Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng

Research
Development of Gut Microbiome-Targeted Foods and Drugs—Article

产*S*-腺苷甲硫氨酸益生菌对睡眠与昼夜节律的调节作用

田培郡[a,b]，兰煜铭[a,b]，靳至盈[a,b]，杭锋[c]，毛旭华[d]，金星[d]，王刚[a,b,e]，陈卫[a,b,e,*]

[a] *State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China*
[b] *School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China*
[c] *Institute of Food Biotechnology (Yangzhou), Jiangnan University, Yangzhou 225004, China*
[d] *Yixing People's Hospital Affiliated Jiangsu University, Yixing 214200, China*
[e] *National Engineering Research Center for Functional Food, Jiangnan University, Wuxi 214122, China*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 August 2024
Revised 6 December 2024
Accepted 23 December 2024
Available online 27 December 2024

关键词
乳杆菌
S-腺苷甲硫氨酸
睡眠
昼夜节律
褪黑素

摘要

当前睡眠障碍的一线药物与抗抑郁药物存在较多重合，且疗效有限，亟须从新的机制角度开发新型的治疗策略。本研究首先通过横断面研究发现，失眠患者血清中*S*-腺苷甲硫氨酸（SAM）含量显著降低，提示SAM可作为睡眠障碍潜在的生化诊断指标和药物干预靶点。随后，从7个不同菌种的60株肠道菌株中筛选得到一株高产SAM的益生菌——瑞士乳杆菌（*Lactobacillus helveticus*）CCFM1320，证明其能够改善小鼠睡眠剥夺引起的认知和记忆行为异常；在机制上，CCFM1320通过提供SAM促进褪黑素合成前体*N*-乙酰色氨酸的甲基化，进一步使其调控的下游生物节律基因表达正常化。随后，一项为期4周的安慰剂对照临床试验结果显示，CCFM1320显著改善了睡眠障碍患者的睡眠质量，表现为匹兹堡睡眠质量指数（PSQI）评分降低、血清皮质醇水平下降以及肠道致病菌丰度减少。益生菌治疗还显著提升了肠道菌群宏基因组中与SAM合成和代谢相关的酶编码基因丰度，这可能与高产SAM益生菌的引入以及SAM在肠道中的累积相关。综上，本研究为基于益生菌的睡眠障碍管理策略提供了新的思路，有望成为睡眠障碍的非药物治疗替代方案。

© 2025 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. 引言

睡眠对人类健康至关重要，健康的睡眠对认知功能、情绪和心理健康具有正向调节作用，并且对心脑血管和代谢健康有着重要影响[1]。失眠作为一种常见的睡眠障碍，其发病率近年来日益增加，特别是在新型冠状病毒感染（COVID-19）疫情后。一项涉及57 298名参与者的国际研究发现，短期失眠的流行率达到了11.3%，而各研究地点的流行率为2.3%~25.5% [2]。此外，不同国家的失眠症状和失眠障碍的患病率存在显著差异，特别是在女性、年轻人，以及居住在巴西、加拿大、挪威、波兰、美国和英国的居民中，失眠症状的报告比例较高，而来自亚洲国家的报告比例则较低[3]。睡眠不足会引发系统性炎症、代谢功能障碍、认知下降，并增加出现心理健康问题的风险，严重影响身体健康[4]。失眠包括由环境变化、生活方式改变或身体与心理健康状况引起的各种睡眠连续性障碍[5]。因此，寻找有效的治疗策略显得尤为重要。

菌群-肠-脑轴作为一种胃肠道与中枢神经系统之间的双向信号交流系统，其作用日益受到重视。肠道微生态失衡与阿尔茨海默症、自闭症、重度抑郁症、帕金森病、精

* Corresponding author.
E-mail address: chenwei66@jiangnan.edu.cn (W. Chen).

2095-8099/© 2025 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
英文原文：Engineering 2026, 57(2): 250–261
引用本文：Peijun Tian, Yuming Lan, Zhiying Jin, Feng Hang, Xuhua Mao, Xing Jin, Gang Wang, Wei Chen. Regulation of Sleep and Circadian Rhythms by *S*-Adenosylmethionine-Producing Probiotics. *Engineering*, https://doi.org/10.1016/j.eng.2024.12.025

神分裂症、睡眠障碍等多种精神健康问题密切相关[6–7]。与健康对照组相比，失眠患者的肠道菌群表现出多样性降低、厌氧菌和短链脂肪酸（SCFA）产生菌减少以及致病菌增多等特征[8]。利用无菌小鼠的研究发现，肠道菌群的缺失抑制了由睡眠剥夺引起的炎症反应和认知障碍；而将失眠患者的肠道菌群移植到无菌小鼠中，受体小鼠则出现认知功能障碍，并引发周围及中枢神经系统的炎症反应[9]。随着研究的深入，利用饮食途径优化肠道微生态环境以改善精神疾病的可能性受到广泛关注，益生菌和益生元等已被证明具有积极作用[10]。临床试验显示益生菌对失眠有乐观的治疗前景[11]。例如，每天25 mg、为期10天的热灭活短乳杆菌SBC8803治疗，能够显著增加失眠患者脑电图（EEG）中的Delta波频率。此外，格氏乳杆菌CP2305、短双歧杆菌CCFM1025等菌株也已被证实能够通过调节下丘脑-垂体-肾上腺（HPA）轴改善失眠患者的睡眠质量[12–13]。尽管如此，肠道菌群影响睡眠的物质基础和具体分子机制仍不甚明确。

本研究旨在：①探究失眠人群血清中与肠道微生物和睡眠相关的标志代谢物；②筛选具有缓解失眠功能的益生菌，并解析其作用机制；③进一步评价益生菌缓解失眠的临床效果，为失眠的非药物治疗提供新的思路和方法。

2. 方法

2.1. 横断面研究

纳入标准：年龄为18~65岁的失眠患者和健康志愿者（不患失眠）。

排除标准：①服用助眠药物；②上夜班或生活作息不规律；③有酒精依赖史；④患有其他精神疾病；⑤孕妇、哺乳期妇女或准备怀孕（生育）的男性和女性。

根据匹兹堡睡眠质量指数（PSQI）[14]，志愿者被分为对照组和失眠组，其中PSQI大于7者归为失眠组，评分由医院医师完成。阿森斯失眠量表（AIS）亦用于辅助判断睡眠质量[15]。所有参与者血液样本均用于代谢组学分析及皮质醇水平测定。

2.2. 人体血清代谢组学分析

参照先前报道的方法提取血清代谢物[15]，采用高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS）检测血清代谢物。质谱分析采用电喷雾电离（ESI）模式，在正负离子模式下进行数据采集，数据采集方式为数据依赖性全扫描。数据处理与统计分析通过Metabo Analyst 5.0（加拿大麦吉尔大学）完成。

2.3. 肠道微生物的*S*-腺苷甲硫氨酸产量测定

实验菌株从健康志愿者新鲜粪便中分离筛选获得（具体信息见附录A表S1）。从保藏管中取菌液，用接种环划线于MRS固体培养基上，37 ℃厌氧培养24 h。挑取单菌落接种于5 mL MRS液体培养基，37 ℃厌氧培养18 h，制备种子液以用于后续发酵并积累*S*-腺苷甲硫氨酸（SAM）。

调整发酵液活菌浓度至5×10^9 CFU·L^{-1}，6000*g*离心20 min，得到无细胞上清液。将3 mL上清液冻干后，复溶于200 μL HPLC级水中，并通过0.22 μm膜过滤。使用HPLC测定微生物发酵液中的SAM含量，具体条件参考先前报道的方法[16]。

2.4. 动物实验设计

本研究使用9周龄、体重为20~24 g的雄性C57BL/6J小鼠，共32只小鼠，随机分为4组（每组$n = 8$）：健康对照（HC）组、睡眠剥夺（SD）组、高产SAM的瑞士乳杆菌（Lh-SAM-H）组（处理菌株为CCFM1320）、低产SAM的瑞士乳杆菌（Lh-SAM-L）组（处理菌株为DSCAB11L3）。实验设计见附录A图S1（a）。

除HC组外，其余小鼠均施加SD，SD时间为每日12:30至次日8:30，共20 h，之后放回饲养笼内休息4 h，随后开始新一轮的睡眠剥夺。采用改良的多平台水环境法（MMPM）进行睡眠剥夺[17]。所用实验箱长40 cm、宽30 cm、高20 cm。在睡眠剥夺组实验箱箱底安置20个小平台，每个小平台直径为3 cm，高4 cm，各小平台之间间距为4 cm；当小鼠进入睡眠状态时，由于肌张力下降，可能导致其头部接触到水或直接落入水中，从而惊醒。健康对照组实验箱底部安置2个大平台，每个大平台直径为15 cm，高4 cm。在实验箱中注入约3 cm高的水，顶部放置足够的食物和水瓶，小鼠站在平台上能够自由接触食物和水，以确保睡眠剥夺期间小鼠可以自由饮食。

HC组和SD组的小鼠每天灌胃200 μL生理盐水，Lh-SAM-H和Lh-SAM-L组的小鼠则分别接受含5×10^9 CFU的CCFM1320或DSCAB11L3活菌悬液，为期14天。从第23天开始对小鼠进行行为学测试，包括旷场实验、新物体识别实验、Y迷宫实验[附录A图S1（a）]。实验结束后（第28天），对小鼠进行安乐死处理，采集相关器官进行后续实验。

