



中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856, CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目: EGCG 调节小脑浦肯野细胞兴奋性改善 VPA 诱导小鼠行为缺陷
作者: 张明龙, 刘适, 张春晶, 姜莹莹, 邢梦凡, 池涛, 初而复, 杨贺旻
收稿日期: 2026-01-04
网络首发日期: 2026-07-01
引用格式: 张明龙, 刘适, 张春晶, 姜莹莹, 邢梦凡, 池涛, 初而复, 杨贺旻. EGCG 调节小脑浦肯野细胞兴奋性改善 VPA 诱导小鼠行为缺陷[J/OL]. 中国比较医学杂志. <https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260701.1627.010>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

EGCG 调节小脑浦肯野细胞兴奋性改善 VPA 诱导小鼠行为缺陷

张明龙¹, 刘 适², 张春晶³, 姜莹莹⁴, 邢梦凡², 池 涛², 初而复⁵,

杨贺旻²✉

(1. 齐齐哈尔医学院遗传学教研室, 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔医学院附属第三医院中心实验室, 齐齐哈尔 161006; 3. 齐齐哈尔医学院生物化学教研室, 齐齐哈尔 161006; 4. 齐齐哈尔市中医医院产科, 齐齐哈尔 161006; 5. 齐齐哈尔医学院附属第三医院心血管内科, 齐齐哈尔 161006)

✉通信作者 杨贺旻(1994—), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 神经生理学。E-mail: 18243393252@163.com

摘要 目的 旨在探究腹腔注射表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对丙戊酸钠(VPA)诱导孤独症(ASD)小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性和抑制性突触活性的改变及其对小鼠孤独症样刻板行为、运动协调与平衡障碍的干预效果。方法 构建 VPA 诱导 ASD 小鼠模型, 分别腹腔注射 25 mg/kg 和 50 mg/kg EGCG, 通过行为学方法(埋球实验、自我梳理实验、加速转棒实验、平衡木实验)观察正常对照(CON)组、VPA 组、VPA+25 mg/kg EGCG 组和 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠在重复刻板行为、运动协调与平衡障碍的差异;通过电生理记录观察 CON 组、VPA 组、VPA+25 mg/kg EGCG 组和 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性和抑制性突触活性的改变。结果 埋球实验和自我梳理实验中 50 mg/kg EGCG 干预可显著减轻 VPA 诱导 ASD 小鼠重复刻板行为;加速转棒实验和平衡木实验中 50 mg/kg EGCG 干预可显著改善 VPA 诱导 ASD 小鼠运动协调和平衡能力;全细胞膜片钳模式记录浦肯野细胞电生理变化, 通过 50 mg/kg EGCG 干预可明显改善 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性降低和抑制性突触活性降低。结论 EGCG 能够剂量依赖性调节 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性和抑制性突触活性的改变, 从而改善 VPA 诱导 ASD 小鼠孤独症样刻板行为、运动协调与平衡障碍。

关键词 孤独症谱系障碍;表没食子儿茶素没食子酸酯;小脑;浦肯野细胞;行为学

中图分类号 R749; R-332; R965

文献标志码 A

EGCG modulates cerebellar Purkinje cell excitability to ameliorate VPA-induced behavioral deficits in mice

ZHANG Minglong¹, LIU Shi², ZHANG Chunjing³, JIANG Yingying⁴, XING Mengfan², CHI Tao²,

CHU Erfu⁵, YANG Hemin²✉

(1. Qiqihar Medical University, Department of Genetics, Qiqihar 161006, China; 2. the Third Affiliate Hospital of Qiqihar Medical University, Central Laboratory, Qiqihar 161006; 3. Qiqihar Medical University, Department of Biochemistry, Qiqihar 161006; 4. Qiqihar City Traditional Chinese Medicine Hospital, Obstetrics Department, Qiqihar 161006; 5. the Third Affiliate Hospital of Qiqihar Medical University, Cardiovascular Medicine Department, Qiqihar 161006)

Abstract Objective To investigate the effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) administration on cerebellar Purkinje cell excitability and inhibitory synaptic activity in valproic acid (VPA)-induced autism spectrum disorder (ASD) mice, as well as its effects on autism-like stereotyped behaviors and motor coordination/balance deficits. Methods A VPA-induced ASD mouse model was established via intraperitoneal injections of EGCG (25 mg/kg and 50 mg/kg). Behavioral tests, including marble burying, self-grooming, accelerating rotarod, and balance beam tests, were used to assess repetitive stereotyped

