

副格氏乳杆菌 CCFM1526 促进氰钴胺发酵转化并缓解慢性睡眠剥夺诱导的神经损伤及机制

陈星茹, 唐鑫, 毛丙永, 赵建新, 张秋香, 崔树茂*

江南大学, 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡

陈星茹, 唐鑫, 毛丙永, 赵建新, 张秋香, 崔树茂. 副格氏乳杆菌 CCFM1526 促进氰钴胺发酵转化并缓解慢性睡眠剥夺诱导的神经损伤及机制[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3425-3437.

CHEN Xingru, TANG Xin, MAO Bingyong, ZHAO Jianxin, ZHANG Qiuxiang, CUI Shumao. *Lactobacillus paragasseri* CCFM1526 promotes the fermentative biotransformation of cyanocobalamin against chronic sleep deprivation-induced nerve injury via the corresponding mechanism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3425-3437.

摘要:【目的】氰钴胺(cyanocobalamin, CN-CbI)需转化为腺苷钴胺(adenosylcobalamin, Ado-CbI)才能发挥神经保护作用,但在慢性睡眠剥夺(chronic sleep deprivation, CSD)等状态下其转化效率受限。本研究旨在筛选出能够高效转化 CN-CbI 为 Ado-CbI,并协同发挥神经保护作用的菌株。【方法】通过超高效液相色谱(UPLC)筛选获得能将 CN-CbI 转化为 Ado-CbI 的菌株——副格氏乳杆菌 CCFM1526;建立 CSD 小鼠模型,采用新物体识别实验和 Morris 水迷宫实验评价小鼠的认知功能,通过组织病理学观察海马 DG 区神经元结构;测定组织中维生素 B₁₂ (vitamin B₁₂, VB₁₂)含量,并检测 ERK/mTOR 信号通路及相关神经蛋白的表达,以评价发酵液的神经保护机制。【结果】与单纯补充 CN-CbI 相比,CCFM1526 发酵液显著提升了小鼠的认知能力,减轻了海马 DG 区神经元结构损伤。发酵液干预使小鼠肝脏、血清和脑中的总维生素 B₁₂ 含量分别提升 10.2%、16.3% 和 29.0% ($P<0.05$),并激活了 ERK/mTOR 信号通路,使髓鞘碱性蛋白、突触后致密蛋白 95、脑源性神经营养因子及神经生长因子的含量分别增加 21.5%、52.4%、17.3% 和 19.7% ($P<0.05$)。【结论】副格氏乳杆菌 CCFM1526 通过发酵将 CN-CbI 转化为 Ado-CbI,进而通过激活 ERK/mTOR 信号通路,上调神经营养与髓鞘修复相关蛋白的表达,从而缓解 CSD 诱导的神经损伤。

关键词: 副格氏乳杆菌 CCFM1526; 氰钴胺; 腺苷钴胺; 神经损伤; ERK/mTOR 信号通路

资助项目: 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心项目

This work was supported by the Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province.

*Corresponding author. E-mail: cuishumao@jiangnan.edu.cn

Received: 2026-01-28; Accepted: 2026-02-27; Published online: 2026-03-23

***Lactobacillus paragasseri* CCFM1526 promotes the fermentative biotransformation of cyanocobalamin against chronic sleep deprivation-induced nerve injury *via* the corresponding mechanism**

CHEN Xingru, TANG Xin, MAO Bingyong, ZHAO Jianxin, ZHANG Qiuxiang, CUI Shumao*

State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] Cyanocobalamin (CN-CbI) requires to be converted into adenosylcobalamin (Ado-CbI) to exert neuroprotective effects, yet its conversion efficiency is impaired under conditions such as chronic sleep deprivation (CSD). This study aimed to obtain a bacterial strain with high efficiency in converting CN-CbI to Ado-CbI that could enhance neuroprotective effects. [Methods] *Lactobacillus paragasseri* CCFM1526, a strain capable of converting CN-CbI to Ado-CbI, was isolated *via* UPLC. A mouse model of CSD was established, and the cognitive functions of mice were evaluated by the novel object recognition and Morris water maze tests. The neuronal structure in the hippocampal dentate gyrus (DG) region was observed *via* histological staining. Tissue vitamin B₁₂ levels were measured, and the ERK/mTOR signaling pathway along with related neural protein expression was analyzed to assess the neuroprotective mechanism of the fermentation broth. [Results] Compared with CN-CbI supplementation alone, the fermentation broth of *L. paragasseri* CCFM1526 significantly improved the cognitive function and alleviated the structural damage in the hippocampal DG region of CSD mice. Intervention with the fermentation broth increased the total vitamin B₁₂ content in the liver, serum, and brain by 10.2%, 16.3%, and 29.0%, respectively ($P < 0.05$). Meanwhile, it activated the ERK/mTOR signaling pathway, leading to increases of 21.5%, 52.4%, 17.3%, and 19.7% in the content of myelin basic protein, postsynaptic density protein 95, brain-derived neurotrophic factor, and nerve growth factor, respectively ($P < 0.05$). [Conclusion] *L. paragasseri* CCFM1526 converts CN-CbI into Ado-CbI through fermentation, subsequently activating the ERK/mTOR signaling pathway and upregulating the expression of neurotrophic and myelin repair-related proteins, thereby alleviating CSD-induced nerve injury.

Keywords: *Lactobacillus paragasseri* CCFM1526; cyanocobalamin; adenosylcobalamin; nerve injury; ERK/mTOR signaling pathway

维生素 B₁₂ (vitamin B₁₂, VB₁₂)是维持神经系统发育和功能完整性的必需微量营养素, 其在线粒体中转化为具有生物活性的腺苷钴胺 (adenosylcobalamin, Ado-CbI), 该活性形式是甲基丙二酰辅酶 A 变位酶的必需辅因子, 可催化

甲基丙二酰辅酶 A 转化为琥珀酰辅酶 A^[1]。这一反应不仅能减少神经毒性代谢物甲基丙二酸的积累, 也能为髓鞘脂质合成与轴突结构的维持提供必要底物, 从而有助于维持神经信号传导效率与神经网络稳定性, 在神经保护中发挥

不可替代的作用^[2-3]。日常广泛使用的 VB₁₂ 补充剂多为化学性质稳定的氰钴胺(cyanocobalamin, CN-CbI), 其必须在体内经多步酶促反应转化为 Ado-CbI 才能发挥生物活性, 该转化过程高度依赖于细胞的能量代谢与氧化还原稳态^[4]。然而, 在慢性应激、衰老及神经退行性疾病等状态下, 细胞线粒体功能易受损, 相关酶活性下降, 导致 CN-CbI 向 Ado-CbI 的转化效率显著降低, 从而严重限制了其实际神经保护效果^[5]。因此, 克服 CN-CbI 的体内转化瓶颈, 提高其在神经系统的 Ado-CbI 生物利用度, 对于开发针对神经损伤的新型干预手段具有重要意义。

