

黄腐醇通过抑制脑内FKBP51发挥抗焦虑作用的研究



邵 奇¹, 张 静², 马善波², 张 鹏³, 种 晔⁴

1. 铜川市矿务局中心医院药剂科 (陕西铜川 727000)
2. 空军军医大学西京医院药剂科 (西安 710032)
3. 空军军医大学药学院药理学教研室 (西安 710032)
4. 西安交通大学第一附属医院超声科 (西安 710061)

【摘要】目的 探讨黄腐醇 (Xmo) 是否通过抑制脑内 FK506 结合蛋白 51 (FKBP51) 发挥抗焦虑作用。**方法** 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组 (Con)、模型组 (Saline)、Xmo 组 (5、10、20 mg/kg), 除 Con 组外, 其余各组小鼠经束缚应激模型诱导产生焦虑样行为后, 分别给予不同剂量 Xmo, Saline 组和 Con 组给与等体积生理盐水处理, 腹腔注射, 连续给药 7 d。采用旷场实验、高架十字迷宫实验检测小鼠焦虑样行为; Western Blot 检测小鼠海马脑源性神经营养因子 (BDNF) 的蛋白表达水平; 高尔基染色检测小鼠海马神经元树突棘密度; 另取 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠, 立体定向注射腺相关病毒 (AAV) 抑制 FKBP51 后评估对焦虑样行为的影响; 分子对接和动力学模拟分析 Xmo 与 FKBP51 结合亲和力及稳定性。**结果** Xmo 可显著改善束缚应激小鼠在旷场实验和高架十字迷宫实验中的焦虑样行为, 表现为增加小鼠在中央区域的运动时间和路程, 以及提高小鼠进入开臂的次数和时间。进一步研究表明, Xmo 可上调小鼠海马 BDNF 的蛋白表达水平, 并增加海马 CA1 区神经元树突棘的密度, 从而促进神经元可塑性。此外, 通过立体定向注射 AAV 抑制 FKBP51 的表达, Xmo 的抗焦虑作用依赖于 FKBP51。分子对接和动力学模拟结果显示, Xmo 与 FKBP51 蛋白具有较高的结合亲和力, 形成了稳定的复合物结构。**结论** Xmo 通过抑制 FKBP51, 促进 BDNF 的表达, 改善神经元可塑性, 从而发挥抗焦虑作用, 为开发新型抗焦虑药物提供了理论依据和潜在靶点。

【关键词】 黄腐醇; FK506 结合蛋白 51; 焦虑症; 脑源性神经营养因子; 腺相关病毒; 分子对接; 旷场实验; 高架十字迷宫

【中图分类号】 R964

【文献标识码】 A

Study on the antianxiety effect of xanthohumol by inhibiting FKBP51 in the brain

SHAO Qi¹, ZHANG Jing², MA Shanbo², ZHANG Kun³, CHONG Ye⁴

1. Department of Pharmacy, Central Hospital of Tongchuan Mining Bureau, Tongchuan 727000, Shaanxi Province, China
 2. Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China
 3. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China
 4. Department of Ultrasonic, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China
- Corresponding author: CHONG Ye, Email: chong_ye1992@163.com

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202505101

基金项目: 铜川市医学会科研课题项目 (202301a04)

通信作者: 种晔, Email: chong_ye1992@163.com

【Abstract】Objective To investigate whether xanthohumol exerts an antianxiety effect by inhibiting FKBP51 in the brain. **Methods** Forty male C57BL/6J mice were randomly divided into five groups, a control group (Con), a model group (Saline), and xanthohumol groups (5, 10, and 20 mg/kg). Except for the Con group, mice in the other groups were given different doses of xanthohumol after inducing anxiety-like behavior using a restraint stress model. The Saline group and Con group were treated with an equal volume of physiological saline via intraperitoneal injection, administered continuously for 7 days. The open-field test and elevated plus-maze test were used to detect anxiety-like behavior in the mice. Western Blot analysis was employed to measure brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein expression levels in the hippocampus of the mice. Golgi staining was used to assess dendritic spine density in mouse hippocampal neurons. Another forty male C57BL/6J mice were used to evaluate the effects on anxiety-like behavior following the stereotactic injection of an adeno-associated virus (AAV) designed to suppress FKBP51. Molecular docking and dynamics simulations were performed to analyze the binding affinity and stability of xanthohumol and FKBP51. **Results** Xanthohumol significantly improved the anxiety-like behavior of restraint-stressed mice in the open field test and elevated plus-maze test, as evidenced by increased exercise time and distance in the central area, as well as an increase in the number and duration of entries into the open arms. Further research showed that xanthohumol upregulated the protein expression level of BDNF in the hippocampus of mice and increased the density of dendritic spines in neurons in the hippocampal CA1 area, thereby promoting neuronal plasticity. Additionally, the expression of FKBP51 was inhibited by stereotactic injection of AAV, and it was found that the anti-anxiety effect of xanthohumol was dependent on the function of FKBP51. Molecular docking and dynamics simulation results indicated that xanthohumol and the FKBP51 protein had a high binding affinity, forming a stable complex structure. **Conclusion** Xanthohumol plays an anti-anxiety effect by inhibiting the FKBP51, promoting BDNF expression, and improving neuronal plasticity, providing a theoretical basis and potential targets for the development of new anti-anxiety drugs.

【Keywords】 Xanthohumol; FKBP51; Anxiety disorder; Brain-derived neurotrophic factor; Adeno-associated virus; Molecular docking; Open field test; Elevated plus-maze

焦虑症是世界范围内最普遍的精神疾病之一，给受其影响的个人和整个社会带来了沉重的负担^[1]。据世界卫生组织的数据显示，焦虑障碍影响全球约 2.8 亿人，预计到 2030 年将成为主要的疾病负担来源之一^[2]。目前临床中常用的抗焦虑药物，包括苯二氮卓类药物和选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂等，长期使用往往与药物依赖性、认知功能障碍以及运动功能障碍的风险增加相关^[3]。因此，寻找更安全有效的抗焦虑药物一直是研究的热点。FK506 结合蛋白 51 (FK506-binding protein 51, FKBP51) 是一种免疫亲和素，参与调节糖皮质激素受体的活性，其在焦虑等精神疾病的发生发展中扮演重要角色。研究表明，FKBP51 在谷氨酸能前脑神经元中的表达与早期生活应激暴露的交互作用对焦虑行为有显著影响，抑制 FKBP51 表达可以产生抗焦虑效应，这提示 FKBP51 可能是开发新型抗焦虑药物的潜在靶点^[4]。黄腐醇 (xanthohumol, Xmo) 是一种天然的戊烯基黄酮类化合物，来源于啤酒花 (*Humulus lupulus* L.) 植物，具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗

癌和神经保护等多种生物活性^[5]。研究表明，Xmo 可能对阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病以及焦虑、抑郁等神经精神疾病具有一定的治疗效果^[6-7]。然而，Xmo 治疗焦虑症的药效及其与 FKBP51 的关系尚需进一步研究。本研究旨在探讨 Xmo 是否通过抑制脑内 FKBP51 的表达和功能发挥抗焦虑作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

旷场装置 (上海吉量软件科技有限公司); 高架十字迷宫装置 (上海吉量软件科技有限公司); IX83 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 蛋白电泳系统 200 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 主要药品与试剂

Xmo (成都埃法生物科技有限公司, 批号: AFDF0558, 纯度 98%); 抗脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 抗体 (爱博泰克生物科技有限公司, 货号:

A4873)；腺相关病毒(AAV-FKBP51-shRNA, 靶序列: AGAAAGACAGAGGAGTATTAA, 和元生物)；BCA蛋白定量试剂盒(美国Thermo公司, 货号: P0914)；高尔基染色试剂盒(美国FDNeuroTechnologies公司, 货号: PK401)；BDVF一抗(货号: A16299)、 β -actin一抗(货号: AC026)和HRP标记的羊抗兔IgG(H+G)二抗(货号: AS014)均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 动物

80只健康的雄性C57BL/6J小鼠[周龄: 6~8周, 体重: (22 ± 2) g]购自空军军医大学动物中心[动物许可证编号: SYXK(陕)2024-003]。所有实验小鼠在实验开始前均经过1周的适应性饲养, 饲养环境为温度控制在 (25 ± 2) °C, 相对湿度保持在50%~70%之间的12 h光照/黑暗交替循环的环境中, 并给予自由饮水和进食。本动物实验方案通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准(伦理审批号: IACUC-20231259)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及模型建立

40只雄性C57BL/6J小鼠随机分为对照组(Con)、模型组(Saline)、Xmo组(5、10、20 mg/kg)。除Con组外, 均采用束缚应激模型(每日2 h, 连续束缚1周)诱导小鼠产生焦虑样行为。Xmo组分别以5、10、20 mg/(kg·d)的剂量通过腹腔注射途径给药, Saline组和Con组给予等体积生理盐水, 每日1次, 连续给药7 d后进行行为学测试。

1.4.2 旷场实验

旷场实验装置由一个内部尺寸为30 cm × 30 cm × 30 cm的正方体方盒构成。所有实验动物提前2 h适应测试环境, 以减少环境因素对实验结果的影响。在适应期结束后, 小鼠被放置于实验装置内, 允许其进行15 min的自由活动。在此过程中, 实验人员通过固定在方盒顶部的摄像设备记录小鼠的行为活动。在实验装置中, 中心区域定义为一个15 cm × 15 cm的正方形区域, 该区域占整个实验装置面积的四分之一。实验结束后, 研究人员利用运动轨迹追踪系统, 对小鼠在中心区域的停留时长以及移动路径进行分析。

1.4.3 高架十字迷宫实验

高架装置由两组开臂(25 cm × 8 cm × 0.5 cm)

和两组闭臂(25 cm × 8 cm × 12 cm)组成, 并配有一个中央平台(8 cm × 8 cm)。整个装置被提升至离地面50 cm的高度。实验前, 所有小鼠需在装置中适应环境2 h以消除外界干扰因素。测试时, 将小鼠置于中央平台, 使其面朝开启的臂部, 并允许其自由活动5 min。实验过程通过视频摄像系统全程记录, 随后利用视频跟踪系统对小鼠的行为进行分析, 包括进入各臂的次数以及在开臂中停留的时间等指标。

1.4.4 分子对接

在PubChem(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库检索Xmo的三维构象信息, 并利用Open Babel 2.3.2软件将其转换为pdbqt格式文件以便后续计算。随后, 从PDB(<http://www.rcsb.org/>)数据库中获取FKBP51靶蛋白的晶体结构数据, 借助PyMOL 2.4.0软件完成配体提取及结晶水分子等杂质的去除工作, 以获得高质量的受体结构。在此基础上, 使用AutoDock 1.5.6软件对配体进行必要的预处理操作, 包括去除水分子、加氢和电荷计算。经过充分的预处理后, 采用AutoDock软件进行分子对接计算, 在此过程中需合理设置对接盒子的尺寸、位置等关键参数。最后, 借助PyMOL软件对接结果进行可视化分析, 以直观地观察配体与受体之间的相互作用模式。

1.4.5 分子动力学模拟

采用Groningen Machine for Chemicals Simulations(CHARM)2020软件对Xmo与FKBP51的蛋白质配体复合物进行分子动力学模拟。在模拟体系构建过程中, 选择了Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics(CHARM)36力场用于蛋白质, Generalized Amber Force Field 2(GAFF2)力场用于配体, 并采用TIP3P水模型构建周期性边界为1.2 nm的水盒子。随后添加Na⁺和Cl⁻以实现电中性, 最大程度地模拟真实实验环境。在进行正式的动力学模拟之前, 首先通过共轭梯度方法对复合物进行了50 000步的能量最小化, 以消除初始结构中的重叠和不合理的构象。随后分别在网络虚拟终端(network virtual terminal, NVT, 等温, 310 K)和非分组式终端(non-packet terminal, NPT, 等压, 1 atm)系综下进行100 ps的平衡模拟, 确保体系达到稳定状态。最终的生产模拟在常温常压下持续运行100 ns, 以获取足够的统计样本用于后续分析。

1.4.6 高尔基染色

取各组小鼠脑组织后, 首先将其浸泡在高尔基固定液中, 于室温下静置 12 d, 期间每 2 d 更换一次固定液。固定完成后, 脑组织先用流动水漂洗 5 min, 随后依次使用 70%、96% 和 100% 乙醇进行梯度脱水, 每次处理过夜, 最后将组织置于乙醇和乙醚的混合液中过夜。脱水完成后, 组织用去离子水洗涤, 随后采用振动切片机制备厚度为 100 μm 的脑组织切片, 并确保切片包含海马区。切片依次经过去离子水漂洗 (5 min)、16% 氨水浸泡 (30 min)、去离子水漂洗 (2 min) 以及 1% 硫代硫酸钠处理 (7 min)。之后, 切片再次用去离子水漂洗 10 min, 经过乙醇梯度脱水, 并使用二甲苯溶液透明 30 s。最后, 切片用中性树胶封片, 并通过正置显微镜采集图像。数据分析时, 利用 Image J 6.0 软件对第二或第三级树突上的树突棘数量进行定量分析。

