

## 新颖植物乳杆菌、乳酸菌组合物及其用以治疗或预防重金属相关疾病的用途

### 技术领域

本发明有关于一种微生物的第二用途，特别指一种新颖植物乳杆菌、乳酸菌组合物及其用以治疗或预防重金属相关疾病的用途。

### 背景技术

重金属污染指环境受到重金属或其化合物等物质污染，主要会是由工业排放物、交通工具排放废气、污水等人为原因所造成，而基于重金属具有不易移动及不易溶解的特性，因此，当个体长期或大量接触到环境中存在的金属污染物时，会造成慢性中毒的现象发生，目前对于人体健康伤害最大的重金属包含有铅、汞、砷、镉、铬。

所谓铅中毒指人接触到铅或其化合物造成的中毒现象，其中，大多铅中毒的发生为通过吸入方式进入人体，例如机车废气、含有铅微粒的空气等，进入到人体内的铅会被小肠吸收而储存于体内；而儿童若接触到含铅的物品时，铅会经由皮肤被吸收进入人体。基于铅不易于被人体排出体外，因此，若长时接触会造成各器官的危害，尤其以神经系统及消化系统的影响最巨。举例来说，儿童若长期铅中毒会造成脑部损害、瘫痪等病症发生。

由上可知，重金属及其化合物为人体健康的一大杀手，但是却无法避免于环境中接触到重金属及其化合物，因此，开发出一种能够有效排出体内重金属的产品为当务之急。

### 发明内容

本发明的主要目的在于提供一种新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003，其科学命名为：植物乳杆菌植物亚种（*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum*）NBM-01-07-003，保藏单位为：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；地址为：北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所；保藏日期为：2018年9月4日；保藏编号为：CGMCC No. 16417。

该菌也于2017年12月15日，保藏于中国台湾新竹财团法人食品工业发展研究所，保藏编号：BCRC910809。

本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003具有吸附金属的用途，亦即该新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003能够于体内或体外吸附金属或其化合物，

以达到预防或/及治疗金属中毒或其相关并发症的功效。具体来说，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003具有清除铅或其化合物的能力。

换言之，通过投予本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003或是含有本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003的组合物至一个体体内，或是将本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003或是含有本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003的组合物使用于环境当中，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003能附着于肠道细胞及皮肤细胞上，能够有效吸附重金属离子，降低生物体内或环境中的重金属含量，以达到预防或治疗重金属引发的相关疾病，例如中枢及周边神经系统损害、记忆力衰退和儿童智力递减、反社会行为、血红蛋白合成受损、肾功能受损、耳聋、失明、发育迟缓、性欲减退、发炎、自体免疫疾病等。因此，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003组合物能作为一外用组合物或一内用组合物的有效成分。

其中，该外用组合物可为一喷剂。

其中，该内用组合物可为一食品、一营养补充品、一添加剂等。

在本发明所揭一实施例中，提供一种乳酸菌组合物，包含有一有效量的本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003。

在另一具体实施例中，该乳酸菌组合物更包含有一乳酸乳杆菌（*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*）。

具体来说，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003与该乳酸乳杆菌可以重量比1: 1的比例混合而形成一组合物。

更进一步来说，上述实施例中所揭乳酸菌组合物能够具有吸附重金属的用途，并且，能够依据本发明所属技术领域的技术人员而被制备为一食品、一外用剂型等，应用于人体或是体外。

上述实施例中所揭乳酸菌组合物具有治疗或/及预防重金属中毒的用途，亦即投予一有效量的乳酸菌组合物至一个体，能够吸附细胞内的重金属，以达到清除人体吸入的金属或其化合物的功效，进而预防或治疗重金属引发的疾病。

## 附图说明

图1为以电子显微镜观察本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003的结果。

图2为本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003以16S rDNA鉴定的结果。

图3为NBM-04-10-001菌株以16S rDNA鉴定的结果。

图4为乳酸菌样品分别对于人类HaCaT细胞进行吸附试验的结果，上图

为NBM-04-10-001菌株吸附试验的结果，下图为NBM-01-07-003菌株吸附试验的结果。

图5为乳酸菌样品分别对于人类Caco-2细胞进行吸附试验的结果，上图为NBM-04-10-001菌株吸附试验的结果，下图为NBM-01-07-003菌株吸附试验的结果。