2.5. 行为学实验

旷场测试：将实验小鼠放入40 cm × 40 cm的开阔场地中心后，立即开始计时并录像。观察6 min后停止录

像，记录期间小鼠在旷场中的移动轨迹、移动时间及移动速度，分析其自发活动能力及探索行为。

新物体识别测试：实验分为适应阶段和测试阶段。在适应阶段，将两个物体分别放置在箱体两端，小心将小鼠从物体对面的墙面中心背对物体放下，使其自由探索10 min以适应“旧物体”。间隔24 h后进入测试阶段，将其中一个“旧物体”替换为“新物体”，用相同的方法将小鼠放入箱内，使其自由探索10 min。记录小鼠对新旧物体的总探索时间，并计算识别指数和辨别指数。具体公式如下：识别指数=新物体探究时间/（新物体探究时间+熟悉物体探究时间）× 100%；辨别指数=（新物体探究时间–熟悉物体探究时间）/（新物体探究时间+熟悉物体探究时间）× 100%。

Y迷宫测试：将Y迷宫的3个臂随机设置为起始臂、新异臂及其他臂。实验分为两个阶段，第一阶段：用挡板封闭新异臂，使起始臂和其他臂保持开放。将实验小鼠放入起始臂内，小鼠可在两个开放臂间自由探索5 min。第二阶段：间隔4 h后，移除新异臂的挡板，使所有臂开放。再次将实验小鼠放入起始臂内，记录5 min内小鼠进入各臂的次数及停留时间，以评估其空间记忆能力。

2.6. 小鼠纹状体5-羟色胺代谢产物定量检测

采用高效液相色谱-荧光检测（HPLC-FD）系统测定小鼠大脑纹状体中5-羟色胺（5-HT）、*N*-乙酰血清素（NAS）及褪黑素的含量。组织样本经匀浆处理后，用5%的高氯酸进行蛋白沉淀，随后离心（6000*g*, 4 ℃, 15 min）。取上清液经0.22 μm滤膜过滤，之后上机检测。检测使用Waters Atlantis T3色谱柱（Waters，美国），检测条件参照文献[18]的方法。

2.7. 实时定量聚合酶链反应

使用TRIzol试剂（Invitrogen，美国）提取小鼠下丘脑和纹状体的总RNA。取20~30 mg脑组织，加入1 mL TRIzol和2颗灭酶磁珠进行均质处理，随后依次用氯仿、异丙醇和75%乙醇纯化RNA。测定总RNA浓度后，使用反转录试剂盒配置20 μL反转录体系，将1 μg总RNA反转录为互补DNA（cDNA）。反转完成后，用80 μL焦碳酸二乙酯（DEPC）水将cDNA稀释至适当浓度，用作后续实时定量聚合酶链反应（RT-qPCR）的模板。附录A表S2列出实验所用引物序列，以*Gapdh*作为参考基因。

2.8. 蛋白免疫印迹法（Western blot）

使用添加蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀试验（RIPA）裂解液从小鼠下丘脑提取总蛋白。采用10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离胶进行蛋白质分离，使用5% SDS-PAGE浓缩胶使样品进入分离胶。通过转移缓冲液和100 V电压将蛋白质从凝胶转移至0.22 μm的聚偏二氟乙烯（PVDF）膜。接下来使用5%脱脂乳粉封闭膜，室温孵育1 h。然后，使用一系列特异性一抗（β-actin单克隆抗体，武汉三鹰生物技术有限公司，货号为66009-1-Ig，1∶20 000；MTNR1A兔抗体，武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号为A13030，1∶1000；MT2A兔抗体，武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号为A22103，1∶500；环磷酸腺苷（cAMP）应答元件结合蛋白（CREB）1兔抗体，武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号为A11064，1∶500；Phospho-CREB1-S133兔抗体，武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号为AP0019，1∶500；BMAL1兔单克隆抗体，武汉爱博泰克生物科技有限公司，货号为A4714]在4 ℃孵育过夜。随后，使用对应的二抗[山羊抗兔免疫球蛋白-辣根过氧化物酶（IgG-HRP）抗体，爱必信（上海）生物科技有限公司，货号为abs20002，1∶20 000]进行孵育2 h，进行信号放大。最后，使用化学发光法进行检测，并用ImageJ软件对显影后的条带进行灰度扫描分析，定量蛋白表达水平。

2.9. 益生菌干预试验

在入组前（基线期），参与者完成PSQI和AIS问卷调查，以评估其睡眠质量并确认是否符合入组条件。符合条件的参与者完成量表后采集血液和粪便样本。

本研究共招募了60名失眠志愿者，随机分为3组：安慰剂组、低剂量CCFM1320干预（Pro-L）组、高剂量CCFM1320干预（Pro-H）组，每组20人。最终，安慰剂组脱靶2人，低剂量益生菌干预组脱靶2人，高剂量干预组所有参与者均完成试验[图5（a）]。安慰剂组每天服用麦芽糊精（2 g·d^{-1}），Pro-L和Pro-H组分别每天服用冻干菌粉（冻干保护剂为麦芽糊精，质量为2 g·d^{-1}，活菌数分别为5×10^6 CFU和5×10^9 CFU）。三组参与者无法通过所服用产品的外观或味道分辨出自己服用的是益生菌还是安慰剂。干预期间，要求参与者避免服用任何含益生菌的补充剂或食品，且不做其他饮食限制。益生菌或安慰剂的处理周期为4周，干预结束时，参与者在第4周末进行睡眠评估，并再次采集血液和粪便样本。

2.10. 粪便微生物16S核糖体RNA基因测序分析

使用MP Biomedical试剂盒（货号为6570200）提取细菌DNA，扩增细菌16S核糖体RNA（rDNA）的V3~V4区域，并在Illumina MiSeq平台（Illumina，美国）

进行测序。采用分裂扩增子去噪算法2（DADA2）数据库对双端读取进行质量过滤和去噪，生成扩增子序列变体（ASV）表。通过Shannon指数和观察到的物种数评估Alpha多样性，通过Aitchison距离和置换多变量方差分析（PERMANOVA）评估Beta多样性，并通过主成分分析（PCA）进行可视化。采用基于未观测状态重建的群落系统发育分析工具2（PICRUSt2）开展功能宏基因组分析，并注释京都基因与基因组百科全书（KEGG）正交分类（KOs）。

2.11. 统计学分析

在横断面研究中，使用非配对*t*检验分析对照组与失眠组之间的差异。通过MedCalc软件（v. 22.023, MedCalc Software Ltd，比利时）对血清SAM和皮质激素（CORT）进行受试者工作特征曲线（ROC）分析，以评估其对失眠的诊断潜力。基于血清SAM和皮质激素的logit模型预测概率构建ROC曲线，以评估这两个指标的联合诊断能力。

在动物实验中，所有数据在进一步分析前均通过Shapiro-Wilk检验进行正态性检验。采用单因素方差分析（one-way ANOVA）和Dunnett事后多重比较检验（与SD组比较）。在益生菌干预试验中，使用配对*t*检验评估安慰剂或益生菌干预前后的差异。通过单因素ANOVA及Dunnett事后多重比较检验（与安慰剂组比较）比较干预前后得分变化的组间差异。对于非正态分布数据，采用Mann-Whitney检验进行两组间比较，涉及三组时使用Kruskal-Wallis检验。所有多重比较的*p*值均进行了族系显著性（family-wise significance）调整。所有统计分析均使用Prism 9.0软件（GraphPad Software，美国）完成。

3. 结果

3.1. 血液循环中的SAM或有助于缓解失眠

本研究招募了20名失眠患者和20名健康志愿者。两组在年龄、性别、体重指数（BMI）和教育背景等人口学信息上无显著差异（详见附录A表S3）。在睡眠评分方面，失眠患者的PSQI和AIS评分显著高于健康对照组[图1（a）、（b）]。本研究对两组的血清进行了代谢组学分析，发现失眠组与对照组之间存在显著代谢差异[附录A图S1（b）]。以*p*小于0.05、倍数变化（FC）大于1.5、投影变量重要性（VIP）大于或等于1为筛选标准，鉴定出一些已知与睡眠相关的代谢物在失眠患者中显著减少，包括γ-氨基丁酸（GABA）和腺苷[图1（c）]。GABA作为抑制性神经递质，在睡眠初期促进睡眠[19]，但外周系统的GABA无法穿透血脑屏障，难以直接进入大脑，这对其作为药物或功能食品成分的应用提出了挑战[20–21]。腺苷通过激活A1和A2A等特定受体，调控细胞内cAMP浓度，从而调节睡眠[22]。此外，腺苷还可通过一系列生化反应转化为SAM。作为中枢神经系统内唯一的甲基供体，SAM参与了DNA、RNA及蛋白质的甲基化，这些反应对维持正常生物节律至关重要[23–24]。

本研究进一步通过LC-MS对患者血清中的SAM水平进行测定，结果显示失眠组显著低于对照组[图1（d）]。血清SAM水平与PSQI和AIS评分呈显著负相关[图1（e）]。代谢组学结果还发现糖皮质激素（包括皮质酮、皮质醇）在失眠患者血清中的含量显著上调，本研究通过基于酶联免疫吸附试验（ELISA）的绝对定量也证实了这一点[图1（f）]。最后，本研究发现血清SAM水平[曲线下面积（AUC）= 0.796，$p < 0.001$；图1（g）]和皮质醇水平[AUC = 0.895, $p < 0.001$；图1（h）]均对失眠具有较好的诊断潜力，且两者联合的逻辑回归模型进一步提高了诊断准确性[AUC = 0.933, $p < 0.001$；图1（i）]。以上结果表明，提升血液中的SAM水平或有助于改善失眠。