与直接补充化学性质不稳定、易降解的 Ado-CbI 相比, 基于益生菌的转化策略有望提供更稳定且可控的活性 VB₁₂ 来源。肠道益生菌可通过其特有的酶系统将膳食中一些难以被宿主直接利用的复杂成分(如黄酮类、酚苷类和槲皮素等)转化为高生物活性的小分子物质, 从而调节宿主的生理功能^[6]。这提示, 利用特定益生菌株对 CN-CbI 进行发酵转化, 或可绕过体内转化的限速步骤, 为克服 CN-CbI 的生物利用瓶颈提供新的递送策略。然而, 目前关于具有高效 CN-CbI 转化能力的益生菌株筛选及其在体内协同 CN-CbI 发挥神经保护作用的系统性研究仍较为缺乏。

慢性睡眠剥夺(chronic sleep deprivation, CSD)是一种可导致中枢神经损伤、认知功能衰退及情绪行为异常的经典实验模型。研究表明, CSD 可导致海马等关键脑区神经元线粒体功能障碍、氧化应激与能量代谢失衡, 干扰内源性 Ado-CbI 转化, 同时引发神经炎症、髓鞘结构损伤与突触可塑性下降等一系列病理变化^[7-9]。因此, CSD 模型为在模拟体内 CN-CbI 转化受限的环境下, 评估外源性或菌源性 Ado-CbI 的神经保护效能提供了理想的研究模型。

本研究通过超高效液相色谱筛选, 获得了一株能将 CN-CbI 转化为 Ado-CbI 的益生菌——副格氏乳杆菌 CCFM1526。通过 CSD 诱导的

C57BL/6J 小鼠中枢神经损伤模型, 系统比较 CCFM1526 发酵 CN-CbI 与单纯补充 CN-CbI 对小鼠认知功能、脑组织病理、VB₁₂ 分布以及相关神经营养和髓鞘修复蛋白表达的影响, 并深入探讨其潜在作用机制。本研究旨在阐明益生菌发酵转化 CN-CbI 在缓解神经损伤中的作用与机制, 为开发基于益生菌与微量营养素协同作用的神经保护性功能食品提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

副格氏乳杆菌 CCFM1526 由江南大学食品微生物菌种保藏中心(Culture Collection of Food Microorganisms, CCFM)提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

MRS 培养基, 青岛海博生物技术有限公司; 氰钴胺, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 腺苷钴胺, Sigma-Aldrich Co. LLC 公司; 小鼠 VB₁₂、突触后密度蛋白-95 (postsynaptic density protein-95, PSD-95)、髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经生长因子(nerve growth factor, NGF)测定试剂盒, 上海酶联生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术股份有限公司。

多功能酶标仪, 上海智城分析仪器制造有限公司; 超高效液相系统、质谱仪, 赛默飞世尔科技公司; 高速离心机, 艾本德中国有限公司; 高通量组织研磨机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 切片电子扫描仪, 3DHISTECH 公司。

1.2 细菌培养

将副格氏乳杆菌 CCFM1526 冻存菌种在 MRS 平板上划线, 于 37 °C 有氧条件下倒置培养 48 h。挑取单菌落接种于 5 mL 的 MRS 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 16–18 h, 重复

该操作 3–4 次，制备得到种子液。

1.3 氰钴胺发酵转化

CN-CbI 发酵培养基(g/L): 氰钴胺 0.5, 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 10.0, 柠檬酸氢二胺 2.0, 用纯净水混合, 将 pH 调至 6.0–6.2, 于 115 °C 灭菌 20 min。

将上述种子液以体积分数 5% 的接种量接种至 CN-CbI 发酵培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 48 h。发酵完成后将发酵液 12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 用 0.22 μm 水系过滤器过滤, 置于 4 °C 备用。

使用配备 Phenomenex C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱的超高效液相系统进行分析。流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为乙腈。柱温 35 °C, 样品盘温度 4 °C, 进样体积 2 μL。通过对 CN-CbI 与 Ado-CbI 标准品的保留时间比对进行定性, 并采用(峰面积-浓度标准曲线)对发酵液中 Ado-CbI 含量进行半定量估算。

1.4 动物实验干预样本的制备

1.4.1 CCFM1526 活菌悬液

将 CCFM1526 菌液于 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用无菌 PBS (pH 7.4) 清洗 2 次, 随后用 CN-CbI 溶液重悬菌体至终浓度为 1×10^9 CFU/mL, 于灌胃前新鲜制备。

1.4.2 CCFM1526 发酵 CN-CbI 冻干粉

将 CCFM1526 种子液以体积分数 5% 的接种量接种至 CN-CbI 发酵培养基(同 1.3 节)中,

37 °C、200 r/min 培养 48 h。发酵液经高压均质 (4 °C、 1.2×10^8 Pa, 循环 3 次)后, 通过冷冻干燥得到冻干粉。灌胃前用生理盐水复溶至所需浓度。

1.5 动物实验

42 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 饲养于江南大学动物实验中心 SPF 级别屏障环境(温度 20–26 °C、相对湿度 40%–60%)。本研究所有动物实验获得江南大学实验动物伦理委员会批准, 编号为 No. 20250415c1800609[177]。适应 1 周后, 随机分为 7 组, 每组 6 只小鼠, 分别为: 空白组(Control 组)、模型组(Model 组)、CN-CbI 组、阳性对照组(Positive 组)、1526 活菌组(H-1526)、1526 活菌+CN-CbI 组(H-1526+CbI)、1526 发酵组(F-1526)。具体分组及干预措施见表 1。

采用改良多平台水环境法建立 CSD 模型^[10]。将除 Control 组外的小鼠置于睡眠剥夺箱, 每日于光周期中期开始, 连续剥夺睡眠 18 h (15:00 至次日 9:00), 共持续 3 周。Control 组置于大平台空白组实验箱中, 正常饮食饮水与睡眠。干预期各实验组小鼠以 0.2 mL/d 的剂量灌胃给药。

1.6 行为学实验

于睡眠剥夺及干预的第 15 天开始行为学实验, 包括新物体识别实验 (novel object recognition test, NOR) 和 Morris 水迷宫实验 (Morris water maze test, MWM)。

NOR 实验包括习惯化、训练和测试 3 个阶

表1 动物实验方案

Table 1 Animal experiment design

Group	Treatment
Control	Physiological saline
Model	CSD+Physiological saline
CN-CbI	CSD+70 μg/(kg·d) CN-CbI
Positive	CSD+70 μg/(kg·d) Me-CbI
H-1526	CSD+ 1×10^9 CFU live CCFM1526
H-1526+CN-CbI	CSD+70 μg/(kg·d) CN-CbI+ 1×10^9 CFU live CCFM1526
F-1526	CSD+Fermentation broth [70 μg/(kg·d) CN-CbI]

