic Acid Alters Fatty Acid Metabolism in the Maternal Separation Model of Irritable Bowel Syndrome. *PLoS ONE*, **7**, e48159. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048159>
- [3] Dinan, T.G., Stanton, C. and Cryan, J.F. (2013) Psychobiotics: A Novel Class of Psychotropic. *Biological Psychiatry*, **74**, 720-726. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.05.001>
- [4] Carabotti, M., et al. (2015) The Gut-Brain Axis: Interactions between Enteric Microbiota Central and Enteric Nervous System. *Annals of Gastroenterology*, **28**, 203-209.
- [5] Moloney, R.D., et al. (2014) The Microbiome: Stress, Health and Disease. *Mammalian Genome*, **25**, 49-74. <https://doi.org/10.1007/s00335-013-9488-5>
- [6] Collins, S.M., Surette, M. and Bercik, P. (2012) The Interplay between the Intestinal Microbiota and the Brain. *Nature Reviews Microbiology*, **10**, 735-742. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2876>

- 
- [7] Forsythe, P., *et al.* (2010) Mood and Gut Feelings. *Brain, Behavior, and Immunity*, **24**, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.05.058>
- [8] Gershon, M.D. (1999) The Enteric Nervous System: A Second Brain. *Hospital Practice*, **34**, 31-52. <https://doi.org/10.3810/hp.1999.07.153>
- [9] Macpherson, A.J. and Slack, E. (2007) The Functional Interactions of Commensal Bacteria with Intestinal Secretory IgA. *Current Opinion in Gastroenterology*, **23**, 673-678. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f0d012>
- [10] Goehler, L.E., *et al.* (1999) Interleukin-1 Beta in Immune Cells of the Abdominal Vagus Nerve: A Link between the Immune and Nervous System? *Journal of Neuroscience*, **19**, 2799-2806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-07-02799.1999>
- [11] Ghia, J.E., *et al.* (2006) The Vagus Nerve: A Tonic Inhibitory Influence Associated with Inflammatory Bowel Disease in a Murine Model. *Gastroenterology*, **131**, 1122-1130. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.08.016>
- [12] Allison, C. and Núria, M. (2016) Exercise-Induced Stress Behavior, Gut-Microbiota-Brain Axis and Diet: A Systematic Review for Athletes. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **13**, Article No.43. <https://doi.org/10.1186/s12970-016-0155-6>
- [13] Camila, G., *et al.* (2019) Do Your Gut Microbes Affect Your Brain Dopamine? *Psychopharmacology*, **236**, 1611-1622. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05265-5>
- [14] Desbonnet L., Garrett L. and Clarke G. (2010) Effects of the Probiotic Bifidobacterium Infantis in the Maternal Separation Model of Depression. *Neuroscience*, **170**, 1179-1188. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.005>
- [15] Zhou, Y., Han, S. and He, Y. (2019) Clinical Effects and Safety of Tongxieyaofang on Diarrhea Predominant Irritable Bowel Syndrome: A Meta-Analysis of Randomized Trials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2019**, Article ID: 4893876. <https://doi.org/10.1155/2019/4893876>
- [16] Suhrid, B., Jean-Eric, G. and Waliul, I.K. (2019) Serotonin in the Gut: Blessing or a Curse. *Biochimie*, **161**, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.008>