图6为乳酸菌样品刺激HaCaT细胞分泌IL-6的结果。

图7为乳酸菌样品添加LPS刺激HaCaT细胞分泌IL-6的结果。

图8为乳酸菌样品刺激HaCaT细胞分泌IFN- $\gamma$ 的结果。

图9为乳酸菌样品添加LPS刺激HaCaT细胞分泌IFN- $\gamma$ 的结果。

图10为乳酸菌样品刺激HaCaT细胞分泌IL-8的结果。

图11为乳酸菌样品添加LPS刺激HaCaT细胞分泌IL-8的结果。

图12为乳酸菌样品刺激Caco-2细胞分泌IL-8的结果。

图13为乳酸菌样品添加LPS刺激Caco-2细胞分泌IL-8的结果。

图14为乳酸菌样品刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7分泌IL-6的结果。

图15为乳酸菌样品添加LPS刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7分泌IL-6的结果。

图16为乳酸菌样品刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7分泌TNF- $\alpha$ 的结果。

图17为乳酸菌样品添加LPS刺激小鼠巨噬细胞RAW264.7分泌TNF- $\alpha$ 的结果。

图18以电子显微镜观察未经过重金属试验的菌体。

图19以电子显微镜观察经过重金属试验的菌体。

图20为第一组至第三组大鼠经不同处理后，其肝脏切片染色的结果。

图21A为第一组大鼠的肝脏切片染色的结果。

图21B为第二组大鼠的肝脏切片染色的结果。

图21C为第三组大鼠的肝脏切片染色的结果。

### 具体实施方式

本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003（下称NBM-01-07-003），其科学命名为：植物乳杆菌植物亚种（*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum*）NBM-01-07-003，保藏单位为：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；地址为：北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所；保藏日期为：2018年9月4日；保藏编号为：CGMCC No. 16417。同样于2017年12月15日，保藏于中国台湾新竹财团法人食品工业发展研究所，保藏编号为：BCRC910809。

更进一步来说，请参阅图1，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003分离自婴儿粪便，为格兰氏阳性杆菌，不具触酶、氧化酶及运动性，不会产生内生孢子，在好氧或厌氧环境下皆会生长。新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003可在37℃下培养于MRS培养基中。新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003以16S rDNA鉴定结果如图2所示，即Seq ID No.1，经比对可知本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003接近*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum*、*Lactobacillus plantarum subsp. argentoratensis*、*Lactobacillus plantarum*及*Lactobacillus plantarum subsp. fabifermentant*，相似度为99%，亦即本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003为新颖菌株。

本发明实例中所使用的乳酸乳杆菌（*Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*）被命名为NBM-04-10-001（下称NBM-04-10-001），其分离自发酵乳，为格兰氏阳性杆菌，不具触酶、氧化酶及运动性，不会产生内生孢子，在好氧或厌氧环境下皆会生长。请参阅图3，即Seq ID No.2，经过16S rDNA序列分析及API鉴定系统分析可知，本发明实例中所使用的NBM-04-10-001菌株为乳酸乳杆菌，为商业上可购得的微生物（寄存編號為ATCC 12315，自台灣財團法人食品工業研究所購入），故不需要进行寄存。

以下，将通过若干实例并搭配图表，更进一步说明本发明的功效如后。

#### 实例一：乳酸菌吸附试验

取24孔培养盘，每孔加入1ml细胞悬浮液，细胞浓度调至 $5 \times 10^4$  cell/mL，均匀混合后放入37℃、5%二氧化碳培养箱培养隔夜，使细胞贴附生长。确认细胞完全贴附后，将旧培养基吸出，以磷酸盐缓冲液清洗后，加入900μL新鲜培养基与100μL以细胞培养基回溶的乳酸菌样品（ $10^7$  CFU/mL），再放入37℃、5%二氧化碳培养箱培养2小时，而后将培养液吸出，再以磷酸盐缓冲液清洗后，每孔加入200μL的6~10%福马林作用30分钟，使菌体和细胞固定于孔盘中。移除福马林，以磷酸盐缓冲液清洗，再加入200μL结晶紫作用5分钟，进行染色，并以倒立式荧光显微镜观察计数细胞上乳酸菌数量。

在本实例中，所使用的细胞为人类直肠癌细胞C2BBel细胞株（以下简称人类Caco-2细胞株）及人类皮肤角质层细胞HaCaT细胞株（以下简称人类HaCaT细胞株）；培养基为DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）培养基；乳酸菌为NBM-04-10-001、NBM-01-07-003。