3.2. 高产SAM的瑞士乳杆菌CCFM1320能够缓解小鼠睡眠剥夺导致的神经行为异常

已有研究表明，肠道微生物能够合成SAM [25]。为探讨不同微生物菌株的SAM产生能力，本研究对从人体肠道分离的60株微生物（包括36株双歧杆菌和24株乳杆菌）进行了测定，结果显示不同菌株之间的SAM产量存在显著差异[图2（a）]。在双歧杆菌中，SAM产量最低的是长双歧杆菌C7，约为25.85 μg·L^{-1}；平均产量最高的是两歧双歧杆菌L2，约为204.2 μg·L^{-1}。在乳杆菌中，瑞士乳杆菌R6（原始菌株编号为DSCAB11L3）产量最低，为36.49 μg·L^{-1}，瑞士乳杆菌R8（原始菌株编号为CCFM1320）的SAM产量最高，约为375.4 μg·L^{-1}，远高于其他乳杆菌（如副干酪乳杆菌F4，约为183.1 μg·L^{-1}）以及双歧杆菌中产量最高的两歧双歧杆菌L2（约为204.2 μg·L^{-1}）。

本研究进一步利用睡眠剥夺小鼠模型评估了高产SAM的瑞士乳杆菌CCFM1320对神经行为的影响，并以低产SAM的瑞士乳杆菌DSCAB11L3作为对照[实验设计见附录A图S1（b）]。结果表明，SD导致小鼠体重显著下降[图2（b）]，但两株瑞士乳杆菌均未能逆转这一趋势。服用CCFM1320能够有效恢复SD小鼠粪便和血清中的SAM含量，并显著抑制血清皮质酮水平的升高，而DSCAB11L3未能表现出类似效果[图2（c）~（e）]。进一步的行为学测试显示，CCFM1320介导的SAM水平提升显著缓解了睡眠剥夺引起的小鼠神经行为异常。具体表现

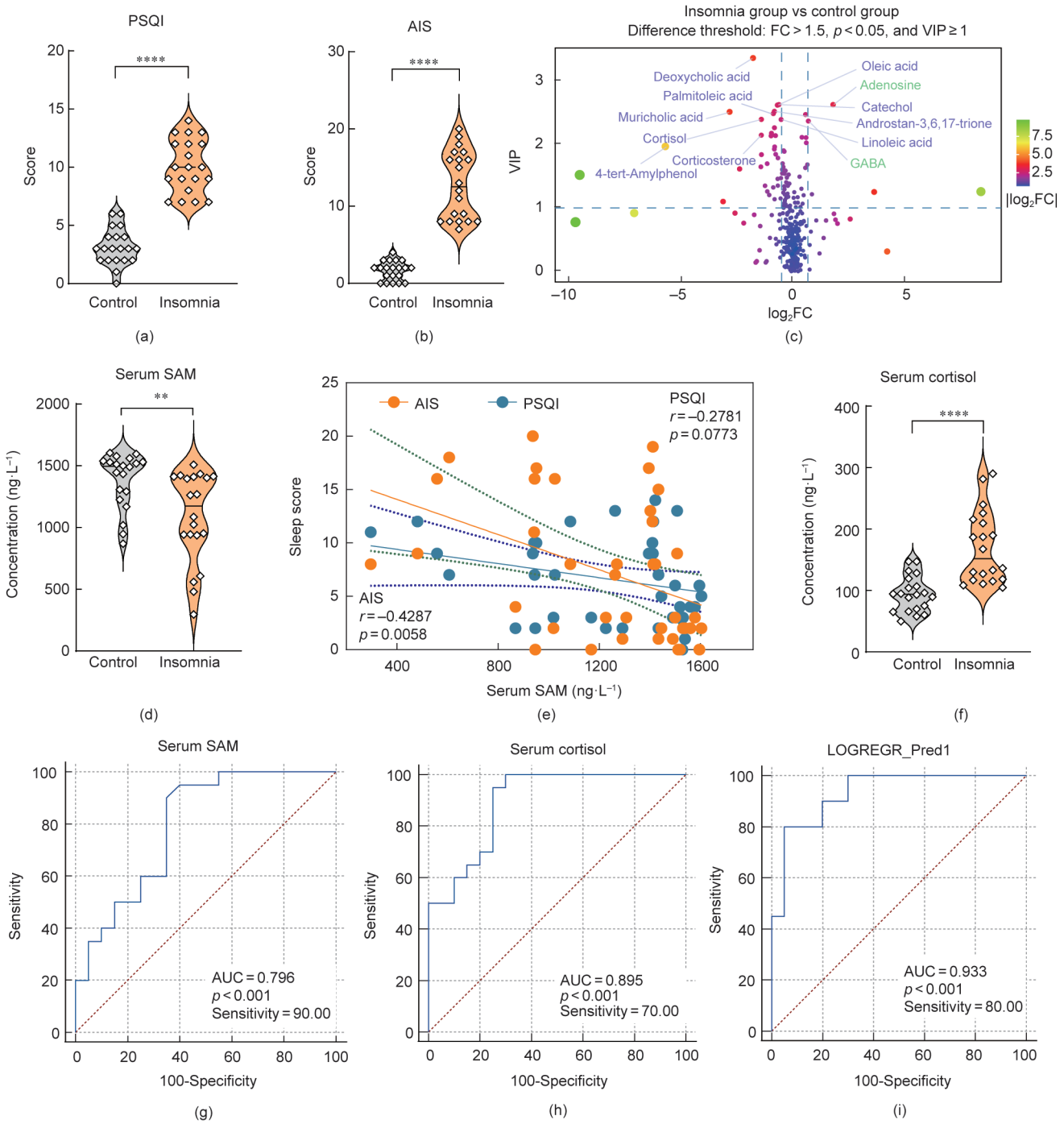


图1. 血清SAM和皮质醇水平与睡眠质量的相关性。（a）、（b）失眠患者与健康对照组之间PSQI评分和AIS评分的比较，每组$n = 20$；（c）火山图显示对照组与失眠组之间有显著差异的代谢物，生物标志物筛选标准为FC > 1.5（$|\log_2 FC| > 0.585$）、$p < 0.05$、VIP ≥ 1；（d）血清SAM水平，每组$n = 20$；（e）散点图展示患者血清SAM水平与其PSQI和AIS评分之间呈负相关；（f）血清皮质激素水平，每组$n = 20$；（g）～（i）诊断失眠的ROC曲线：（g）血清SAM，（h）血清皮质醇，（i）血清SAM和皮质醇的逻辑回归预测概率（LOGREGR_Pred1）。$^{*}p < 0.05$，$^{****}p < 0.0001$，使用非配对t检验。r：Pearson相关系数。

为小鼠对新物体的辨识和记忆能力增强[图2（f）]、旷场测试中活动量显著减少[图2（g）、（h）]，以及在Y迷宫中空间探索能力得到改善[图2（i）]。这些结果表明，高产SAM的瑞士乳杆菌CCFM1320有助于改善睡眠剥夺引起的神经行为异常。

3.3. 瑞士乳杆菌CCFM1320可调节脑部褪黑素合成以及昼夜节律基因表达

褪黑素（MT，即*N*-乙酰-5-甲氧基色胺）的合成主要发生在夜间阶段，由血清素*N*-乙酰转移酶（AANAT）将5-HT转化为NAS，随后在乙酰血清素*O*-甲基转移酶