1.4.7 Western Blot

取小鼠脑组织后, 于冰盒上迅速分离海马组织并收集至含冰盒的 EP 管中。随后向海马组织中加入预先配制的 RIPA 裂解液, 其中含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂以确保蛋白质的完整性。采用超声波细胞粉碎机进行充分裂解后, 通过离心 (4℃、12 000 $\times g$ 、30 min) 收集上清液, 并利用 BCA 试剂盒进行蛋白质浓度测定。将等量蛋白样本分别加入 5% 浓缩胶和 12% 分离胶进行 SDS-PAGE 电泳分离。电泳完成后, 使用湿法电泳转膜技术, 将目标蛋白转移至 PVDF 膜上。随后以 10% 脱脂奶粉封闭膜表面 2 h, 再依次加入特异性一抗 (稀释比例为 1:500), 在 4℃ 条件下孵育过夜。次日恢复室温孵育 1 h 后, 用 PBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min。最后加入 HRP 标记的二抗 (稀释比例为 1:8 000), 在室温下孵育 1.5 h。利用增强化学发光检测系统对 PVDF 膜进行显影, 并通过 Image J 软件对靶蛋白的表达水平进行定量分析。

1.4.8 立体定向注射腺相关病毒

另取 40 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 Con 组 (mCherry+saline)、Saline 组 (Restraint+mCherry+saline)、Xmo 组 (Restraint+mCherry+Xmo)、Restraint+FKBP51-shRNA+saline、Restraint+FKBP51-shRNA+Xmo), 共 5 组。脑立体定位病毒注射实验方法如下^[8]: 小鼠在无菌条件下使用 40 mg/kg 戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉后, 采用

脑定位仪固定其头部。随后剃除头顶毛发, 并用酒精消毒处理皮肤。在无菌条件下, 暴露前卤, 使用微量注射器将病毒液 (AAV-FKBP51-shRNA) 安装在微操仪上, 将针头定位至海马 CA1 区 (坐标为 AP: -1.46mm, ML: ± 1 mm, DV: -2 mm)。利用注射泵以 200 nL/min 的速度每侧注射 1 μL 病毒液, Con 组则注射相应病毒对照或空载。每次注射完成后, 在留针情况下等待 10 min, 确保病毒充分弥散。注射完成后, 小心缝合皮肤, 确保伤口完全闭合。术后 21 d, 通过行为学实验评估小鼠的焦虑样行为。

1.5 统计学分析

本实验所有结果均以形式 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计分析采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行。采用单因素方差分析进行统计学检验, 随后结合 Tukey 检验进行多组间的事后比较分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Xmo 可显著增加焦虑小鼠在中心区域的行进路程和运动时间

旷场实验结果显示, 各组小鼠在实验期间的总运动距离未见显著差异, 表明 Xmo 并未影响小鼠的基本运动能力 (图 1A 和 1B)。此外, 与 Con 组相比 (图 1C 和 1D), 束缚应激小鼠在中央区域的运动路程和运动时间均显著减少 ($P < 0.05$), 表明束缚应激成功诱导了焦虑样行为。进一步分析显示, Xmo 低剂量组未能显著改善小鼠的焦虑样行为, 而中、高剂量组小鼠的中央区域运动路程和运动时间均显著增加 ($P < 0.05$)。这些结果表明, Xmo 具有显著的抗焦虑作用, 且其效果呈现剂量依赖性, 高剂量组的改善作用更为显著。

2.2 Xmo 可明显提高焦虑小鼠进入开臂的次数和时间

高架十字迷宫实验结果显示, 各组小鼠在实验期间的总进臂次数未见显著差异 (图 2A 和 2B), 表明 Xmo 处理并未影响小鼠的正常活动能力。与 Con 组相比, 束缚应激处理使小鼠在开臂中的进入次数和开臂停留时间的百分比显著降低 ($P < 0.05$), 表明束缚急性应激诱导的小鼠焦虑样行为 (图 2C 和 2D)。进一步比较发现, 在束缚应激模型基础上, 低剂量 Xmo 组小鼠的开臂进入次数和时间百分比与应

激组无显著差异；而中、高剂量 Xmo 处理则明显提高了小鼠开臂的进入次数和时间的百分比 ($P<0.05$)。实验结果表明, Xmo 能有效改善束缚应激诱导的小鼠焦虑样行为, 且呈现剂量依赖性效应。

2.3 Xmo上调焦虑小鼠海马中BDNF蛋白表达和增加树突棘密度

实验结果显示 (图 3A), 相比 Con 组, 束缚

Saline 组小鼠海马中 BDNF 蛋白表达水平显著减少 ($P<0.05$) ; 而相比束缚 Saline 组, Xmo (20 mg/kg) 处理后, 小鼠海马中 BDNF 蛋白表达水平显著增加 ($P<0.05$)。进一步通过高尔基染色观察 (图 3B) 发现, 相比 Con 组, 束缚 Saline 组小鼠海马神经元树突棘密度著减少 ($P<0.05$) ; 然而在 Xmo (20 mg/kg) 处理后, 神经元树突棘密度显著增加 ($P<0.05$)。