段^[11]。测试阶段,记录小鼠在 6 min 内探索新物体时间(time of new object, TN)与旧物体时间(time of familiar object, TF),并按公式(1)、(2)分别计算辨别指数(discrimination index, DI)和认知指数(recognition index, RI)。

$$DI=(TN-TF)/(TN+TF) \quad (1)$$

$$RI=TN/(TN+TF) \quad (2)$$

MWM 实验包括 4 d 的定位航行训练和 1 d 的空间探索测试^[12]。训练期间记录小鼠找到隐藏平台的潜伏期,测试期间通过计算机软件记录小鼠在 60 s 内穿越原平台位置的次数。

1.7 样品采集

行为学测试结束后,采集小鼠血清、全脑和肝脏组织。部分脑组织与肝脏组织经液氮速冻后保存于-80℃;另取部分脑组织置于 4% 多聚甲醛中固定,用于病理学分析。

1.8 脑组织切片的制备及病理观察

脑组织在体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液中固定 48 h 后,委托武汉赛维尔生物科技有限公司进行石蜡包埋、切片制作、苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE),然后进行自动扫描切片,观察脑组织病理损伤情况。

1.9 生化指标测定

使用 ELISA 试剂盒检测小鼠肝脏、血清和脑组织中的 VB₁₂ 总含量、脑部 MBP、PSD-95、BDNF、NGF、磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR)的含量。蛋白浓度的测定参照 BCA 蛋白浓度试剂盒说明书进行。

1.10 数据处理与分析

所得数据使用 GraphPad Prism 10.0 软件进行分析,对正态分布的实验数据进行 *t* 检验(*t* test)及单因素方差分析(one-way ANOVA),比较组间差异,数据以平均值±标准差(mean±SD)表示(*n*=6)。**P*<0.05 认为有统计学意义。*表示与

Model 组进行差异性的比较,#表示与 CN-CbI 组进行差异性的比较。

2 结果与讨论

2.1 副格氏乳杆菌 CCFM1526 发酵转化氰钴胺为腺苷钴胺

CN-CbI 向 Ado-CbI 的转化通常涉及 2 类关键酶:脱氰酶与腺苷转移酶。脱氰酶负责将 CN-CbI 转化为羟钴胺,该过程依赖 FAD 和 NADPH 作为辅因子;随后,钴胺素腺苷转移酶(CobA)催化腺苷基团转移生成具有生物活性的 Ado-CbI^[13]。如图 1 所示,在未接种菌株的 CN-CbI 培养基中,仅在约 5.40 min 处检测到 CN-CbI 的特征峰。经 CCFM1526 发酵 48 h 后,在约 5.71 min 处出现一个新的色谱峰,其保留时间接近 Ado-CbI 标准品(5.82 min)。由于复杂发酵基质的基质效应常导致色谱峰整体保留时间发生漂移^[14-15],本研究中的轻微偏移也与此有关。然而,仅依靠保留时间进行定性存在一定局限,因此本研究采用 LC-MS/MS 技术,通过比对二级特征碎片离子,确认该峰中含有 Ado-CbI,相关质谱数据已上传至 ScienceDB 数据库(<http://www.scidb.cn>),CSTR 编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00042。半定量分析显示,CCFM1526 发酵消耗了约 27.1% 的 CN-CbI,并生成约 52.1 μg/mL 的 Ado-CbI(表 2)。

为进一步探究 CCFM1526 转化 CN-CbI 的能力,对 CCFM1526 全基因组进行了分析。菌株中含有一个编码咕啉类腺苷转移酶(corrinoid adenosyltransferase)的基因(*yvqk*),其编码蛋白与 CobA 家族高度同源。BLASTp 比对结果显示,该蛋白与副格氏乳杆菌 JCM 5343 的 CobA 具有高度同源性,证实其为负责腺苷化步骤的 CobA 同源蛋白(编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00042)。此外,基因组中存在多个编码 VB₁₂ 转运 ATP 结合蛋白的 BtuD 同源基因,提示菌株具备主动摄取外源性 CN-CbI 的能力^[16]。尽管乳杆菌中尚未

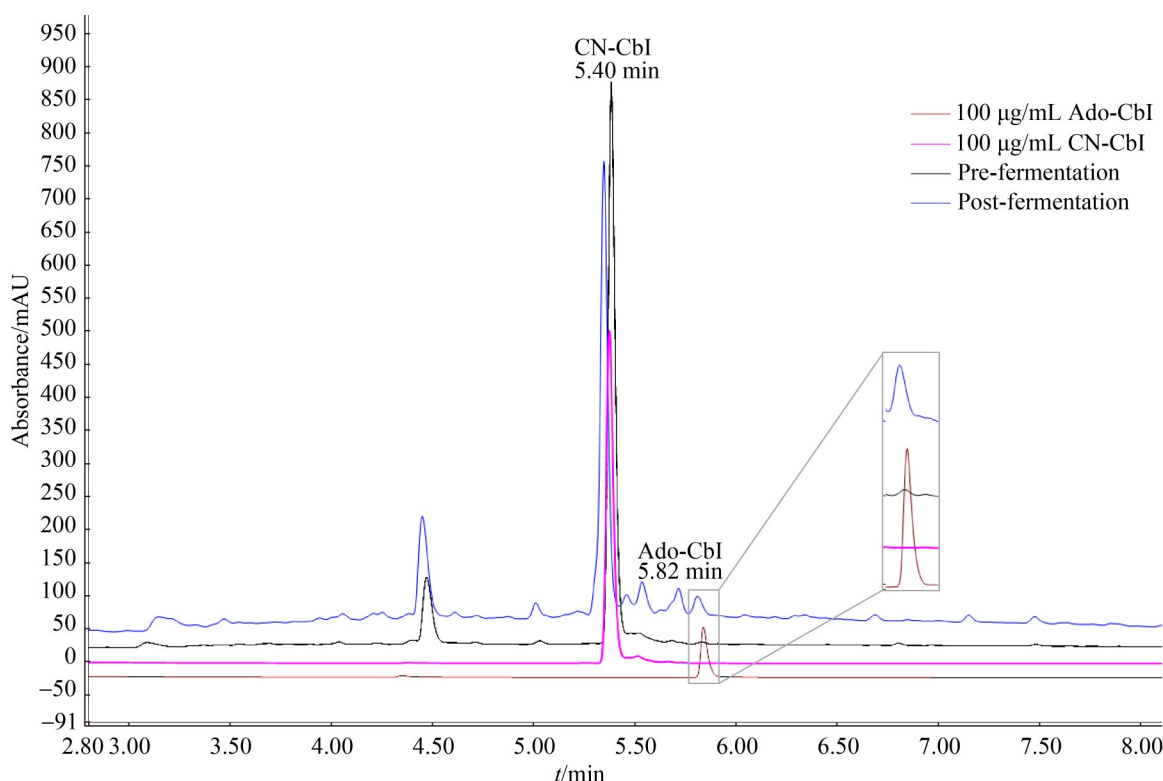


图1 副格氏乳杆菌CCFM1526发酵转化CN-Cbl UPLC图谱

Figure 1 UPLC analysis of CN-Cbl fermentation conversion by *Lactobacillus paragasseri* CCFM1526. Slight retention time shift due to matrix complexity; The peak was confirmed as Ado-Cbl by LC-MS/MS.