收稿日期: 2026-01-04

基金项目: 2022 年度黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2022-KYYWF-0795)。

作者简介: 张明龙(1988—), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 神经毒理学。E-mail: jylinyao@163.com

网络首发时间: 2026-07-01 17:32:41 网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/11.4822.R.20260701.1627.010>

behaviors and motor coordination/balance among four groups: normal control, VPA, VPA+25 mg/kg EGCG, and VPA+50 mg/kg EGCG. Electrophysiological recordings were used to investigate alterations in both excitatory and inhibitory synaptic activity of cerebellar Purkinje cells across these groups. Results In the marble burying and self-grooming tests, 50 mg/kg EGCG significantly alleviated repetitive stereotyped behaviors in VPA-induced ASD mice. In the accelerated rotarod and balance beam tests, 50 mg/kg EGCG markedly improved motor coordination and balance abilities in VPA-induced ASD mice. Whole-cell patch-clamp recordings demonstrated that 50 mg/kg EGCG effectively ameliorated VPA-induced reductions in both cerebellar Purkinje cell excitability and inhibitory synaptic activity. Conclusions EGCG dose-dependently modulated the altered excitability and inhibitory synaptic activity of cerebellar Purkinje cells, thereby ameliorating autism-like stereotyped behaviors and motor coordination and balance impairments in VPA-induced ASD mice.

Key words Autism spectrum disorder; Epigallocatechin gallate; Cerebellum; Purkinje cells; Behavioral tests

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种高度异质性和复杂性的疾病, 以两大类核心症状为特征: 行为、兴趣或活动模式重复和受限以及社会沟通和互动方面的持续缺陷^[1,2]。根据美国疾病控制和预防中心 (centers for disease control, CDC) 最新数据显示, 全世界每 44 名儿童中约有 1 名被确诊为 ASD^[3]。据报道, 丙戊酸钠 (valproic acid, VPA) 是一种抗惊厥或抗癫痫类药物, 妊娠期 VPA 暴露会显著提高后代发生重大先天性畸形、认知发育迟缓及患 ASD 的风险^[4]。临床研究表明, ASD 患者脑功能网络存在显著异常, 涉及额叶、海马、小脑等关键脑区的结构和连接异常, 其中小脑内部连接及其与大脑皮质 (如前额叶、顶叶) 的功能连接紊乱可能与 ASD 患者的刻板行为、社交互动及语言沟通障碍密切相关^[5]。

临床研究发现, 小脑是自闭症中最常见的异常脑区之一^[6], 浦肯野细胞作为小脑唯一的传出神经元, 其突触功能障碍与神经系统多重病理改变相关, 病理表现不仅限于共济失调, 还可能引发 ASD 样行为表现, 如刻板重复行为、社交互动受损以及异常的超声发声等^[7]。研究表明, 进行性肌阵挛癫痫中, 小脑浦肯野细胞退行性改变和活性降低会导致 γ -氨基丁酸能传递功能受损, 从而破坏小脑输出网络的整体抑制调控, 促进癫痫发作 (尤其是全面性发作或肌阵挛发作) 的易感性^[8]。

表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) 是山茶中含量最丰富的多酚类化合物, 从妊娠期到成年期, EGCG 可以穿过胎盘和血脑屏障^[9]。越来越多的证据表明 EGCG 在预防和治疗神经系统疾病, 如阿尔茨海默病、帕金森氏病和唐氏综合症等疾病的治疗潜力^[10,11]。有研究指出, EGCG 能改善铅暴露引起的海马神经元树突棘的形成, 从而改变其突触效能发挥神经保护作用^[12]。EGCG 还能够通过调节 *Dyrk1A* 转基因小鼠皮质和海马中 γ -氨基丁酸能和谷氨酸能通路的成分, 并改善相关行为缺陷^[13]。然而, EGCG 在 ASD 中的预防及治疗效果鲜有报道。因此, 本研究旨在探究 EGCG 对 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性和抑制性突触活性的影响及其对小鼠孤独症样刻板行为、运动协调与平衡障碍的干预效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只, 体质量 22~25 g, 6~8 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠 20 只, 体质量 20~23 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司【SCXK (辽) 2025-0001】。饲养于齐齐哈尔医学院实验动物中心【SYXK (黑) 2021-013】, 动物室温度为 (22±2) °C, 湿度为 55%±5%, 自由摄食、饮水。所有实验均通过齐齐哈尔医学院附属第三医院实验动物福利伦理委员会批准 (AECC-2022-007), 实验过程遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