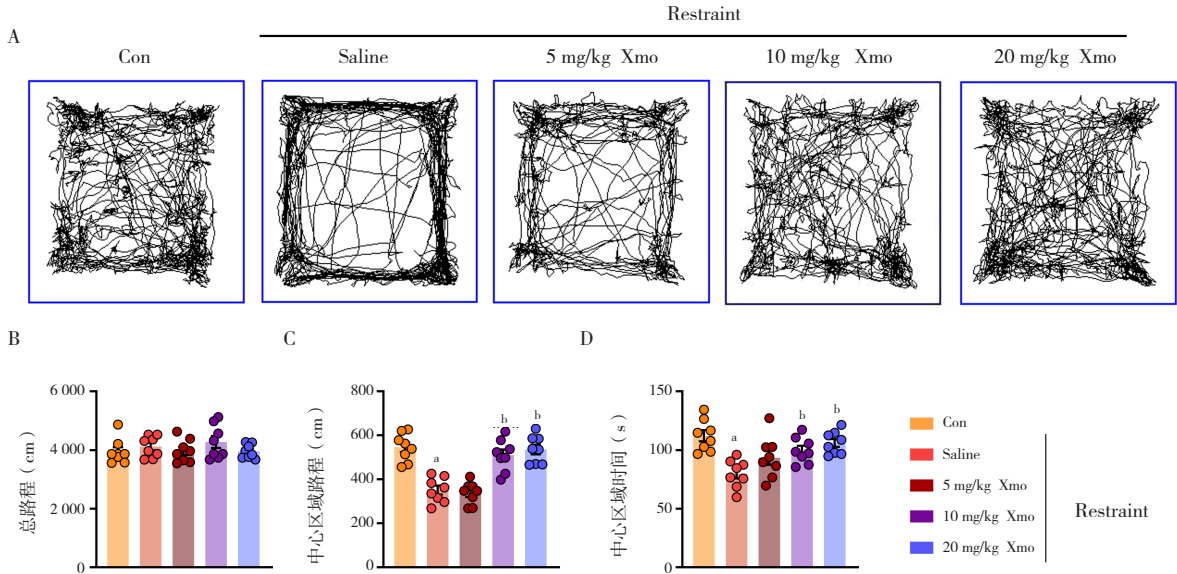


图1 Xmo对焦虑小鼠在中央的运动时间和路程的影响 (n=8)

Figure 1. The effect of Xmo on the exercise time and distance in the center of anxiety mice (n=8)

注: A. 小鼠在旷场实验中的运动轨迹示意图; B. 小鼠运动的总路程; C. 中心区域运动的路程; D. 中心区域运动时间; 与Con组比较, $^aP<0.05$; 与Saline组比较, $^bP<0.05$ 。

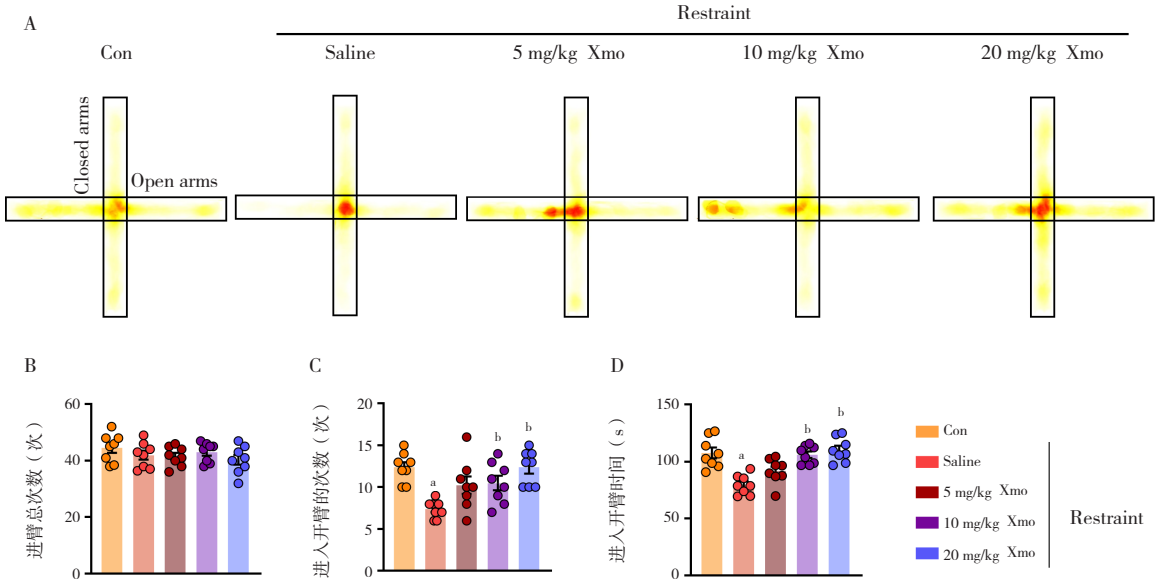


图2 Xmo对焦虑小鼠进入开臂的次数和时间的的影响 (n=8)

Figure 2. The effect of Xmo on the times and time of entering the open arms of anxious mice (n=8)

注: A. 小鼠在高架十字迷宫实验中的运动轨迹示意图; B. 小鼠进臂总次数; C. 小鼠进入开臂的次数; D. 小鼠进入开臂的时间; 与Con组比较, $^aP<0.05$; 与Saline组比较, $^bP<0.05$ 。

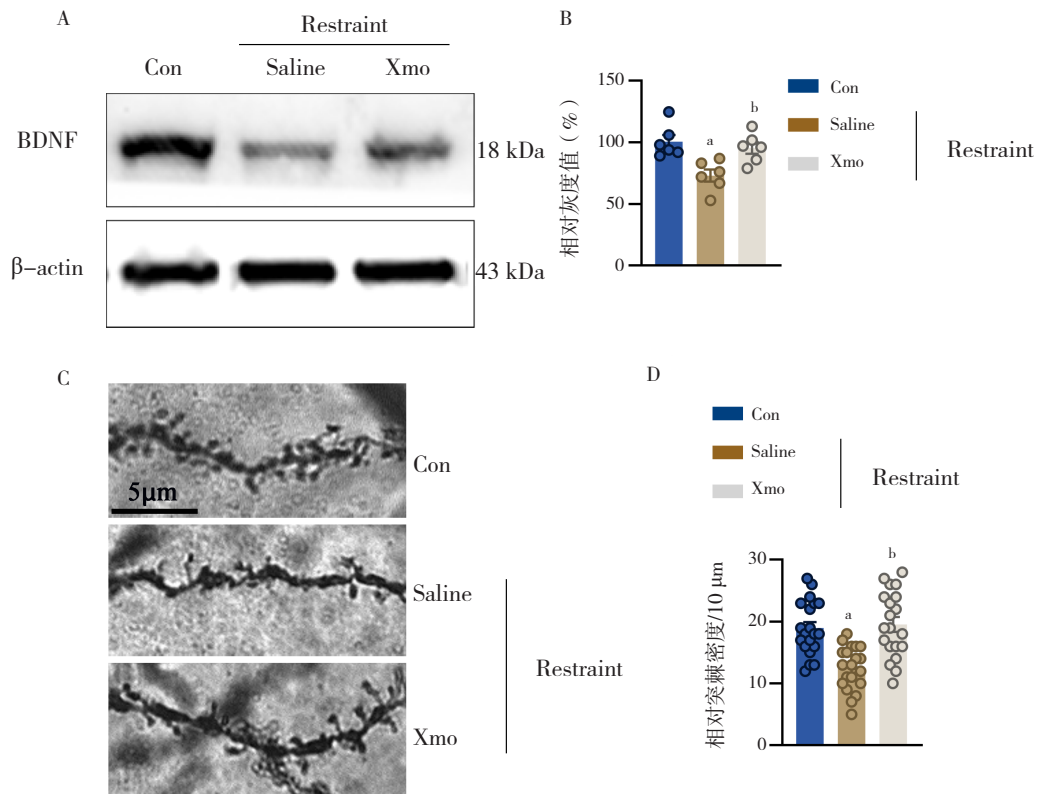


图3 Xmo对焦虑小鼠海马BDNF的表达和树突棘密度的影响 (n=8)