表2 CCFM1526发酵CN-Cbl测定结果

Table 2 Test results of CN-Cbl fermentation by CCFM1526

Items	Parameter at 0 h	Parameter at 48 h
CN-Cbl concentration/($\mu\text{g/mL}$)	500.0	364.3
Ado-Cbl concentration/($\mu\text{g/mL}$)	0.0	52.1
CN-Cbl conversion/%	–	27.1

发现特异性钴胺素还原酶, 但 CCFM1526 含有黄素还原酶家族基因及黄素氧还蛋白等电子传递相关基因, 可能通过提供还原力参与脱氰过程^[13](编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00042)。因此, CCFM1526 可能通过 BtuD 同源蛋白摄取外源 CN-Cbl, 经黄素还原酶等介导的脱氰作用转化为羟钴胺, 最终由 CobA 同源蛋白催化生成 Ado-Cbl。该机制与发酵结果一致, 证实副格氏乳杆菌 CCFM1526 可将 CN-Cbl 转化为 Ado-Cbl。

2.2 CCFM1526 发酵氰钴胺对睡眠剥夺小鼠学习和认知能力的影响

本研究以临床上常用的神经营养药物——甲钴胺作为阳性对照以评估其相对效力^[17]。啮齿动物天生具备探索新奇物体的本能, 若小鼠认知能力正常, 其对新物体的探索时间较旧物体更长; 反之, 对新旧物体的探索时间无差异^[18]。NOR 实验结果如图 2A、2B、2D 所示, 相较于 Control 组, Model 组小鼠对新物体的探索时间显著减少, 辨别指数(DI)从 0.14 下降至 -0.56, 认知指数(RI)由 0.53 下降至 0.24 ($P < 0.001$), 表明 CSD 成功损伤了小鼠的物体识别记忆。与此相比, Positive 组的 DI 和 RI 分别为 -0.08 和 0.46 ($P < 0.01$)。补充未发酵 CN-Cbl 后, DI 和 RI 分别上升至 -0.34 和 0.31 ($P < 0.05$), 虽较 Model 组有所改善, 但效果有限。CCFM1526

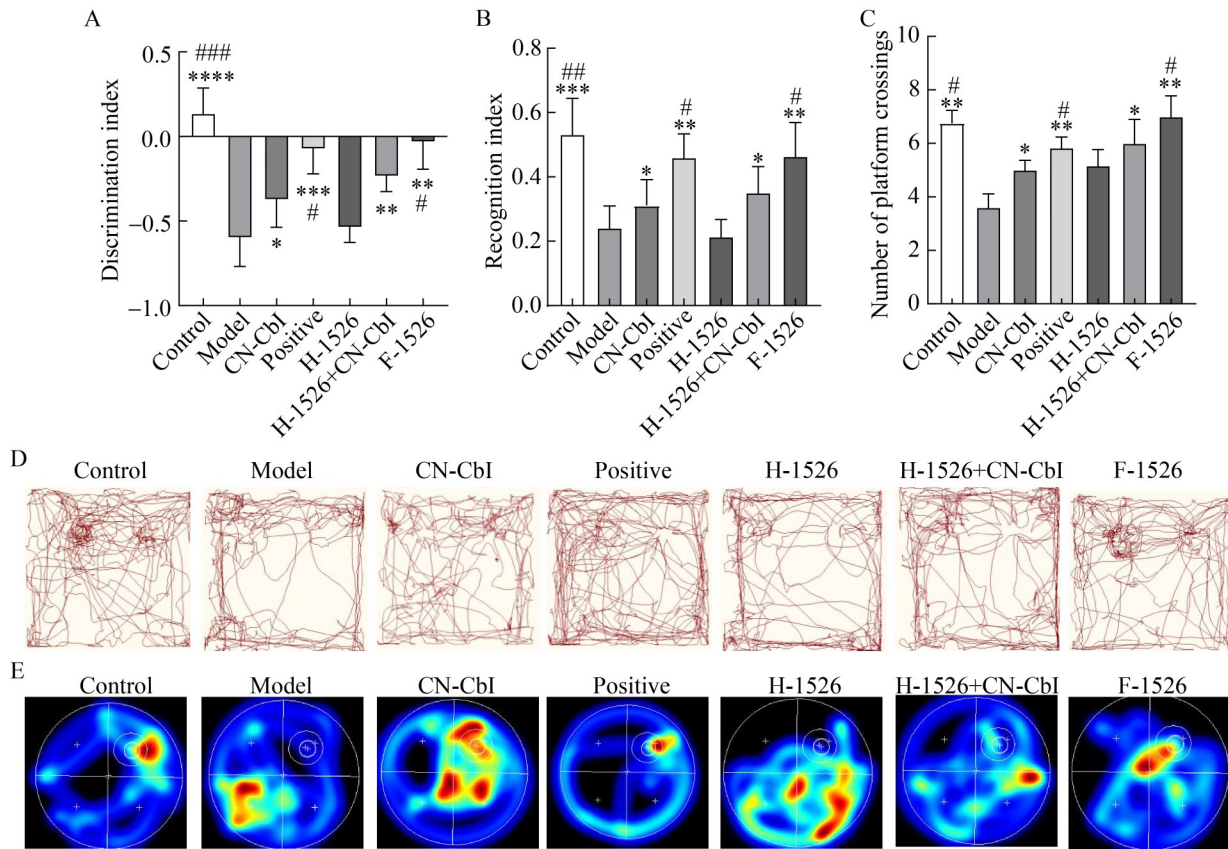


图2 不同灌胃物质对慢性睡眠剥夺小鼠行为学的影响

Figure 2 Effects of different intragastric treatments on the behaviors of chronic sleep-deprived mice. A: NOR discrimination index; B: NOR recognition index; C: Number of platform crossings in the MWM; D: NOR trajectory map; E: MWM trajectory map. H-1526: Live 1526 group; H-1526+CN-CbI: Live 1526+CN-CbI group; F-1526: 1526 fermentation broth. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs. the Model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. the CN-CbI group.