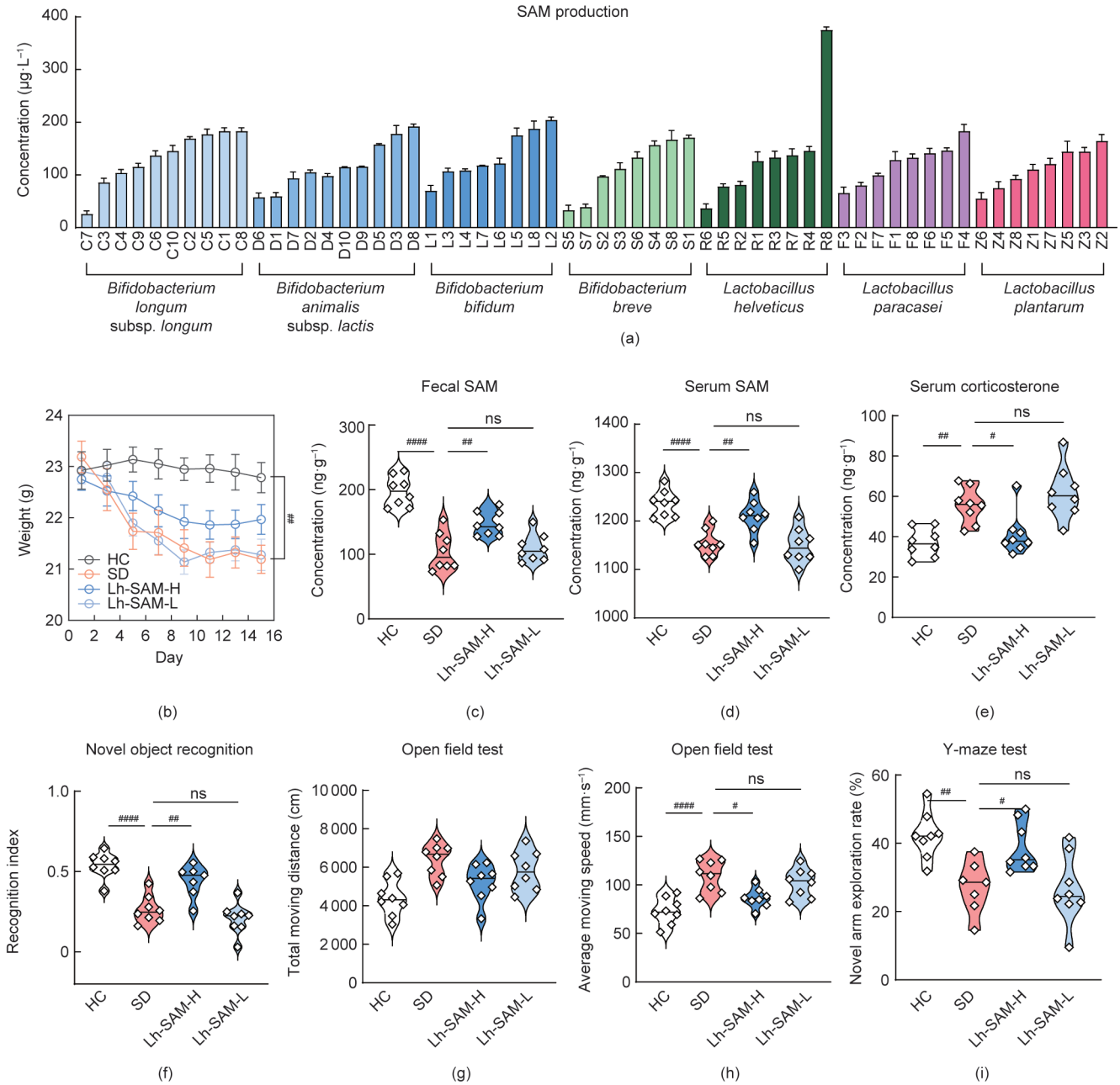


图2. 高产SAM的瑞士乳杆菌逆转睡眠剥夺小鼠的神经行为异常。（a）HPLC测定从人体粪便中分离的60种肠道微生物菌株的SAM生产能力，包括36株双歧杆菌和24株乳酸菌菌株（每种菌株重复3次），通过筛选，鉴定出一株高产SAM的瑞士乳杆菌R8（完整菌株编号为CCFM1320，在后续图中称为Lh-SAM-H），以及一株低产SAM的对照菌株（完整菌株编号为DSCAB11L3，在后续图中称为Lh-SAM-L）用于进一步实验；（b）小鼠在两周益生菌干预期间的体重变化；（c）、（d）粪便和血清中的SAM水平，每组$n=8$；（e）血清皮质酮水平，每组$n=8$；（f）～（i）行为测试：（f）新物体识别测试，（g）、（h）旷场测试，（i）Y迷宫测试，每组$n=8$。$^{\#}p<0.05$，$^{\#\#}p<0.01$，$^{\#\#\#}p<0.001$，$^{\#\#\#\#}p<0.0001$，使用单因素ANOVA和Dunnett事后多重比较检验。ns：无显著性。

（HIOMT）的作用下转化为MT，SAM在这一过程中提供甲基[26–27]，如图3（a）所示。作为一种重要的神经递质，MT在改善睡眠和调节生物节律方面发挥着关键作用[28]。本研究结果显示，CCFM1320能够逆转SD引起的小鼠纹状体中SAM和MT水平的下降[图3（b）、（c）]，但对5-HT、NAS、AANAT和HIOMT水平未表现出显著影响[图3（d）～（g）]。这一结果表明，MT水平的提升主要是通过SAM的贡献。考虑到MT作为一种激素的作用，本研究还测定了血清中的MT水平，并观察到了相似的组间差异[图3（h）]。

接着，本研究测定了下丘脑中15种与生物节律相关的基因的转录水平[图4（a）]。与健康小鼠相比，SD组小鼠下丘脑中*Per1*的转录水平显著降低，而*Per2*、*Per3*、*Cry1*、*Cry2*、*Bmal1*、*Clock*、*Timeless*、*Rev-erbα*、*RORα*、

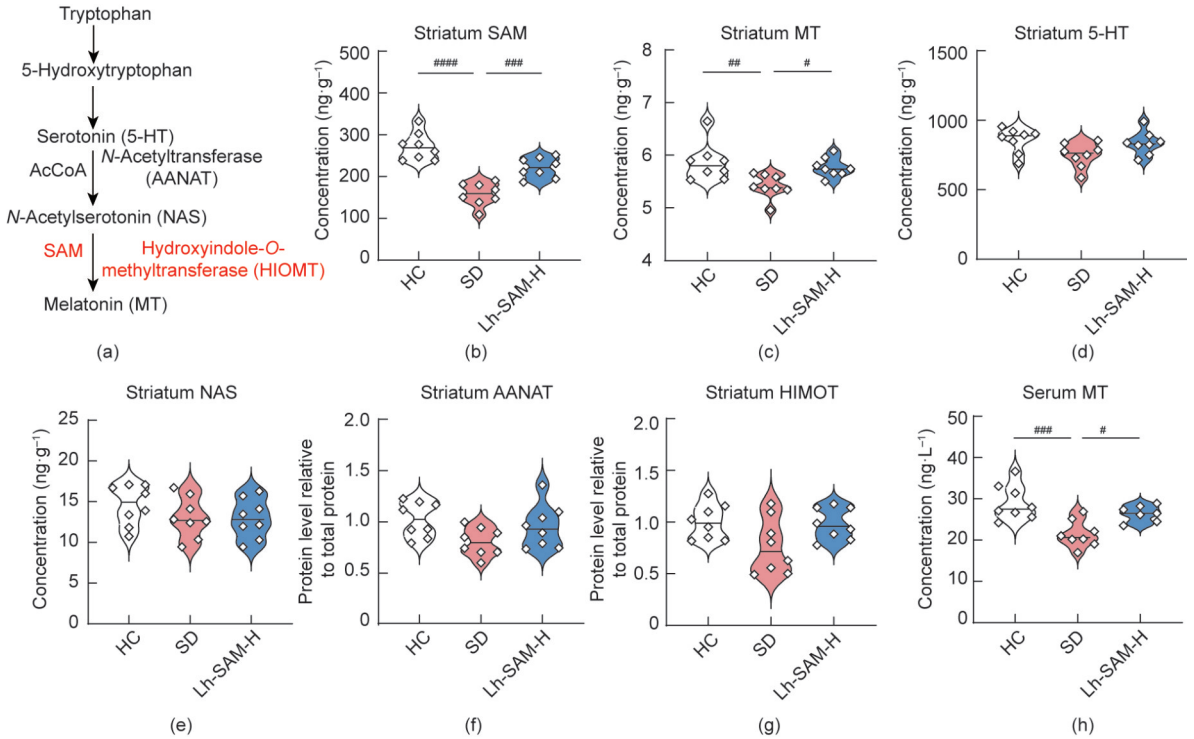


图3. 高产SAM的益生菌对纹状体中MT生物合成的影响。（a）现有研究对MT生物合成途径的理解（AcCoA：乙酰辅酶A）；HPLC测定纹状体中SAM（b）、褪黑素（c）、5-羟色胺（5-HT）（d）、NAS（e）代谢物的水平，每组$n = 8$；（f）～（g）纹状体中HIOMT和AANAT的蛋白水平，每组$n = 8$；（h）血清MT水平，每组$n = 8$。$^{\#}p < 0.05$，$^{\#\#}p < 0.01$，$^{\#\#\#}p < 0.001$，$^{\#\#\#\#}p < 0.0001$，使用单因素ANOVA和Dunnett事后多重比较检验。

*Napas2*的转录水平则显著升高；*c-fos*、*Ciart*、*DBP*和*Rev-erbβ*的转录水平也有升高，但无统计学差异。益生菌治疗显著逆转了SD引起的*Per2*、*Cry2*、*Bmal1*、*Timeless*、*Rev-erbα*、*RORα*和*Napas2*的转录异常。有趣的是，除了*Rev-erbα*和*DBP*外，其余节律基因均与至少一项行为表型存在显著相关性；其中，*Per1*、*Cry1*和*Bmal1*与所有行为学表型均显著相关[图4（b）]。脑和肌肉*arnt-like 1*（*Bmal1*）基因作为生物钟的核心基因，在维持机体生命活动中的重要调控作用已得到广泛认可。

先前的研究表明，MT通过与其受体结合，激活cAMP/蛋白激酶（PKA）通路，促进CREB的磷酸化和活化，进一步影响转录因子*Bmal1*的表达[29]。鉴于益生菌显著影响MT水平和*Bmal1*基因的转录，本研究进一步分析了这一信号通路中的蛋白水平。结果显示，睡眠剥夺和益生菌处理均未显著影响小鼠下丘脑中MT的两种受体（MT1和MT2）及转录因子CREB的蛋白水平。然而，益生菌能够显著逆转睡眠剥夺引起的磷酸化CREB（p-CREB）和Bmal1蛋白表达的下降[图4（c）、（d）]。这可能是由于益生菌通过SAM介导的MT水平升高所导致，但这一机制仍需通过MT受体敲除小鼠模型进一步验证。