Figure 3. The effect of Xmo on the expression of BDNF and density of dendritic spines in hippocampus of anxiety mice (n=8)

注: A. 小鼠海马组织中BDNF蛋白表达水平; B. BDNF的蛋白条带灰度值分析; C. 高尔基染色观察小鼠海马树突棘密度; D. 小鼠海马树突棘密度的量化值分析; 与Con组比较, ^a $P<0.05$; 与Saline组比较, ^b $P<0.05$ 。

2.4 Xmo通过FKBP51依赖性途径发挥抗焦虑作用

通过立体定位注射携带 FKBP51-shRNA 的重组腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV), 以抑制 FKBP51 的表达。如图 4 所示, 构建的 AAV 携带 mCherry 报告基因, 转染区域可检测到红色荧光, 通过荧光显微镜验证了 AAV 注射脑区的位置准确性。随后, 采用旷场实验和高架十字迷宫实验, 以探究 FKBP51 在 Xmo 抗焦虑作用中的具体功能。高架十字迷宫实验结果表明, 当 FKBP51 表达被抑制后, 给予 Xmo 干预的小鼠进入开臂的次数和时间与 Saline 组相比未见显著差异 (图 5)。旷场实验结果显示, 在 FKBP51 表达受抑制的情况下, 给予 Xmo 干预的小鼠在中心区域的行进路程和运动时间也与 Saline 组相当 (图 5)。这些结果表明, Xmo 的抗焦虑作用依赖于 FKBP51 的功能。

2.5 Xmo与FKBP51分子对接

研究表明, Xmo 与 FKBP51 蛋白的分子对接结合能为 -7.2 kcal/mol 。这一数值显著低于通常认为具有良好结合亲和力的 -5.0 kcal/mol 阈值,

更低于代表强结合力的 -7.0 kcal/mol 标准^[9]。进一步的可视化分析揭示, Xmo 与 FKBP51 蛋白中的 GLU110 和 SER27 两个关键残基形成了稳定的氢键 (图 6)。上述结果表明, Xmo 与 FKBP51 之间存在较高的结合亲和力, 这为后续的实验研究和分子动力学模拟提供了理论依据。

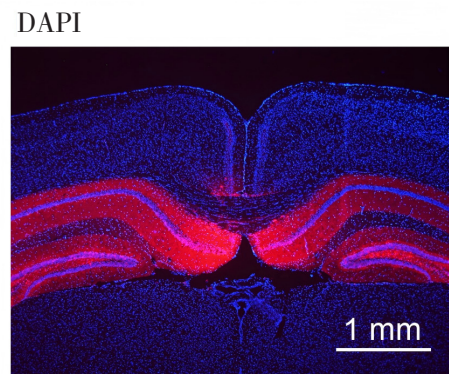


图4 FKBP51-shRNA-mCherry感染的mPFC脑区的代表性图像

Figure 4. Representative images of mPFC brain regions infected with fkbp51 shRNA mCherry

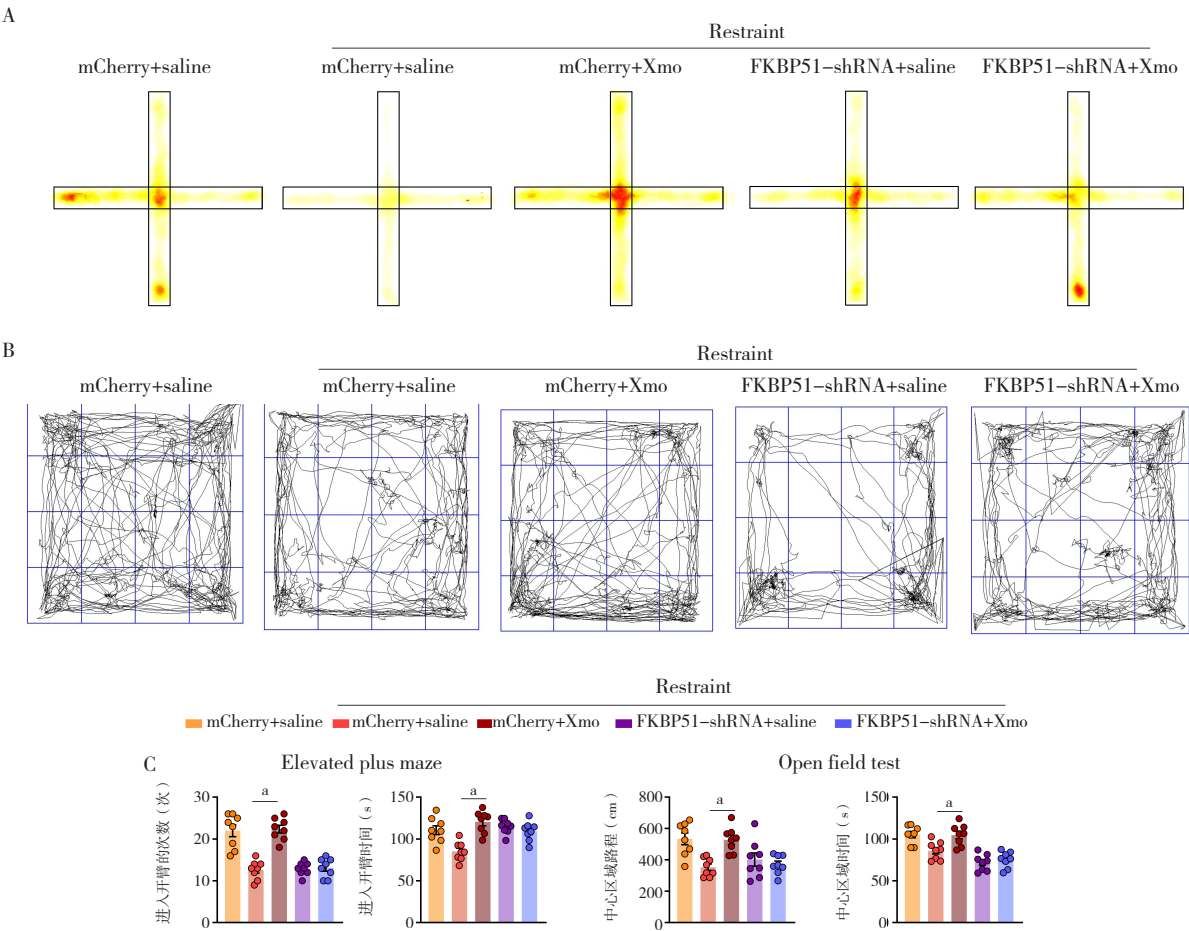


图5 Xmo通过FKBP51依赖性途径发挥抗焦虑作用 ($n=8$)