活菌单独干预或与 CN-CbI 协同干预均未观察到对小鼠认知能力的显著影响。在所有实验干预组中, CCFM1526 发酵 CN-CbI 干预效果最优, 较 CN-CbI 组, 其 DI 和 RI 分别提高约 71.1% 和 49.3% ($P < 0.05$), 恢复至接近 Positive 组水平。

在评估空间学习与记忆的 MWM 实验中, 正常小鼠由于工作记忆完好, 能准确记住原平台的位置, 穿过平台的频率较高^[19]。实验结果如图 2C、2E 所示, Model 组小鼠穿越平台次数较 Control 组显著减少了 46.7% ($P < 0.01$), 提示空间记忆受损。与 NOR 结果一致, CCFM1526 活菌单独干预或与 CN-CbI 简单混合干预均未有

效提升小鼠记忆。CCFM1526 发酵 CN-CbI 干预则使小鼠穿越平台次数较 CN-CbI 组提升了 94.1% ($P < 0.05$)。两项行为学测试结果共同表明, 经 CCFM1526 发酵处理后的 CN-CbI, 在改善 CSD 诱导的认知功能障碍方面, 效果显著优于未发酵的 CN-CbI, 且接近临床阳性药物甲钴胺的干预水平。

2.3 CCFM1526 发酵氰钴胺对睡眠剥夺小鼠脑组织病理学的影响

长期睡眠剥夺可引起中枢神经系统结构性改变, 其中海马齿状回区(dentate gyrus, DG)作为学习记忆的关键区域, 参与记忆的形成与巩

固过程,其神经元形态易受睡眠缺失影响^[19]。如图 3A、3B 所示,Control 组小鼠海马 DG 区细胞排列整齐,细胞核形态结构完整,细胞间隙相对较小;而 Model 组小鼠神经细胞排列紊乱且不规则,神经元萎缩,胞浆染色加深,胞浆空泡化,提示 CSD 成功诱导了海马组织的形态学损伤。各干预组均表现出一定程度的保护作用(图 3C–3G):CN-CbI 和甲钴胺干预后萎缩的神经元数量减少,甲钴胺效果更显著;CCFM1526 活菌单独干预的改善效果较弱,其与 CN-CbI 联合干预效果略优于 CN-CbI 组。其中,经 CCFM1526 发酵液干预的小鼠,其海马 DG 区神经元排列更为紧密,固缩现象明显减少,病理形态恢复接近 Control 组水平。

以上组织形态学结果证实,CCFM1526 发酵 CN-CbI 在缓解 CSD 所致海马 DG 区的神经元结构损伤方面具有一定作用,其保护效果优于未发酵的 CN-CbI 及其他干预形式。该现象与

先前研究一致,如夏枯草活性成分被证实可减轻睡眠剥夺所致下丘脑、大脑皮层及海马区神经元损伤^[20],进一步印证了睡眠剥夺对中枢神经系统的影响及有效干预的潜在价值。

2.4 CCFM1526 发酵氰钴胺对小鼠体内 VB₁₂ 含量的影响

为探究发酵处理对 CN-CbI 体内代谢的影响,本研究检测了在等量 CN-CbI 摄入下各组小鼠肝脏、血清及脑组织的总 VB₁₂ 含量。

如图 4 所示,直接补充 CN-CbI 或甲钴胺均可提高小鼠体内 VB₁₂ 水平,但单纯补充 CCFM1526 活菌无法有效提升小鼠体内 VB₁₂ 含量。与直接补充 CN-CbI 相比,补充 CCFM1526 发酵液(F-1526 组)能显著提升小鼠关键组织中的总 VB₁₂ 水平。其中,肝脏中总 VB₁₂ 含量提升了 10.2% ($P<0.05$),血清中提升了 16.3% ($P<0.05$),脑组织中提升最为显著,达到 29.0% ($P<0.05$)。

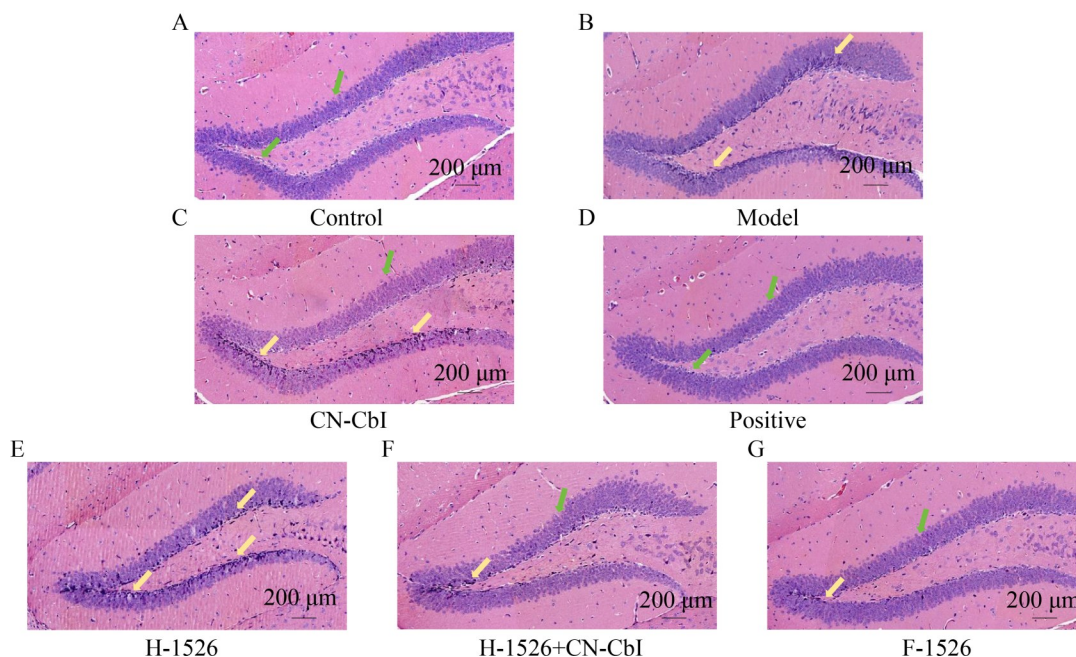


图3 小鼠海马DG区HE染色结果

Figure 3 HE staining of hippocampal DG region in mice. H-1526: Live 1526 group; H-1526+CN-CbI: Live 1526+CN-CbI group; F-1526: 1526 fermentation broth. Green arrows: Normal neurons; Yellow arrows: Damaged neurons. Scale bar=200 μ m.

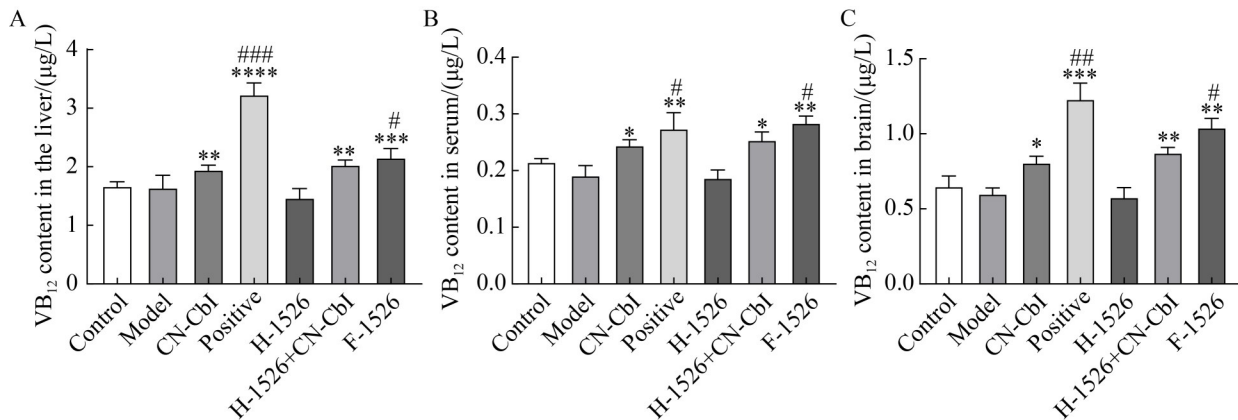


图4 不同灌胃物质对小鼠体内VB₁₂含量的影响

Figure 4 Effects of different intragastric treatments on VB₁₂ levels in mice. A: VB₁₂ content in liver; B: VB₁₂ content in serum; C: VB₁₂ content in brain. H-1526: Live 1526 group; H-1526+CN-CbI: Live 1526+CN-CbI group; F-1526: 1526 fermentation broth. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, #### $P<0.0001$ vs. the Model group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs. the CN-CbI group.