3.4. 瑞士乳杆菌CCFM1320作为改善失眠患者睡眠质量的辅助治疗方法

为进一步评估瑞士乳杆菌CCFM1320在改善睡眠方面的临床效果，本研究开展了一项随机、安慰剂对照的临床试验，针对失眠患者进行干预[图5（a）]。益生菌干预组设有两种剂量：5×10^6 CFU·d^{-1}和5×10^9 CFU·d^{-1}，以探讨益生菌的剂量-效应关系。所有患者均被建议优先使用益生菌（或安慰剂）而非安眠药物，且在试验期间服用安眠药物的患者未纳入最终分析（人口学信息见附录A表S4）。结果显示，益生菌干预组的患者在4周后，PSQI和AIS评分均显著降低[图5（b）、（c）]。

本研究进一步对治疗前后量表分数的变化进行了组间分析，以对比不同剂量益生菌干预的效果差异。结果表明，三组患者在PSQI量表评分上的降低程度有所不同；与Pro-L组相比，Pro-H组治疗前后PSQI评分的降低幅度更大，且与安慰剂组相比存在统计学差异[图5（b）]。然而，在AIS量表评分的变化方面，三组患者并未表现出显著差异[图5（c）]。

此外，分析发现，与低剂量益生菌组相比，高剂量益生菌显著提高了血清SAM水平并降低了血清皮质醇水平，且与安慰剂组相比具有统计学意义[图5（d）、（e）]。然而，益生菌组和安慰剂组之间的血清MT水平未显示出显著差异[图5（f）]。

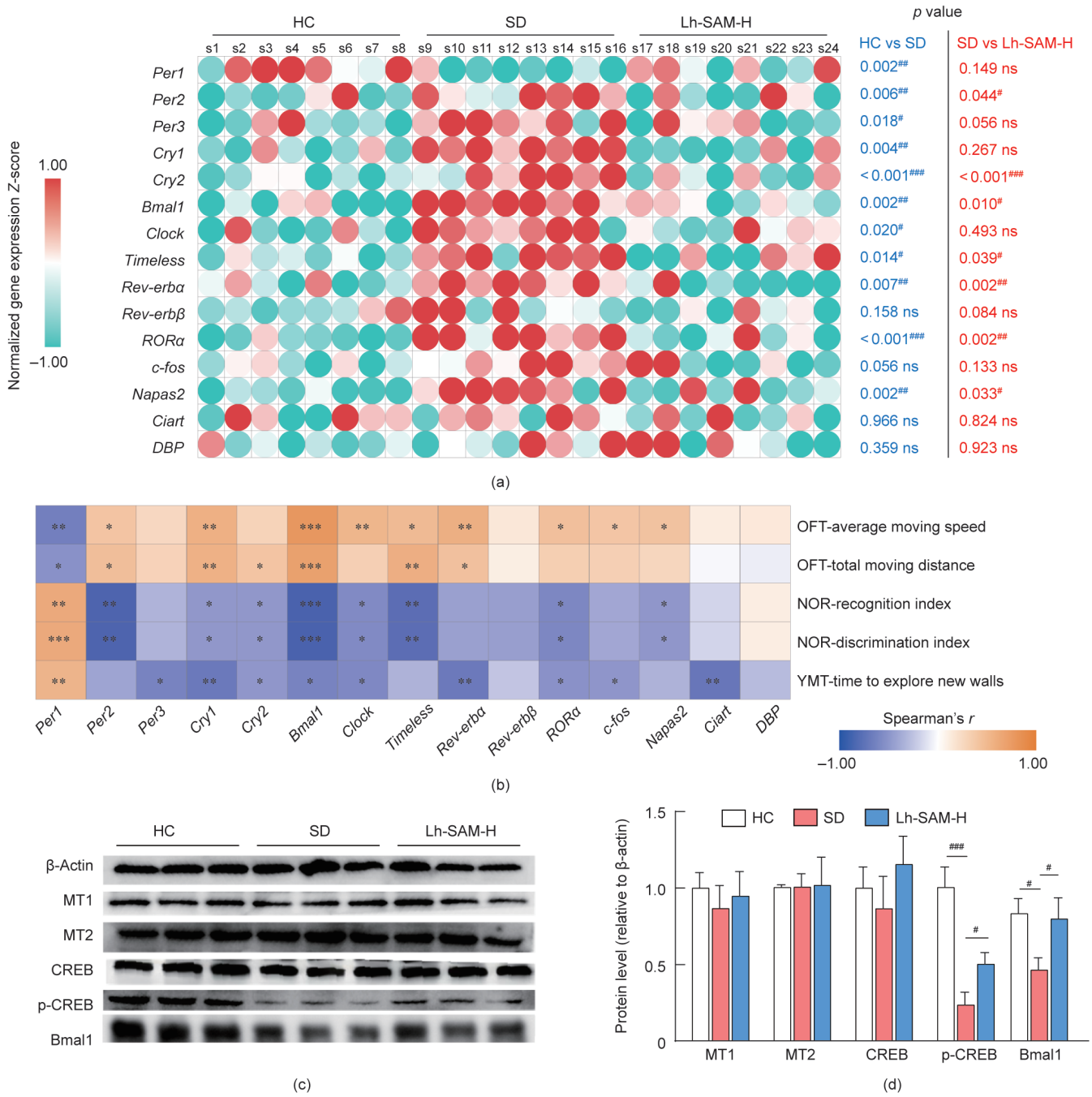


图4. 益生菌对下丘脑与昼夜节律相关基因转录的影响。（a）下丘脑中15个昼夜节律相关基因的信使RNA（mRNA）水平。使用单因素ANOVA和Dunnett事后多重比较检验评估组间差异；*Z*-score：表示数据点与均值相差的标准差数的统计量；$^{\#}p < 0.05$，$^{\#\#}p < 0.01$，$^{\#\#\#}p < 0.001$。（b）15个昼夜节律相关基因的表达水平与小鼠行为表型之间的Spearman相关性分析；$^{*}p < 0.05$，$^{**}p < 0.01$，$^{***}p < 0.001$表示显著相关。OFT：旷场测试；NOR：新物体识别；YMT：Y迷宫测试。（c）、（d）蛋白质印迹分析MT介导的CREB-Bmal1信号通路，β-actin作为加载对照。使用单因素ANOVA和Dunnett事后多重比较检验评估组间差异；$^{\#}p < 0.05$，$^{\#\#\#}p < 0.001$。

3.5. 瑞士乳杆菌CCFM1320改变了失眠患者的肠道核心菌群结构及SAM合成能力

本研究对Pro-H组和安慰剂组患者的肠道菌群进行了16S rRNA基因扩增子测序分析。结果显示，无论是益生菌还是安慰剂干预，均未显著影响肠道菌群的α多样性和β多样性[附录A图S1（g）～（i）]。然而，益生菌和安慰剂的治疗均对核心菌群的种类和丰度产生了影响（核心菌群定义为在样本中检出率大于或等于50%且相对丰度大于或等于1%的物种）。安慰剂治疗后，肠道中出现了两种新的核心物种——丹毒丝菌（*Erysipelotrichaceae*）UCG 003和链球菌（*Streptococcus*），这两种菌种被广泛报道与宿主的炎症和感染密切相关[30–32]。相比之下，