结果如下表一、表二及图4、图5所示。

表一：人类HaCaT细胞株对于乳酸菌的吸附能力

| 乳酸菌样品 | 吸附个数 |
|-------|------|
|-------|------|

|               |           |
|---------------|-----------|
| NBM-04-10-001 | 太多不可数     |
| NBM-01-07-003 | 36.2±7.66 |

表二：人类Caco-2细胞株对于乳酸菌的吸附能力

| 乳酸菌样品         | 吸附个数      |
|---------------|-----------|
| NBM-04-10-001 | 42.1±9.72 |
| NBM-01-07-003 | 50.6±5.58 |

由于先前文献指出乳酸菌在猪的鳞状上皮细胞附着 $15e$ 个菌体以上时，则可认为该乳酸菌具有附着能力，因此，由表一、二及图4、图5的结果可知，本实例中所使用的乳酸菌样品分别对于人类HaCaT细胞及人类Caco-2细胞株具有良好的附着力，其中，又以NBM-04-10-001对于人类HaCaT细胞的附着力较佳；NBM-01-07-003对于人类Caco-2细胞株的附着力较佳。

因此，由上述结果可知，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003对于肠道具有良好的附着能力，显示本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003能够在体内或体外中发挥功效。

#### 实例二：乳酸菌对于细胞的免疫试验

将细胞培养至24孔培养盘，每孔加入一预定浓度的1ml细胞悬浮液，之后加入100 $\mu$ L乳酸菌菌液，菌数分别为 $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ cfu/mL，或LTA裂解液共同培养24小时，作用时间结束后收集其上清液，并以市售ELISA套组进行分析。

在本实例中，所用于测试的细胞及其浓度分别为：人类CaCo-2细胞，浓度调至 $1 \times 10^5$ cell/ml；人类HaCaT细胞，浓度调至 $9 \times 10^4$ cell/ml；小鼠巨噬细胞RAW264.7，浓度调至 $2 \times 10^5$ cell/ml。并且，使用的乳酸菌菌液来自于NBM-04-10-001、NBM-01-07-003，结果如图6至图17所示。

由图6及图7的结果可知，人类HaCaT细胞无论是直接与各乳酸菌作用，或是与乳酸菌添加LPS刺激后作用，NBM-04-10-001及NBM-01-07-003能在菌数为 $10^9$ 或 $10^8$ cfu/ml时有效降低IL-6的分泌量，显示本发明所揭NBM-01-07-003能降低刺激细胞产生免疫反应；由图8及图9的结果可知， $10^9$ cfu/ml的NBM-04-10-001与人类HaCaT细胞共培养后，可以显著提升细胞IFN- $\gamma$ 分泌量，进而达到减少IL-4表现量及诱发Th1发炎反应的功效。

由图10及图11的结果可知， $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ cfu/ml的LAB-001或 $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ cfu/ml的NBM-04-10-001与人类HaCaT细胞系能够显著降低细胞IL-8的分泌量，降低发炎反应、血管新生的作用发生。而由图9及图10的结果

可知，当NBM-04-10-001及NBM-01-07-003能在菌数为 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ cfu/ml时有效降低IL-8的分泌量。

更进一步地由图14至图15的结果可知，对于本身会分泌免疫因子的小鼠巨噬细胞RAW264.7来说，NBM-04-10-001及NBM-01-07-003能够降低IL-6的分泌量，并且，随着菌数增加，降低的效果越佳。由图16及图17的结果可知，无论小鼠巨噬细胞RAW264.7是否有接受LPS刺激，添加NBM-04-10-001及NBM-01-07-003能够降低TNF- $\alpha$ 。

#### 实例三：铅吸附试验

本实例以分别以铅吸附液与水、EDTA、NBM-04-10-001及NBM-01-07-003、市售优格粉、待测样本进行培养，培养后再以分光光度计测量吸光值，以换算出得到铅清除率，结果如下表三所示。

表三：铅清除率

|               | 清除率(%) | 清除率(%) | 清除率(%) | 平均清除率(%) | SD 值 |
|---------------|--------|--------|--------|----------|------|
| 水             | 0.0    | 0.0    | 0.0    | 0.0      | 0.0  |
| EDTA          | 105.4  | 110.6  | 103.2  | 106.4    | 3.8  |
| NBM-04-10-001 | 75.5   | 86.2   | 80.0   | 80.6     | 5.4  |
| NBM-01-07-003 | 88.1   | 91.0   | 91.1   | 90.0     | 1.7  |