CN-CbI 作为外源性 VB₁₂ 的主要形式, 需在体内(主要在肝脏)经多步酶促反应转化为 Ado-CbI 等活性形式后方能发挥生理功能。本研究 F-1526 组小鼠脑内 VB₁₂ 累积幅度显著高于肝脏, 这一结果提示, 发酵预处理可能改变了 CN-CbI 的代谢路径。我们推测, CCFM1526 在发酵过程中将 CN-CbI 预先转化为 Ado-CbI, 该活性形式可能绕过了肝脏的首过代谢限制与细胞内的转化瓶颈, 从而更易被吸收入血并跨越血脑屏障, 最终在脑内实现更高的生物利用率^[21]。这也与 F-1526 组在行为学与组织形态学中表现出的最优神经保护效果相互印证。

2.5 CCFM1526 发酵氰钴胺对小鼠中枢神经系统的影响

中枢神经系统的功能维系依赖于其结构完整、神经网络连接及神经营养支持三大核心层面的紧密协同。因此, 本研究选取 MBP、PSD-95 以及 BDNF/NGF 三类关键蛋白, 分别从髓鞘结构、突触功能及神经营养调控角度系统探究中枢神经损伤与修复的分子机制。其中, MBP 是维持髓鞘结构与电生理功能完整性的基础蛋白, 保障神经网络信息传导的基础效率, 为物

体识别、空间探索等高级认知活动创造必要生理条件; PSD-95 作为突触后支架蛋白, 直接参与突触结构稳定性与信号传递, 是 NOR 记忆形成、MWM 所检测的空间记忆巩固的重要细胞分子基础; BDNF 和 NGF 作为重要的神经营养因子, 在促进神经元存活、轴突生长及突触重塑中发挥核心营养支持作用, 其表达水平会影响海马区神经元的结构与功能完整性, 进而调控小鼠的学习记忆能力^[22-23]。

如图 5 所示, CSD 导致 Model 组小鼠脑组织中 4 种蛋白的表达均较 Control 组显著下降 ($P<0.001$), 提示 CSD 造成了一定程度上的中枢神经损伤, 与文献报道结果^[24-26]一致。CN-CbI 和甲钴胺干预可不同程度提升上述蛋白的表达, 而单纯 CCFM1526 活菌干预未表现明显改善效果。与 CN-CbI 组相比, F-1526 组小鼠 MBP、PSD-95、BDNF 和 NGF 水平分别提升了 21.5%、52.4%、17.3% 和 19.7% ($P<0.05$)。CCFM1526 活菌与 CN-CbI 混合干预在提升 MBP 和 NGF 水平方面的效力与 F-1526 组相当, 但对 PSD-95 和 BDNF 的调节作用则显著弱于 F-1526 组(图 5A-5D)。这一结果提示, CCFM1526 在神经修复过程中发挥一定作用, 但效果受干预形式影

响。我们推测，口服的 CCFM1526 活菌可能在肠道内对 CN-CbI 进行了初步转化，生成更易被细胞利用的中间体，但该过程受限于肠道通过时间以及宿主消化环境的复杂性，导致其转化过程不充分、不稳定，效率远低于发酵^[6]，进而在 PSD-95、BDNF 的调控上表现不足。F-1526 组通过高效、彻底、稳定的生物转化，直接提供了充足的 Ado-CbI，从而能够更全面地修复神经损伤。

2.6 CCFM1526 协同氰钴胺通过激活 ERK/mTOR 信号通路发挥神经保护作用

ERK/mTOR 信号通路在维持神经元存活及认知功能中发挥关键作用。在 CSD 状态下，小鼠海马组织内该信号通路受到显著抑制，同时伴随自噬和凋亡过程的异常激活，进而影响下游神经营养因子表达与神经结构的完整性^[24,27]。本研究结果显示(图 6A、6B)，CSD 显著抑制了脑部 ERK 和 mTOR 信号通路的激活，与