Figure 5. Xmo exerts anti anxiety effect through FKBP51 dependent pathway ($n=8$)

注：A. 小鼠在高架十字迷宫实验中的运动轨迹示意图；B. 小鼠在旷场实验中的运动轨迹示意图；C. 高架十字迷宫实验不同组别小鼠进入开臂的次数和时间以及以旷场实验不同组别小鼠在中心区域的行进路程和运动时间；与Saline组比较， $^*P<0.05$ 。

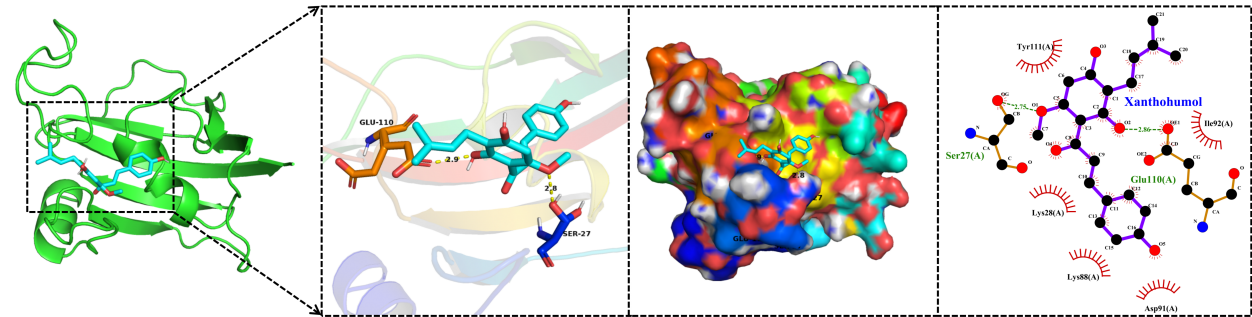


图6 Xmo与FKBP51的分子对接结果

Figure 6. Molecular docking results of Xmo and FKBP51

2.6 Xmo与FKBP51动力学模拟

通过对 Xmo–FKBP51 复合物的动力学模拟，分析了复合物在模拟过程中的均方根偏差（root mean square deviation, RMSD）、均方根波动（root mean square fluctuation, RMSF）、回转半径（radius of gyration, Rg）和溶剂可及表面积（solvent accessible surface area, SASA）。RMSD结果表

明，RMSD 曲线在模拟初期迅速趋于平稳，随后在一定范围内（0.2~0.4 nm）波动，未出现显著偏离（图 7A）。表明 Xmo 与 FKBP51 的结合状态在模拟过程中是稳定且可靠的，复合物的整体结构在模拟时间内未发生显著的构象变化，形成了稳定的复合物构象。进一步分析 Xmo–FKBP51 复合物中 FKBP51 蛋白各残基的 RMSF。结果显

示, FKBP51 蛋白在结合位点附近的残基波动较小 (0.1~0.5 nm), 表明这些区域的构象较为稳定, 可能是由于 Xmo 与 FKBP51 之间较强的相互作用 (如氢键和疏水相互作用) 限制了这些区域的运动性 (图 7B)。Rg 的变化反映了 Xmo-FKBP51 复合物体系整体构象的动态变化及其稳定性特征。结果显示, Xmo-FKBP51 复合物体系的 Rg 值在模拟过程中维持在较低水平, 且变化

幅度较小 (1.35~1.45 nm), 并趋于稳定, 表明体系在模拟过程中逐渐形成了相对稳定的结构形态 (图 7C)。此外, SASA 分析结果表明, Xmo 与 FKBP51 结合后, SASA 值在模拟过程中明显减小, 说明 Xmo 的结合使该区域的溶剂暴露程度降低, 可能增强了结合位点的疏水相互作用或减少了溶剂对结合位点的干扰, 从而提高了复合物的稳定性 (图 7D)。