由表三的结果可知，本发明所揭NBM-04-10-001及NBM-01-07-003的乳酸菌确实能够有效地吸附铅，并达到清除铅的功效。

#### 实例四：体外试验

取NBM-04-10-001菌株及NBM-01-07-003菌株，将该两菌株以重量比1:1的比例混合，形成混合菌粉。

取0.1g混合菌粉回溶于1mL去离子水中，取1mL加入10mL 1ppm的铅标准溶液中，在37℃反应1小时。将重金属悬浮液于12000rpm离心5分钟去除沉淀物（菌泥）取出上清液。将上清液以0.22 $\mu$ m滤膜过滤后并利用感应耦合电浆原子发射光谱仪（ICP-OES）进行分析，显示混合菌粉清除10mL中1ppm的铅金属离子能力为57.21 $\pm$ 0.06%。由此可知，本发明所揭NBM-01-07-003菌株或是含有本发明所揭NBM-01-07-003菌株的组合物确实能够吸附铅溶液1ppm浓度中50%以上的铅金属离子。

另将菌泥放置离心试管中进行冷冻干燥。观察的干燥菌泥菌相分别分为：控制组(未经过重金属吸附试验)及重金属试验组(已经过重金属吸附试验)，以观察菌体吸附重金属铅的变化。由此结果显示为吸附重金属的菌粉呈现紧密连结的现象（如图18），而吸附重金属的菌粉，虽然菌体外型完整，但其表面附着破碎及破碎物质并产生粘稠物质，显示本发明所揭NBM-01-07-003菌株确实能够吸附且聚集重金属（如图19）。

#### 实例五：动物试验（一）

取六周龄Wistar雄性大鼠（购于乐斯科生物科技股份有限公司），平均分配为3组，每组6只，其中，第一组为空白组；第二组为硝酸铅中毒组，硝酸铅剂量为1/50大鼠半致死剂量（LD50）：45mg/kg；第三组为混合菌粉组，投予剂量为45mg/kg的硝酸铅，混合菌粉剂量为20~21mg/kg/day，其中，混合菌粉中含有NBM-04-10-001菌株及NBM-01-07-003菌株，并且，该两株菌株以重量比1：1的比例混合，而混合菌粉于硝酸铅投予后两小时再经口喂食。

实验过程中分别测量各组大鼠的体重变化，结果如表四所示，并且，每两周采血检测各组大鼠血液中铅含量，结果如表五所示，其中，ND表示血铅含量小于0.1ppb。而于实验结束后牺牲各组大鼠，对其肝脏、肾脏进行切片观察，结果如图20所示。

由下表四的结果可知，第一组至第三组大鼠的摄食量无明显差异。

由表五的结果可知，第二组大鼠的血铅含量持续为2.5~3.1ppb，而相较于第二组大鼠，于第三组中的各该大鼠血液中未为检测出铅，显示投予本发明所揭NBM-01-07-003菌株或是含有本发明所揭NBM-01-07-003菌株能够有效清除及吸附动物血液中重金属铅量。

而由图20的结果可知，第一组大鼠的肝细胞紧密排列，且核仁明显、无细胞破损、肿胀、核溶解症状及空泡等情形存在；第二组大鼠的肝细胞孔隙明显变大，出现局部小范围的坏死细胞、核浓缩及溶解的现象，显示第二组大鼠的肝细胞受到铅影响而引起肝损伤；相较于第二组大鼠来说，被投予含有本发明所揭NBM-01-07-003菌株的组合物的大鼠，其肝细胞的受损情形明显降低，甚至相近于第一组大鼠的肝细胞，显示本发明所揭NBM-01-07-003菌株或是含有本发明所揭NBM-01-07-003菌株的组合物不仅能够清除组织中的铅，使铅不累积于组织或细胞内，并且能够减轻组织或细胞的氧化反应，逆转重金属对于器官造成的损害或病变。

表四：各组大鼠体重及摄食量变化

| 组别 | 体重(g)        |              |            |            |             |
|----|--------------|--------------|------------|------------|-------------|
|    | 起始           | 最终           | 体重增加百分比(%) | 每日增加体重(g)  | 摄食量(g/day)  |
| 1  | 194±58.67    | 353.82±34.82 | 158.82%    | 11.42±2.37 | 57.6±12.59  |
| 2  | 240.17±17.28 | 374.33±23.04 | 134.16%    | 9.58±0.97  | 58.12±11.43 |
| 3  | 240.33±9.63  | 355.63±16.84 | 147.97%    | 8.24±0.75  | 54.54±12.10 |