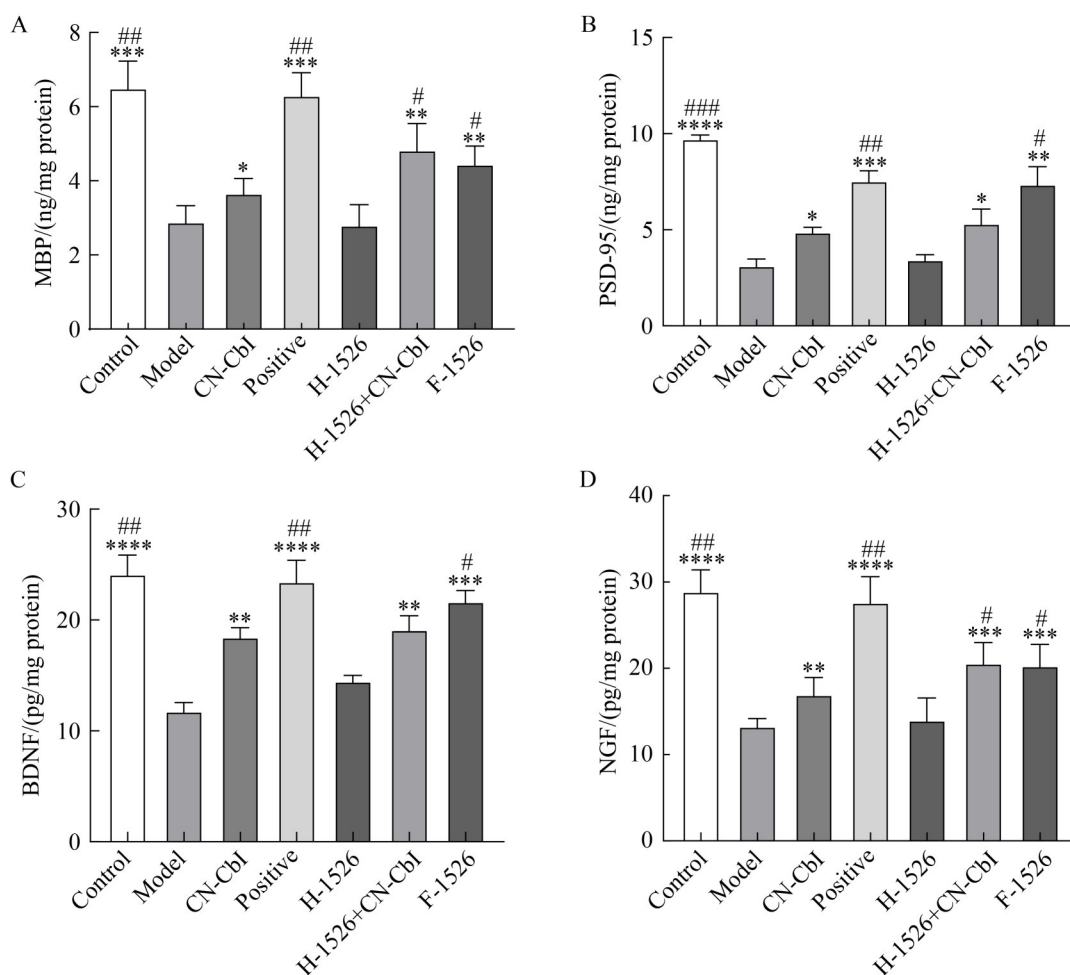


图5 不同灌胃物质对小鼠中枢神经系统的影响

Figure 5 Effects of different intragastric treatments on the central nervous system of mice. A: MBP; B: PSD-95; C: BDNF; D: NGF. H-1526: Live 1526 group; H-1526+CN-CbI: Live 1526+CN-CbI group; F-1526: 1526 fermentation broth. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ vs. the Model group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. the CN-CbI group.

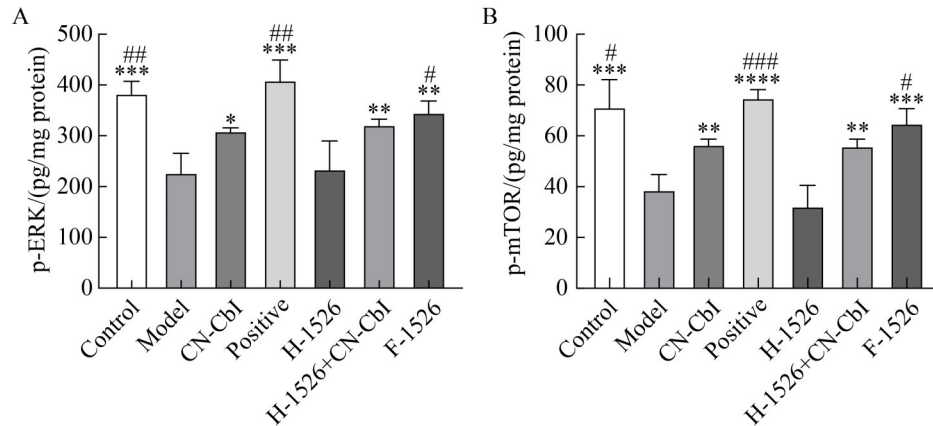


图6 不同灌胃物质对小鼠脑组织ERK和mTOR信号通路的影响

Figure 6 Effects of different intragastric treatments on ERK and mTOR signaling pathways in mouse brain tissue. A: p-ERK; B: p-mTOR. H-1526: Live 1526 group; H-1526+CN-Cbl: Live 1526+CN-Cbl group; F-1526: 1526 fermentation broth. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ vs. the Model group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs. the CN-Cbl group.

Control 组相比, Model 组 p-ERK 及 p-mTOR 表达分别降低 40.6% 与 45.6% ($P<0.001$)。CN-Cbl 与甲钴胺干预不同程度上缓解上述信号通路的抑制。CCFM1526 发酵液(F-1526 组)干预有效恢复了小鼠脑部 ERK 与 mTOR 的磷酸化水平,其表达显著高于 CN-Cbl 组(分别提高了 11.8% 和 14.8%, $P<0.05$),并恢复至接近 Control 组水平。CCFM1526 活菌单独干预或与 CN-Cbl 混合干预则未观察到明显改善作用。上述结果提示,CCFM1526 发酵液中的 Ado-Cbl 介导的神经保护作用与 ERK/mTOR 信号通路的激活密切相关。发酵液可能通过支持线粒体能量代谢改善细胞能量状态,从而激活了 mTOR 信号,并协同调控了下游的 ERK 等通路。激活的 ERK/mTOR 通路可能通过促进 BDNF、NGF 等神经营养因子的合成^[24],并可能通过抑制过度自噬或凋亡来保护神经元^[27],进而支持 PSD-95、MBP 等结构蛋白生成,增强突触可塑性与修复髓鞘,共同缓解 CSD 导致的神经损伤。这些结果提示,ERK/mTOR 通路可能是 CCFM1526 发酵液发挥神经保护作用的重要介导途径之一,但其具体机制仍有待通过通路抑制剂或基因敲

除等干预手段进一步验证。

3 结论

本研究基于菌株发酵筛选得到了一株能够将 CN-Cbl 转化为 Ado-Cbl 的副格氏乳杆菌 CCFM1526。在 CSD 模型中,CCFM1526 发酵 CN-Cbl 能够显著提升小鼠体内 VB₁₂ 的含量、改善中枢神经细胞及中枢神经系统结构的损害、缓解认知能力的下降,其作用机制与激活 ERK/mTOR 信号通路进而促进神经营养因子表达及髓鞘修复相关蛋白合成密切相关。该研究为开发基于益生菌发酵转化的功能性 VB₁₂ 制品或合生制剂提供了理论依据与菌种资源,在功能性食品与神经营养干预领域具有潜在应用价值。