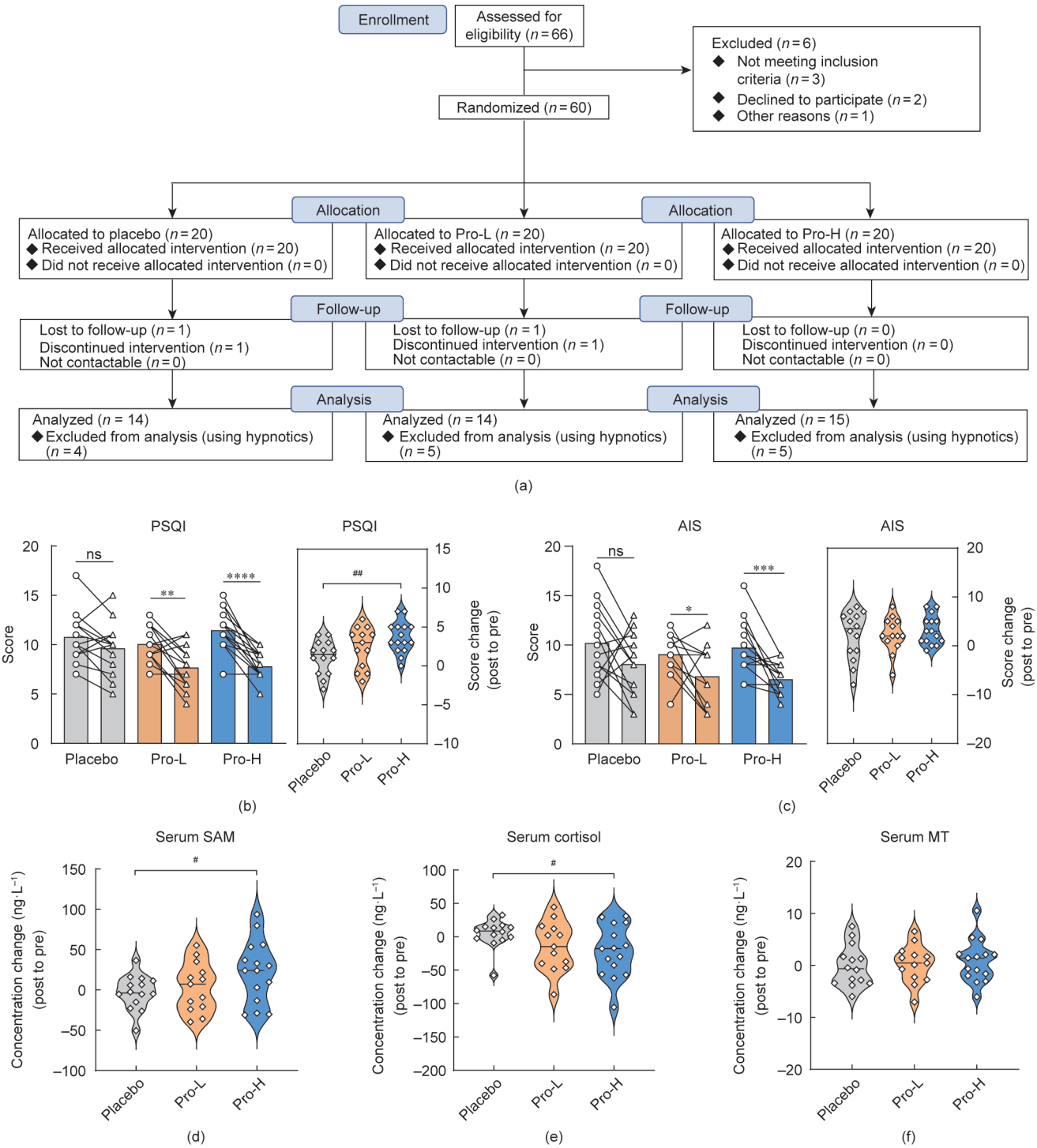


图5. 瑞士乳杆菌CCFM1320改善失眠的临床效果评价。（a）患者招募和分组流程图，实验结束时纳入数据分析的样本数为安慰剂组14人，Pro-L组14人，Pro-H组15人；分析益生菌干预前后（用点标记）和干预后（用三角形标记）PSQI评分（b）和AIS评分（c）的变化（配对t检验用于分析同一组内基线与治疗后评分的差异；$^{*}p<0.05$，$^{**}p<0.01$，$^{***}p<0.001$，$^{****}p<0.0001$。单因素ANOVA和Dunnett事后多重比较检验用于分析各组间干预前后评分的变化；$^{\#\#}p<0.01$）；分析组间治疗前后血清SAM（d）、皮质醇（e）和MT（f）水平的变化（单因素ANOVA和Dunnett事后多重比较检验用于分析；$^{\#}p<0.05$）。

益生菌治疗使得核心肠道物种的数量从14种减少至10种，其中包括了致病菌链球菌和柯林斯菌（*Collinsella*）[33]，如图6（a）所示。通过线性判别分析（LDA）效应值分析，本研究进一步比较了益生菌治疗和安慰剂治疗前后的差异物种，结果表明，益生菌治疗显著提高了毛螺菌（*Lachnospiraceae*）ND3007的丰度[图6（b）]，这种菌的减少曾被报道与抑郁症和帕金森病的发生发展相关[34–35]。与安慰剂组相比，Pro-H组显示了更高丰度的霍尔德曼菌

（*Holdemanella*）和福涅雷拉菌（*Fournierella*），这两种菌种已被报道与改善糖脂代谢、增强抗癌药物疗效相关[36–37]。

最后，本研究对肠道菌群的功能进行了预测性注释，针对SAM合成相关通路中的酶丰度进行了组间差异分析。在已报道的SAM合成及代谢通路中，共注释到4个相关酶：SAM合成酶（EC:2.5.1.6）、DNA（胞嘧啶-5-）-甲基转移酶（EC:2.1.1.37）、SAM脱羧酶（EC:4.1.1.50）和亚精胺合成酶（EC:2.5.1.16）[图6（c）]。这些酶的丰度在益生菌治疗后显著增加，这可能是由于高产SAM的益生菌的引入，以及SAM在肠道中的累积。

4. 讨论

本研究探讨了SAM作为失眠障碍临床诊断生物标志物的潜力，并筛选出一株高产SAM的乳酸菌瑞士乳杆菌CCFM1320，系统评估了其对睡眠剥夺小鼠及失眠患者的生理改善作用，并证实了其作用机制与SAM介导的甲基化和MT合成、恢复大脑中节律相关基因表达正常化相关。

SAM是参与DNA、RNA和组蛋白甲基化的唯一甲基供体。使用3-去氮腺嘌呤A（Dznep）药物模拟甲基化缺陷的研究表明，甲基化水平的变化能够扰乱生物体的生物节律[38]。在中枢神经系统中，SAM不仅直接参与MT的合成，还可以通过调控组蛋白与DNA的甲基化影响节律基因的表达，进而影响生物体的生物节律[23–24,26]。本研究发现睡眠障碍患者血清中SAM水平与对照组存在显著差异，这提示其具有较好的疾病判别潜力，尤其是在与皮质醇联合检测时；考虑到目前主流的精神量表诊断方

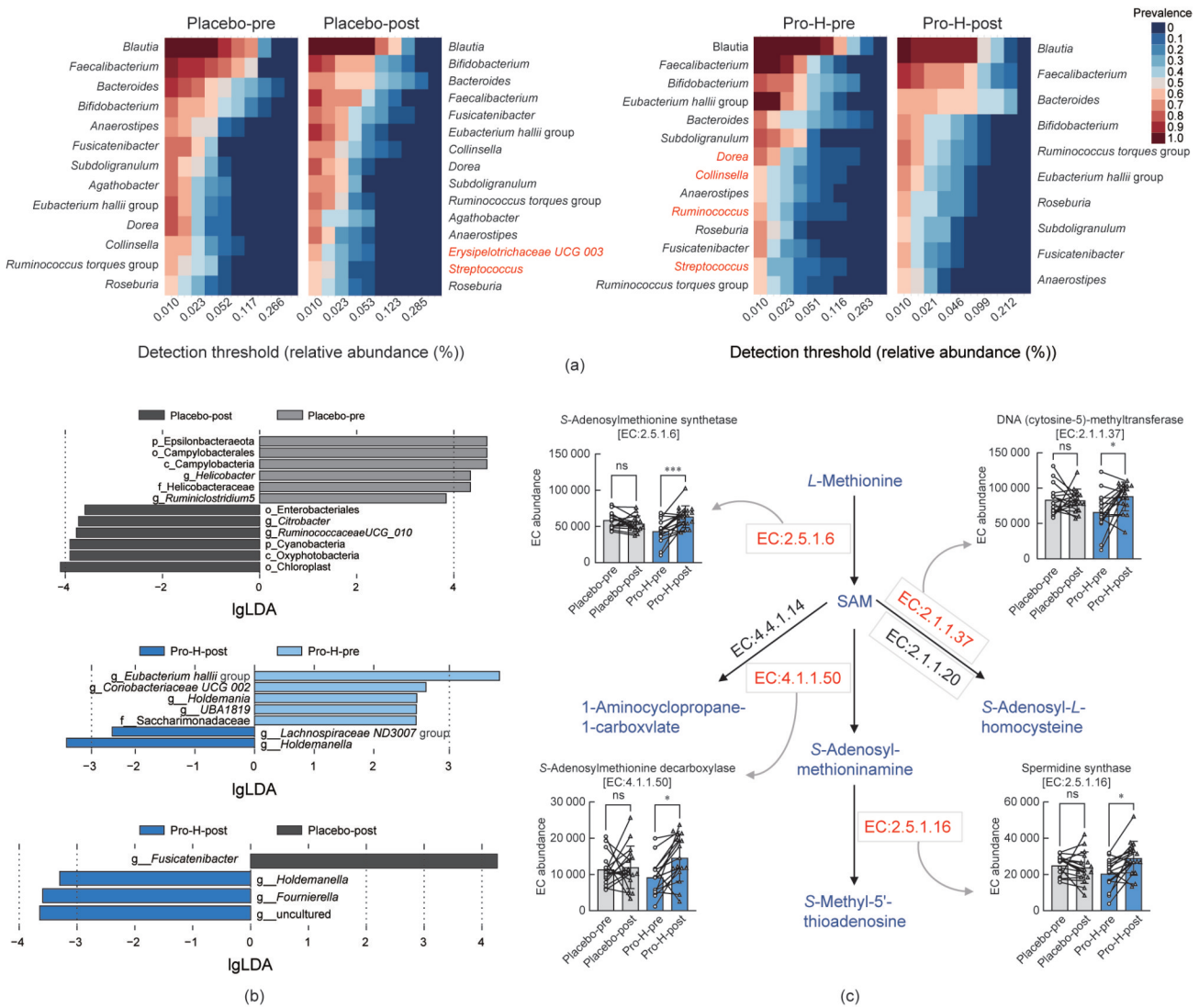


图6. 瑞士乳杆菌CCFM1320对失眠患者肠道菌群的影响。（a）核心菌群分析，显示在超过50%人群中出现，且相对丰度大于或等于0.01%的分类群；（b）组间差异物种分析，使用线性判别分析效应值（LEfSe）识别显著的微生物分类群（$p < 0.05$且lgLDA > 2.0作为阈值）；（c）SAM合成和代谢途径相关酶的丰度分析，红色标签表示已注释的酶，各组间相关酶的丰度存在差异。