表五：各组大鼠的血铅含量

| 组别 | 血铅含量(ppb) |       |       |       |       |       |
|----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | 第 1 只     | 第 2 只 | 第 3 只 | 第 4 只 | 第 5 只 | 第 6 只 |
| 1  | ND        | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 2  | 3.1       | 2.9   | 2.5   | 2.1   | 2.5   | 2.6   |
| 3  | ND        | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |

## 实例六：动物实验（二）

本实例的设计大致上与实例五相同，惟，不同在于将硝酸铅更换为硝酸砷，投予剂量为1mg/kg（1/40大鼠半致死剂量，LD50）。简单来说，本实例中将大鼠分为3组，其中，第一组为空白组；第二组为硝酸砷中毒组，硝酸砷剂量：1mg/kg；第三组为混合菌粉组，投予剂量为1mg/kg的硝酸砷，混合菌粉剂量为20~21mg/kg/day，其中，混合菌粉中含有NBM-04-10-001菌株及NBM-01-07-003菌株，并且，该两株菌株以重量比1：1的比例混合，而混合菌粉于硝酸铅投予后两小时再经口喂食。本实例试验时间为3周。

试验第三周时，分别对每组大鼠进行眼窝采血，检测血液中砷的含量，结果如下表六所示。并于试验结束后牺牲各该组大鼠，分别取其肝脏，进行肝脏切片及染色，结果如图21A至图21C所示。

由表六及图21A至图21C的结果可知，含有本发明所揭NBM-01-07-003菌株的组合物能够有效清除血液中的砷，并且，避免砷累积于肝脏中，使肝细胞不会被砷所破坏，如图21A至图21C所示，投予含有本发明所揭NBM-01-07-003菌株的组合物能够使肝细胞排列紧密，不会发生细胞坏死、核浓缩及溶解的现象。

由此显示本发明所揭NBM-01-07-003菌株或是含有本发明所揭NBM-01-07-003菌株的组合物能清除血液中的砷，使砷不会累积于肝脏或其他组织内，以达到避免器官受到重金属损害的功效。

表六：各组大鼠的血砷变化量

| 组别 | 血砷含量(ppb) |       |       |       |       |       |
|----|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | 第 1 只     | 第 2 只 | 第 3 只 | 第 4 只 | 第 5 只 | 第 6 只 |
| 1  | ND        | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |
| 2  | 2.5       | 2.3   | 2.9   | 2.5   | 2.8   | 2.6   |
| 3  | ND        | ND    | ND    | ND    | ND    | ND    |

根据上述说明可证实，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003确实能够吸附于肠道细胞或皮肤细胞上，不仅能够降低个体的发炎现象、调节免疫反应，更能够有别于以往的乳酸菌，能够于体内或体外吸附铅、砷等重金属或含有重金属的组合物，以能够作为治疗或/及预防重金属引发相关疾病或并发症的组合物中的有效成分。更进一步来说，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003能够与其他乳酸菌相互配合，例如NBM-04-10-001，能够更为提升其吸附重金属的能力，达到更佳清除效果，举例来说，本发明所揭新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003与NBM-04-10-001能够依据一预定比例混合，例如1：1、2：1、3：1、1：2、1：3等。

## 权 利 要 求

1. 一种新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003，其特征在于，其科学命名为：植物乳杆菌植物亚种（*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum*）NBM-01-07-003，保藏单位为：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；地址为：北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所；保藏日期为：2018年9月4日；保藏编号为：CGMCC No. 16417。
2. 一种乳酸菌组合物，其特征在于，包含有如权利要求1所述的新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003。
3. 如权利要求2所述的乳酸菌组合物，其特征在于，更包含有一乳酸乳杆菌。
4. 如权利要求3所述的乳酸菌组合物，其特征在于，该新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003与该乳酸乳杆菌以重量比1：1的比例混合。
5. 如权利要求2或3所述的乳酸菌组合物，其特征在于，用以吸附重金属。
6. 如权利要求2或3所述的乳酸菌组合物，其特征在于，制备为外用剂型。
7. 一种将乳酸菌组合物作为用于制造治疗或/及预防重金属中毒的组合物的用途，其特征在于，该乳酸菌组合物包含如权利要求1所述新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003。
8. 如权利要求7所述的用途，其特征在于，该乳酸菌组合物更包含有一乳酸乳杆菌。
9. 如权利要求8所述的用途，其特征在于，该新颖植物乳杆菌NBM-01-07-003与该乳酸乳杆菌以重量比1：1的比例混合。
10. 如权利要求 7、8 或 9 所述的用途，其特征在于，该乳酸菌组合物为一食品。