作者贡献声明

陈星茹:方案设计、实验操作、数据分析、初稿写作;唐鑫:方案设计、软件程序;毛丙永:实验操作、软件程序;赵建新:实验指导、提供材料、稿件润色修改;张秋香:实验指导、稿件润色修改、经费支持;崔树茂:研究构思和设计、监督指导、经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Ge Y, Zadeh M, Mohamadzadeh M. Vitamin B₁₂ regulates the transcriptional, metabolic, and epigenetic programming in human ileal epithelial cells[J]. *Nutrients*, 2022, 14(14): 2825.
- [2] Moravcová M, Siatka T, Krčmová LK, Matoušová K, Mladěňka P. Biological properties of vitamin B₁₂[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2025, 38(1): 338-370.
- [3] Hannibal L, Jacobsen DW. Intracellular processing of vitamin B₁₂ by MMACHC (CblC)[J]. *Vitamins and Hormones*, 2022, 119: 275-298.
- [4] Offringa AK, Bourgonje AR, Schrier MS, Deth RC, van Goor H. Clinical implications of vitamin B₁₂ as redox-active cofactor[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2021, 27(10): 931-934.
- [5] Simonenko SY, Bogdanova DA, Kuldyushev NA. Emerging roles of vitamin B₁₂ in aging and inflammation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(9): 5044.
- [6] Zhang L, Marfil-Sánchez A, Kuo TH, Seelbinder B, van Dam L, Depetris-Chauvin A, Jahn LJ, Sommer MOA, Zimmermann M, Ni YQ, Panagiotou G. Gut microbiome-mediated transformation of dietary phytonutrients is associated with health outcomes[J]. *Nature Microbiology*, 2026, 11(1): 94-110.
- [7] Sarnataro R, Velasco CD, Monaco N, Kempf A, Miesenböck G. Mitochondrial origins of the pressure to sleep[J]. *Nature*, 2025, 645(8081): 722-728.
- [8] Tian YJ, Liu XY, Liu DQ. Physiological roles of reactive oxygen species in sleep homeostasis[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2026, 242: 220-236.
- [9] Kuhn M, Wolf E, Maier JG, Mainberger F, Feige B, Schmid H, Bürklin J, Maywald S, Mall V, Jung NH, Reis J, Spiegelhalder K, Klöppel S, Sterr A, Eckert A, Riemann D, Normann C, Nissen C. Sleep recalibrates homeostatic and associative synaptic plasticity in the human cortex[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12455.
- [10] 刁华琼, 张婧, 王敏, 陈雨菲, 朱庆生, 李小黎. 改良的多平台水环境法在睡眠剥夺动物模型中的应用与评价[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(1): 120-128.
Diao HQ, Zhang J, Wang M, Chen YF, Zhu QS, Li XL. Application and evaluation of the modified multiplatform method in animal model of sleep deprivation[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2023, 31(1): 120-128 (in Chinese).
- [11] Zhang MW, Tang X, Mao BY, Zhang QX, Zhao JX, Chen W, Cui SM. Inhibition of the NF- κ B and mTOR targets by urolithin A attenuates D-galactose-induced aging in mice[J]. *Food Function*, 2023, 14(23): 10375-10386.
- [12] Oderinde GP, Danborn SB, Umana UE, Bauchu ZM, Sulaiman MH. Co-administration of omega-3 fish oil and cannabidiol restores cognitive function and altered histoarchitectural changes in the hippocampus of sleep-deprived wistar rats through oxidative stress pathway[J]. *Alzheimer's Dementia*, 2025, 21(S1): e096893.
- [13] Balabanova L, Averianova L, Marchenok M, Son O, Tekutyeva L. Microbial and genetic resources for cobalamin (vitamin B₁₂) biosynthesis: from ecosystems to industrial biotechnology[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 4522.
- [14] Kim SY, Yang JS, Dang YM, Ha JH. Effect of fermentation stages on glucosinolate profiles in kimchi: quantification of 14 intact glucosinolates using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry: X*, 2022, 15: 100417.
- [15] Casado-Hidalgo G, Morante-Zarero S, Pérez-Quintanilla D, Sierra I. Influence of fermentation and storage on the content of opium alkaloids in poppy seed yoghurt[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2023, 121: 105412.
- [16] Stich TA, Buan NR, Escalante-Semerena JC, Brunold TC. Spectroscopic and computational studies of the ATP: corrinoid adenosyltransferase (CobA) from *Salmonella enterica*: insights into the mechanism of adenosylcobalamin biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(24): 8710-8719.
- [17] Oki R, Izumi Y, Fujita K, Miyamoto R, Nodera H, Sato Y, Sakaguchi S, Nokihara H, Kanai K, Tsunemi T, Hattori N, Hatanaka Y, Sonoo M, Atsuta N, Sobue G, Shimizu T, Shibuya K, Ikeda K, Kano O, Nishinaka K, et al. Efficacy and safety of ultrahigh-dose methylcobalamin in early-stage amyotrophic lateral sclerosis: a randomized clinical trial[J]. *JAMA Neurology*, 2022, 79(6): 575.
- [18] Zhai Q, Zhang Y, Ye M, Zhu S, Sun JY, Wang Y, Deng B, Ma DQ, Wang Q. Reducing complement activation during sleep deprivation yields cognitive improvement by dexmedetomidine[J]. *British Journal of Anaesthesia*, 2023, 131(3): 542-555.
- [19] Yin C, Zhang MY, Jin SN, Zhou Y, Ding L, Lv Q, Huang ZX, Zhou JQ, Chen JM, Wang P, Zhang SB, You QY. Mechanism of *Salvia miltiorrhiza* bunge extract to alleviate chronic sleep deprivation-Induced cognitive dysfunction in rats[J]. *Phytomedicine*, 2024, 130: 155725.
- [20] Zhou C, Hu YF, Zhang Y, Wang CH, Liao XJ, Cheng FF, Jiang YY. Study on chemical characterization and sleep-improvement function of *Prunella vulgaris* L. based on the functional components[J]. *Food Research International*, 2024, 192: 114737.
- [21] Santos AJM, Khemiri S, Simões S, Prista C, Sousa I, Raymundo A. The importance, prevalence and determination of vitamins B₆ and B₁₂ in food matrices: a review[J]. *Food Chemistry*, 2023, 426: 136606.
- [22] Song WM, Dai RW, Li MR, Chu B, Yuan HT, Feng XJ, Ji HY, Gu J, Song XL. Unidirectional and sustainable release of NGF and BDNF from a chitosan gel-mediated multilayer ordered composite membrane in promoting

- both spinal cord and sciatic nerve injury repair[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 290: 138927.
- [23] Xu M, Li WG, Hu XS, Zhang JC. Arecoline alleviates depression *via* gut-brain axis modulation, neurotransmitter balance, neuroplasticity enhancement, and inflammation reduction in CUMS mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(17): 10201-10213.
- [24] Looti Bashiyan M, Nasehi M, Vaseghi S, Khalifeh S. Investigating the effect of crocin on memory deficits induced by total sleep deprivation (TSD) with respect to the BDNF, TrkB and ERK levels in the hippocampus of male Wistar rats[J]. Journal of Psychopharmacology, 2021, 35(6): 744-754.
- [25] Chen L, Yang YQ, Zhang N, Che HX, Wang ZP, Han J, Wen M. DHA and EPA alleviate depressive-like behaviors in chronic sleep-deprived mice: involvement of iron metabolism, oligodendrocyte-lipids peroxidation and the LCN2-NLRP3 signaling axis[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2024, 225: 654-664.
- [26] Kim DY, Kim SM, Han IO. Chronic rapid eye movement sleep deprivation aggravates the pathogenesis of Alzheimer's disease by decreasing brain O-GlcNAc cycling in mice[J]. Journal of Neuroinflammation, 2024, 21: 180.
- [27] Cao Y, Li QL, Liu LL, Wu H, Huang F, Wang CH, Lan YY, Zheng F, Xing FP, Zhou Q, Li Q, Shi HL, Zhang BB, Wang ZT, Wu XJ. Modafinil protects hippocampal neurons by suppressing excessive autophagy and apoptosis in mice with sleep deprivation[J]. British Journal of Pharmacology, 2019, 176(9): 1282-1297.