法，该生物标志物可以有效避免主观因素带来的误差。

研究表明，SAM能够跨越血脑屏障，因此口服或注射给药能够显著提高脑脊液中的SAM水平，有效治疗多种精神神经疾病[39–40]。一项纳入1522名受试者的荟萃分析比较了SAM与安慰剂作为单一疗法、SAM与丙咪嗪或艾司西酞普兰作为单一疗法，以及SAM与安慰剂作为辅助疗法的效果，发现SAM能够缓解抑郁症状，且其效果与丙咪嗪或艾司西酞普兰相似[41]。口服SAM还改善了抑郁症患者的睡眠质量，并减少了在压力下HPA轴的过度激活[42–43]。然而，最近的研究发现，在生理条件下，外源性SAM的过量摄入可能会干扰生物节律，因此SAM作为膳食补充剂的安全性仍存在争议。

SAM广泛存在于生物体内。本研究发现多种肠道益生菌也能合成SAM，包括乳杆菌属和双歧杆菌属。与直接摄入SAM相比，通过益生菌提供内源性SAM具有以下优势：首先，益生菌能够在人体肠道中持续定植，形成缓释效应，从而避免了口服用药的缺点（包括因药物半衰期较短导致的快速清除和间歇性用药的需求，以及短期内药物的血浆高浓度暴露带来的潜在风险[44]）；此外，益生菌作为活性微生物，能够调节肠道菌群的生态平衡，并通过“菌群-肠-脑轴”发挥作用[45]。值得注意的是，肠道微生物及其与肠道的相互作用能够产生大量的神经递质及其前体（如5-HT、多巴胺、乙酰胆碱等），从而实现肠神经系统与中枢神经系统之间的相互通信[46–47]。本团队之前的动物研究发现失眠小鼠肠道菌群中的SAM合成途径和GABA降解途径受到显著破坏[48]。

肠道菌群作为一个复杂的微生态系统，外源性菌株的引入并不一定产生“加法”效应。如果菌株具有较强的定植能力，可能会表现出较明显的加法效应；反之，较弱的定植能力可能导致其被原住菌群排斥。在此背景下，本研究认为瑞士乳杆菌CCFM1320未能稳定定植肠道。通过分析16S rRNA扩增子测序数据中的乳酸菌相对丰度，发现Pro-H治疗前后乳杆菌丰度未出现显著变化[附录A图S1（j）]。这一结果与先前对其他乳杆菌株（如鼠李糖乳杆菌、罗伊氏乳杆菌和植物乳杆菌）的研究一致，这些菌株的定植时间通常短于7天，而双歧杆菌可以在肠道内定植超过两周[49]。为了准确评估菌株的定植能力，必须开发特异性引物并利用RT-qPCR进行绝对定量。此外，还需要考虑停止摄入后的自然洗脱时间，以评估菌株的持久性。

然而，这种定植能力的缺失并不会完全削弱益生菌的效果，特别是在持续摄入的情况下。本研究的人群试验进一步验证了这些发现，结果显示，尽管益生菌干预未改变整体肠道微生物群的多样性，但它显著增加了与SAM合成和代谢相关基因的丰度。这些结果支持以下假设：引入高产SAM的益生菌后，其较弱的定植能力未能显著增加乳酸菌的丰度，反而通过刺激代谢反应，使SAM被其他微生物物种消耗。这反映在肠道菌群中EC:2.1.1.37、EC:4.4.4.50和EC:5.5.1.16等酶的表达上。此外，益生菌的引入减少了肠道核心微生物群中潜在致病菌的数量，有助于改善免疫稳态并减少炎症反应。研究表明，这种变化有助于逆转睡眠剥夺引起的神经生理异常，如粪便微生物移植实验所示[9]。综上，本研究提出，通过持续摄入益生菌补充SAM，可调节皮质醇和褪黑素水平来直接改善睡眠，同时可减少致病物种和炎症。

必须指出的是，受限于当前的技术条件，本研究还存在一些待解决的问题：①肠道微生物源SAM对循环系统和大脑中SAM的补充效率仍需进一步确认，尤其需要采用同位素标记的方法进行药代动力学研究；②为了评估益生菌的效果，本研究对治疗前后量表分数的变化值进行了组间分析，而不仅仅关注治疗前后的分值变化，这样可以排除机体自然恢复导致的变化，但遗憾的是，本研究仅在PSQI量表评分、血清SAM和皮质醇水平上观察到了益生菌干预后出现的统计学显著性，AIS量表评分和血清褪黑素无统计学差异，这与益生菌在动物试验中的强烈效果不一致。MT由松果体分泌，其浓度波动遵循昼夜节律，夜间分泌量较高[50–51]。由于实验限制，在本研究中，大多数患者的血液样本是在白天采集的，这未能准确反映MT的分泌情况。相比之下，小鼠实验中，血液样本是在人体白天期间采集的，恰好与小鼠的夜间相对应，导致血清中MT的敏感性和浓度较高，从而放大了组间观察到的差异。这强调了未来研究需要选择更合适的时间点、样本量和干预持续时间，以更准确地评估激素分泌能力。

5. 总结

总体而言，本研究突出了SAM作为睡眠障碍生物标志物和治疗靶点的潜力，回应了对新型治疗策略的迫切需求。本研究证明了高产SAM的益生菌瑞士乳杆菌CCFM1320在显著改善睡眠质量和缓解睡眠剥夺相关神经行为损伤方面的有效性。从机制上看，CCFM1320通过促进NAS的甲基化，增强了MT的合成，从而使昼夜节律基因的表达恢复正常。临床试验进一步支持了这一益生菌干预的疗效，显示睡眠质量和相关生物标志物显著改善。本研究为缓解睡眠障碍提供了一种有前景的益生菌基础治疗方法，并提出了一种通过调节肠道微生物群恢复健康睡眠模式的非药物替代方案。

CRediT authorship contribution statement

Peijun Tian: Writing-review & editing, Writing-original draft, Funding acquisition, Conceptualization. **Yuming Lan:** Visualization, Investigation. **Zhiying Jin:** Visualization, Investigation. **Feng Hang:** Resources. **Xuhua Mao:** Methodology. **Xing Jin:** Investigation. **Gang Wang:** Methodology, Funding acquisition. **Wei Chen:** Writing-review & editing, Supervision, Resources, Funding acquisition, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

伦理声明

本研究的横断面调查和益生菌干预试验获得了宜兴市人民医院医学伦理委员会的批准，相关临床试验在中国临床试验注册中心完成注册（ChiCTR2300067806 和 ChiCTR2400080254）。动物实验获得了江南大学动物实验伦理委员会的批准（20221230c0640630 [571]）。

致谢

本研究得到了国家自然科学基金（32394051 和 32201988）、国家重点研发计划（2023YFC2506004）、中央高校基本科研业务费（JUSRP123047）、江苏省科技计划专项资金（BM2022019），以及江苏省食品安全与质量控制协同创新中心项目的资助。

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.eng.2024.12.025.