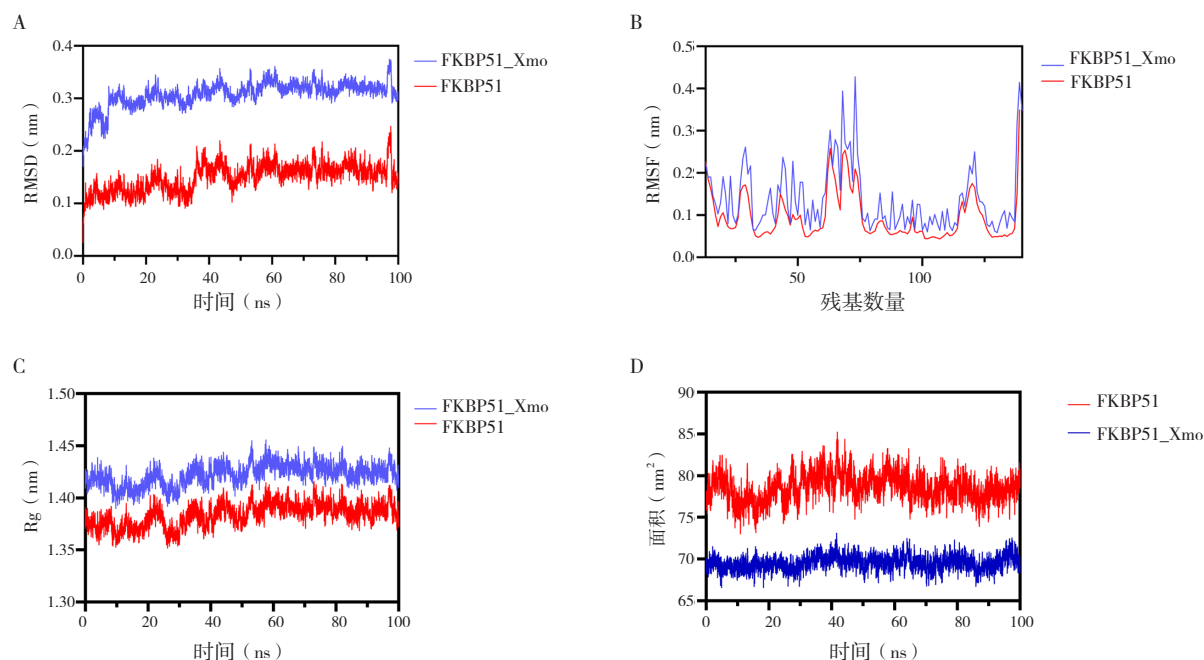


图7 Xmo与FKBP51的动力学模拟结果

Figure 7. Dynamics simulation results of Xmo and FKBP51

注: A. RMSD; B. RMSF; C. Rg; D. SASA。

3 讨论

焦虑症是一种全球范围内广泛存在的精神疾病, 其患病率约为 3.6%, 已成为重要的公共卫生问题^[10]。该病主要表现为持续的过度担忧、情绪紧张以及对日常生活场景的回避行为, 这些症状严重损害了患者的社会功能和生活质量^[11]。啤酒花 (*Humulus lupulus* L.), 又称蛇麻草或酵母花, 是一种具有重要药食两用价值的多年生须根缠绕草本植物。在中医药传统应用中, 啤酒花的未成熟带花果穗被用作药材, 其性味苦、微凉, 归肝、胃经, 具有健胃消食、利尿安神的功效, 临床上可用于治疗消化不良、腹胀、神经衰弱及失眠等症状^[12-13]。Xmo 是啤酒花中含量最高的天然酚类化合物, 近年来因其显著的药理活性受到广泛关注。本团队前期研究发现, Xmo 可通过激活蛋白激酶 B/核因子 κ B (protein kinase B/nuclear

factor κ B, AKT/NF- κ B) 信号通路, 降低海马组织的氧化应激水平, 增加树突密度, 从而对糖尿病脑病发挥神经保护作用^[14]。虽然已有研究提示 Xmo 具有抗焦虑活性, 但其作用机制仍需进一步阐明。本研究成功构建了束缚应激诱导的焦虑小鼠模型, 并通过系统的行为学实验发现 Xmo 对其焦虑样行为具有显著的改善作用; 通过立体定位注射 AAV 特异性抑制 FKBP51 表达后, Xmo 的抗焦虑效应完全消失, 这表明 FKBP51 在 Xmo 的抗焦虑作用中发挥关键作用。此外, Xmo 能够上调焦虑小鼠海马组织中 BDNF 蛋白的表达水平, 并显著增加海马神经元的树突棘的密度, 提示 Xmo 可能通过促进神经可塑性发挥抗焦虑作用。分子对接实验结果表明 Xmo 与 FKBP51 具有较高的结合亲和力, 而分子动力学模拟进一步证实了两者结合的稳定性和持续性, 为 Xmo 的作用机制提供了分子层面的证据支持。

BDNF 是由神经元和胶质细胞分泌的一种关键蛋白质,在神经元的生长、分化、存活和可塑性中发挥重要作用。BDNF 通过与其特异性受体酪氨酸激酶受体 (tyrosine protein kinase B, TrkB) 结合,激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3- 激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /AKT、磷脂酶 C- γ (phospholipase C- γ , PLC γ) 等下游信号通路,进而调控神经元的存活、生长及突触可塑性^[15]。大量研究显示,焦虑障碍患者的外周血和脑脊液中 BDNF 水平显著低于健康对照组,如强迫症患者的血清 BDNF 水平明显降低,且 BDNF 水平与强迫症状严重程度呈负相关^[16]。BDNF 在调节大脑对应激反应中具有重要作用:应激不仅会显著降低海马和血清中的 BDNF 表达,且 BDNF 水平的降低又会加剧应激反应,导致海马结构损伤,从而增加个体的焦虑易感性。在杏仁核、前额叶皮层和海马等与焦虑行为调控密切相关的脑区,BDNF 及其受体的表达量较高。焦虑动物模型研究表明,海马区 BDNF 表达的下调会导致海马-杏仁核-前额叶皮质环路功能异常,最终引发焦虑样行为^[17]。本研究发现,Xmo 可显著上调焦虑小鼠海马中 BDNF 的蛋白表达水平,并增加海马 CA1 区神经元棘突的数量,这表明 Xmo 可能通过增强 BDNF 表达来改善焦虑相关行为。

FKBP51 是由 FKBP5 基因编码的多功能蛋白质,广泛分布于细胞质和细胞核中,在分子伴侣功能、信号转导及激素受体调节中发挥关键作用^[18]。该蛋白通过免疫抑制结合基序与多种蛋白质相互作用,其中与生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor bound protein 2, Grb2) 的相互作用尤为重要。作为 BDNF/TrkB 受体下游的关键信号分子,Grb2-FKBP51 复合物能够调控 MAPK 等信号通路的活性,从而影响细胞功能的多个方面^[19]。在焦虑相关病理过程中,FKBP51 通过调节神经元的可塑性和应激反应发挥重要作用^[18]。特别是在应激状态下,FKBP51 与 BDNF 协同作用,调控海马、杏仁核和前额叶皮层等关键脑区的功能。这些脑区的 FKBP51 和 BDNF 表达水平及其相互作用在应激反应和情绪调节中具有重要作用^[20]。本研究结果表明,不同剂量的 Xmo 干预能够显著减轻焦虑动物模型的焦虑样行为。需要注意的是,当通过基因抑制技术抑制

FKBP51 的表达后,Xmo 并不能进一步增强抗焦虑作用。进一步研究表明,Xmo 能够上调焦虑模型小鼠海马中 BDNF 蛋白的表达水平,并显著增加神经元树突棘密度,这表明其对神经可塑性的促进作用。分子对接和动力学模拟的数据显示,Xmo 与 FKBP51 蛋白具有较高的结合亲和力,并能形成稳定的复合物结构。这些发现为 Xmo 通过调控 FKBP51-BDNF 信号轴发挥抗焦虑作用提供了理论基础和实验依据。

综上,Xmo 通过抑制脑内 FKBP51 蛋白的表达发挥显著抗焦虑作用,这一发现不仅为 Xmo 作为新型抗焦虑药物的临床开发提供了参考,同时也为焦虑症的治疗策略提供了全新的研究思路。然而,未来的研究仍需进一步探索 Xmo 在不同焦虑症动物模型中的治疗效果及其作用机制,并评估其与其他抗焦虑药物的联合用药效果。

参考文献

- 1 Ren L, Fan Y, Wu W, et al. Anxiety disorders: treatments, models, and circuitry mechanisms[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 983: 176994. DOI: [10.1016/j.ejphar.2024.176994](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176994).
- 2 Liu X, Liu H, Wu X, et al. Xiaoyaosan against depression through suppressing LPS mediated TLR4/NLRP3 signaling pathway in "microbiota-gut-brain" axis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 335: 118683. DOI: [10.1016/j.jep.2024.118683](https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118683).
- 3 Ahmad A, Khan S, Ali S, et al. Network pharmacology combined with molecular docking and experimental verification to elucidate the effect of flavan-3-ols and aromatic resin on anxiety[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 9799. DOI: [10.1038/s41598-024-58877-z](https://doi.org/10.1038/s41598-024-58877-z).
- 4 Doeselaar L, Abromeit A, Stark T, et al. FKBP51 in glutamatergic forebrain neurons promotes early life stress inoculation in female mice[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1): 2529. DOI: [10.1038/s41467-025-57952-x](https://doi.org/10.1038/s41467-025-57952-x).
- 5 Gao W, Chen P, Hsu H, et al. Xanthohumol, a prenylated chalcone, regulates lipid metabolism by modulating the LXR/RXR-ANGPTL3-LPL axis in hepatic cell lines and high-fat diet-fed zebrafish models[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116598. DOI: [10.1016/j.biopha.2024.116598](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116598).
- 6 Carbone K, Gervasi F. An updated review of the genus humulus: a valuable source of bioactive compounds for health and disease prevention[J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(24): 3434. DOI: [10.3390/plants11243434](https://doi.org/10.3390/plants11243434).
- 7 Dlugosz A, Blaszk B, Czarnecki D, et al. Mechanism of action and therapeutic potential of xanthohumol in prevention of selected neurodegenerative diseases[J]. *Molecules*, 2025, 30(3): 694. DOI: [10.3390/molecules30030694](https://doi.org/10.3390/molecules30030694).

- 8 Ma S, Chong Y, Zhang R, et al. Glycyrrhizic acid treatment ameliorates anxiety-like behaviour via GLT1 and Per1/2-dependent pathways[J]. *J Ethnopharmacol* 2024, 328: 118013. DOI: [10.1016/j.jep.2024.118013](https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118013).
- 9 Ma S, Guo X, Han R, et al. Elucidation of the mechanism of action of ailanthone in the treatment of colorectal cancer: integration of network pharmacology, bioinformatics analysis and experimental validation[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1355644. DOI: [10.3389/fphar.2024.1355644](https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1355644).
- 10 Babter A, Scottt K, Vos T, et al. Global prevalence of anxiety disorders: a systematic review and meta-regression[J]. *Psychol Med*, 43(5): 897–910. DOI: [10.1017/S003329171200147X](https://doi.org/10.1017/S003329171200147X).
- 11 边明真, 谭涛, 李华南, 等. 基于中西医临床病证特点的广泛性焦虑症动物模型分析[J]. *天津中医药*, 2024, 41(9): 1214–1220. [Bian MZ, Tan T, Li HN, et al. Analysis of animal model of generalized anxiety disorder based on clinical characteristics of TCM and western medicine[J]. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2024, 41(9): 1214–1220.] DOI: [10.11656/j.jissn.1672-1519.2024.09.23](https://doi.org/10.11656/j.jissn.1672-1519.2024.09.23).
- 12 李雪, 李爽, 武盈吉, 等. 啤酒花的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2019, 40(2): 143–145. [Li X, Li S, Wu YJ, et al. Research progress of *Humulus lupulus*[J]. *Journal of Jilin Medical University*, 2019, 40(2): 143–145.] DOI: [10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2019.02.025](https://doi.org/10.13845/j.cnki.issn1673-2995.2019.02.025).
- 13 林柳悦, 蒋益萍, 张巧艳, 等. 啤酒花化学成分和药理活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(10): 1830–1836. [Lin LY, Jiang YP, Zhang QY, et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological activities in *Humulus lupulus*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(10): 1830–1836.] DOI: [10.19540/j.cnki.cjcm.20170224.019](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20170224.019).
- 14 Ma S, Zhang R, Li L, et al. Xanthohumol protect cognitive performance in diabetic model rats by inhibiting protein kinase B/nuclear factor kappa-B pathway[J]. *Neuroreport*, 2025, 32(8): 651–658. DOI: [10.1097/WNR.0000000000001595](https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001595).
- 15 Bathina S, Das U. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications[J]. *Arch Med Sci*, 2015, 11(6): 1164–1178. DOI: [10.5114/aoms.2015.56342](https://doi.org/10.5114/aoms.2015.56342).
- 16 李晓雷, 王秋妍, 刘洋, 等. 头针联合通督治郁针法对脑卒中后抑郁(痰瘀互结证)患者抑郁症状及血清脑源性神经营养因子、神经生长因子水平的影响[J]. *海南医学*, 2025, 36(6): 794–799. [Li XL, Wang QY, Liu Y, et al. Effects of scalp acupuncture combined with Tongdu Zhiyu acupuncture on depressive symptoms and serum BDNF and NGF levels in patients of post-stroke depression with phlegm-stasis mutual aggregation syndrome[J]. *Hainan Medical Journal*, 2025, 36(6): 794–799.] DOI: [10.3969/j.issn.1003-6350.2025.06.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-6350.2025.06.007).
- 17 王晓歌, 鲍金宇, 杨帅, 等. 跑台运动上调 BDNF/TrkB-CREB 通路改善神经性疼痛模型大鼠焦虑样行为[J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(9): 1149–1159. [Wang XG, Bao JY, Yang S, et al. Treadmill exercise up-regulates BDNF/TrkB-CREB pathway to improve anxiety-like behavior in neuropathic pain rats[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2024, 32(9): 1149–1159.] DOI: [10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-4847.2024.09.006).
- 18 Kovarova V, Bordes J, Mitra S, et al. Deep phenotyping reveals CRH and FKBP51-dependent behavioral profiles following chronic social stress exposure in male mice[J]. *Neuropsychopharmacology*, 2025, 50(3): 556–567. DOI: [10.1038/s41386-024-02008-9](https://doi.org/10.1038/s41386-024-02008-9).
- 19 Jin W. Regulation of BDNF-TrkB signaling and potential therapeutic strategies for parkinson's disease[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(1): 257. DOI: [10.3390/jcm9010257](https://doi.org/10.3390/jcm9010257).
- 20 Anderzhanova E, Hafner K, Genewsky A, et al. The stress susceptibility factor FKBP51 controls S-ketamine-evoked release of mBDNF in the prefrontal cortex of mice[J]. *Neurobiol Stress*, 2020, 13: 100239. DOI: [10.1016/j.ynstr.2020.100239](https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2020.100239).

收稿日期: 2025 年 05 月 30 日 修回日期: 2025 年 08 月 27 日
本文编辑: 李 阳 钟巧妮