References

[1] Watson NF, Badr MS, Belenky G, Bliwise DL, Buxton OM, Buysse D, et al. Joint consensus statement of the American academy of sleep medicine and sleep research society on the recommended amount of sleep for a healthy adult: methodology and discussion. J Clin Sleep Med 2015;11(8):931–52.
[2] Aernout E, Benradia I, Hazo JB, Sy A, Askevis-Leherpeux F, Sebbane D, et al. International study of the prevalence and factors associated with insomnia in the general population. Sleep Med 2021;82:186–92.
[3] Morin CM, Bjorvatn B, Chung F, Holzinger B, Partinen M, Penzel T, et al. Insomnia, anxiety, and depression during the COVID-19 pandemic: an international collaborative study. Sleep Med 2021;87:38–45.
[4] Xie Z, Chen F, Li WA, Geng X, Li C, Meng X, et al. A review of sleep disorders and melatonin. Neurol Res 2017;39(6):559–65.
[5] Perlis ML, Posner D, Riemann D, Bastien CH, Teel J, Thase M. Insomnia. Lancet 2022;400(10357):1047–60.
[6] Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. Physiol Rev 2010;90(3):859–904.
[7] Generoso JS, Giridharan VV, Lee J, Macedo D, Barichello T. The role of the microbiota–gut–brain axis in neuropsychiatric disorders. Br J Psychiatry 2021;43(3):293–305.
[8] Li Y, Zhang B, Zhou Y, Wang D, Liu X, Li L, et al. Gut microbiota changes and their relationship with inflammation in patients with acute and chronic insomnia. Nat Sci Sleep 2020;12:895–905.
[9] Wang Z, Chen WH, Li SX, He ZM, Zhu WL, Ji YB, et al. Gut microbiota modulates the inflammatory response and cognitive impairment induced by sleep deprivation. Mol Psychiatry 2021;26(11):6277–92.
[10] Berding K, Bastiaanssen TFS, Moloney GM, Boscaini S, Strain CR, Anesi A, et al. Feed your microbes to deal with stress: a psychobiotic diet impacts microbial stability and perceived stress in a healthy adult population. Mol Psychiatry 2023;28(2):601–10.
[11] Nakakita Y, Tsuchimoto N, Takata Y, Nakamura T. Effect of dietary heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 (SBL88^{TM}) on sleep: a non-randomised, double blind, placebo-controlled, and crossover pilot study. Benef Microbes 2016;7(4):501–9.
[12] Sawada D, Kawai T, Nishida K, Kuwano Y, Fujiwara S, Rokutan K. Daily intake of *Lactobacillus gasseri* CP2305 improves mental, physical, and sleep quality among Japanese medical students enrolled in a cadaver dissection course. J Funct Foods 2017;31:188–97.
[13] Lan Y, Lu J, Qiao G, Mao X, Zhao J, Wang G, et al. *Bifidobacterium breve* CCFM1025 improves sleep quality via regulating the activity of the HPA axis: a randomized clinical trial. Nutrients 2023;15(21):4700.
[14] Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh sleep quality index: a new instrument for psychiatric practice and research. Psychiatry Res 1989;28(2):193–213.
[15] Soldatos CR, Dikeos DG, Paparrigopoulos TJ. The diagnostic validity of the Athens insomnia scale. J Psychosom Res 2003;55(3):263–7.
[16] Park S, Kim MJ, Hong J, Kim HJ, Yi SH, Lee MK. Selection and characterization of *Cheonggukjang* (fast fermented soybean paste)-originated bacterial strains with a high level of *S*-adenosyl-*L*-methionine production and probiotics efficacy. J Med Food 2014;17(11):1170–6.
[17] van Hulzen ZJ, Coenen AM. Paradoxical sleep deprivation and locomotor activity in rats. Physiol Behav 1981;27(4):741–4.
[18] Tian P, Zou R, Wang L, Chen Y, Qian X, Zhao J, et al. Multi-probiotics ameliorate major depressive disorder and accompanying gastrointestinal syndromes via serotonergic system regulation. J Adv Res 2023;45: 117–25.
[19] Yamatsu A, Yamashita Y, Pandharipande T, Maru I, Kim M. Effect of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans. Food Sci Biotechnol 2016;25(2):547–51.
[20] Kuriyama K, Sze PY. Blood–brain barrier to H3-gamma-aminobutyric acid in normal and amino oxyacetic acid-treated animals. Neuropharmacology 1971;10(1):103–8.
[21] Roberts E. Gamma-aminobutyric acid and nervous system function—a perspective. Biochem Pharmacol 1974;23(19):2637–49.
[22] Ma WX, Yuan PC, Zhang H, Kong LX, Lazarus M, Qu WM, et al. Adenosine and P1 receptors: key targets in the regulation of sleep, torpor, and hibernation. Front Pharmacol 2023;14:1098976.
[23] Greco CM, Cervantes M, Fustin JM, Ito K, Ceglia N, Samad M, et al. *S*-adenosyl-*L*-homocysteine hydrolase links methionine metabolism to the circadian clock and chromatin remodeling. Sci Adv 2020;6(51):eabc5629.
[24] Fustin JM. Methyl metabolism and the clock: an ancient story with new perspectives. J Biol Rhythms 2022;37(3):235–48.
[25] Kim JY, Suh JW, Ji GE. Evaluation of *S*-adenosyl-*L*-methionine production by *Bifidobacterium bifidum* BGN4. Food Sci Biotechnol 2008;17(1):184–7.
[26] Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic *O*-methylation of *N*-acetylserotonin to melatonin. Science 1960;131(3409):1312.
[27] Samanta S. Physiological and pharmacological perspectives of melatonin. Arch Physiol Biochem 2022;128(5):1346–67.

[28] Cruz-Sanabria F, Faraguna U, Violi M, Bruno S, Gravina D, Bonelli C, et al. Effects of exogenous melatonin on sleep and circadian rhythm parameters in bipolar disorder with comorbid delayed sleep-wake phase disorder: an actigraphic study. J Psychiatr Res 2023;165:96–104.
[29] Zhao SQ, Gao Y, Zhang Y, Yang XP, Yang Z. cAMP/PKA/CREB signaling pathway-mediated effects of melatonin receptor genes on clock gene expression in Bactrian camel ovarian granulosa cells. Domest Anim Endocrinol 2021;76:106609.
[30] Kaakoush NO. Insights into the role of *Erysipelotrichaceae* in the human host. Front Cell Infect Microbiol 2015;5:84.
[31] Yang J, Ma Y, Tan Q, Zhou B, Yu D, Jin M, et al. Gut *Streptococcus* is a microbial marker for the occurrence and liver metastasis of pancreatic cancer. Front Microbiol 2023;14:1184869.
[32] Yu D, Yang J, Jin M, Zhou B, Shi L, Zhao L, et al. Fecal *Streptococcus* alteration is associated with gastric cancer occurrence and liver metastasis. MBio 2021;12(6):e02994–3021.
[33] Ruiz-Limón P, Mena-Vázquez N, Moreno-Indias I, Manrique-Arija S, Lisbona-Montañez JM, Cano-García L, et al. *Collinsella* is associated with cumulative inflammatory burden in an established rheumatoid arthritis cohort. Biomed Pharmacother 2022;153:113518.
[34] Nishiwaki H, Hamaguchi T, Ito M, Ishida T, Maeda T, Kashihara K, et al. Short-chain fatty acid-producing gut microbiota is decreased in Parkinson's disease but not in rapid-eye-movement sleep behavior disorder. mSystems 2020; 5(6): e00797–820.
[35] Zheng S, Zhu Y, Wu W, Zhang Q, Wang Y, Wang Z, et al. A correlation study of intestinal microflora and first-episode depression in Chinese patients and healthy volunteers. Brain Behav 2021;11(8):e02036.
[36] Romaní -Pérez M, López-Almela I, Bullich-Vilarrubias C, Rueda-Ruzafa L, Gómez Del Pulgar EM, Benítez-Páez A, et al. *Holdemanella biformis* improves glucose tolerance and regulates GLP-1 signaling in obese mice. FASEB J 2021; 35(7):e21734.
[37] Andrews MC, Duong CPM, Gopalakrishnan V, Iebba V, Chen WS, Derosa L, et al. Gut microbiota signatures are associated with toxicity to combined CTLA-4 and PD-1 blockade. Nat Med 2021;27(8):1432–41.
[38] Fustin JM, Ye S, Rakers C, Kaneko K, Fukumoto K, Yamano M, et al. Methylation deficiency disrupts biological rhythms from bacteria to humans. Commun Biol 2020;3(1):295.
[39] Chishty M, Reichel A, Abbott NJ, Begley DJ. *S*-adenosylmethionine is substrate for carrier mediated transport at the blood–brain barrier *in vitro*. Brain Res 2002;942(1–2):46–50.
[40] Bottiglieri T, Godfrey P, Flynn T, Carney MW, Toone BK, Reynolds EH. Cerebrospinal fluid *S*-adenosylmethionine in depression and dementia: effects of treatment with parenteral and oral *S*-adenosylmethionine. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1990;53(12):1096–8.
[41] Peng TR, Cheng HY, Wu TW. *S*-Adenosylmethionine (SAMe) as an adjuvant therapy for patients with depression: an updated systematic review and meta-analysis. Gen Hosp Psychiatry 2024;86:118–26.
[42] Russo AL, Monaco M, Pani A, Fontanari D. Efficacy of *S*-adenosyl-*L*-methionine in relieving psychologic distress associated with detoxification in opiate abusers. Curr Ther Res Clin Exp 1994;55(8):905–13.
[43] Dello Russo C, Tringali G, Ragazzoni E, Maggiano N, Menini E, Vairano M, et al. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo–pituitary–adrenal axis function: *in vitro* and *in vivo* studies in the rat. J Neuroendocrinol 2000;12(3):225–33.
[44] Jacobsen JPR, Krystal AD, Krishnan KRR, Caron MG. Adjunctive 5-hydroxytryptophan slow-release for treatment–resistant depression: clinical and preclinical rationale. Trends Pharmacol Sci 2016;37(11):933–44.
[45] Sharma R, Gupta D, Mehrotra R, Mago P. Psychobiotics: the next-generation probiotics for the brain. Curr Microbiol 2021;78(2):449–63.
[46] Li J, Liu Y, Yuan L, Zhang B, Bishop ES, Wang K, et al. A tissue-like neurotransmitter sensor for the brain and gut. Nature 2022;606(7912):94–101.
[47] O'Donnell MP, Fox BW, Chao PH, Schroeder FC, Sengupta P. A neurotransmitter produced by gut bacteria modulates host sensory behaviour. Nature 2020;583(7816):415–20.
[48] Tian P, Hou Y, Wang Z, Jiang J, Qian X, Qu Z, et al. Probiotics administration alleviates cognitive impairment and circadian rhythm disturbance induced by sleep deprivation. Food Sci Hum Wellness 2024;13(4):1951–61.
[49] Xiao Y, Zhao J, Zhang H, Zhai Q, Chen W. Mining *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* for organisms with long-term gut colonization potential. Clin Nutr 2020;39(5):1315–23.
[50] Touitou Y, Reinberg A, Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: health impacts and mechanisms of circadian disruption. Life Sci 2017;173:94–106.
[51] Claustrat B, Brun J, Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev 2005;9(1):11–24.