VPA (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号: P4543)、EGCG (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 货号: E107403), 0.9% NaCl 溶液 (辰欣药业股份有限公司, 国药准字: H37022337)。NaCl (货号: S5886), KCL (货号: P5405), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (货号: M2670), NaH_2PO_4 (货号: S8282), NaHCO_3 (货号: S5761), D-(+)-葡萄糖 (D-(+)-Glucose, D-Glc, 货号: G7021), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (货号: C7902), 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid,

HEPES, 货号: V900477), 乙二醇醚二胺四乙酸 (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, EGTA, 货号: E4378), 腺苷 5'-三磷酸二钠盐水合物 (Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate, Na₂ATP, 货号: A2383), 鸟苷 5'-二磷酸钠盐 (Guanosine 5'-diphosphate sodium salt, Na₂GTP, 货号: G7127), 葡萄糖酸钾 (Potassium gluconate, K-Glu, 货号: P1847), 生物胞素 (Biocytin, Bio, 货号: B4261) 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。小鼠旷场实验装置 (北京众实迪创科技发展有限公司, 型号: ZS-KC), 小鼠转棒疲劳仪 (北京众实迪创科技发展有限公司, 型号: ZS-QDM-XS), 小鼠平衡木实验装置 (北京众实迪创科技发展有限公司, 型号: ZS-P-I), 动物行为学分析软件 (北京众实迪创科技发展有限公司, 型号: Labmaze), 膜片钳放大器 (美国 Molecular Devices, 型号: Axopatch700B), 数据采集与分析软件 (美国 Molecular Devices, 型号: Clampex 10.4), 数模/模数转换器 (美国 Molecular Devices, 型号: Digidata 1550AD/DA), 震动切片机 (德国 Leica, 型号: VT1200S), 显微镜 (日本 Nikon, 型号: Eclipse FN1)。

1.3 实验方法

1.3.1 ASD 小鼠模型的建立与分组

实验动物是 C57BL/6J 雄性子代小鼠。采用双盲分组原则分为 4 组: 正常对照 (CON) 组、VPA 组、VPA+25 mg/kg EGCG 组、VPA+50 mg/kg EGCG 组, 每组 8 只小鼠。具体分组方法如下: 将 6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠与雌性 C57BL/6J 小鼠按照雌雄比 2:1 在 20:00 进行合笼并记录雌鼠体重, 次日 8:00 将雄鼠分出, 检测雌鼠阴道口处是否形成阴栓。如若检测有阴栓或阴道口张开即为妊娠第 0.5 天。在妊娠第 12.5 天对 VPA 组、VPA+25 mg/kg EGCG 组、VPA+50 mg/kg EGCG 组的亲代孕鼠腹腔注射 500 mg/kg VPA, CON 组的亲代孕鼠在相同时间腹腔注射等体积 0.9% NaCl 溶液。待子代小鼠出生第 21 天时将母鼠与子代小鼠分笼饲养, 取其雄性子代小鼠继续饲养至 8~10 周, 体质量达到 22~25 g 后用于行为学实验和电生理记录。

1.3.2 EGCG 给药方式

在子代小鼠出生后第 21 天开始腹腔注射给药 EGCG, EGCG 溶于 0.9% NaCl 溶液, 给药剂量分别为 25 mg/kg 和 50 mg/kg, 每天 1 次, 持续给药 3 周。CON 组和 VPA 组在相同时间腹腔注射等体积 0.9% NaCl 溶液。行为学实验和电生理记录在子代小鼠出生后的 8~10 周进行。

1.3.3 行为学实验

(1) 埋球实验

第一阶段: 适应阶段, 将两颗玻璃珠放置在鼠笼中适应 2 d。第二阶段, 测试阶段, 刨花垫料铺好小鼠笼底部, 在垫料表面上放置 12 颗玻璃珠, 每排 4 个, 每个大约相距 4 cm, 共 3 排。计时 30 min, 记录 4 组小鼠埋入玻璃珠的数量, 8 颗玻璃珠埋入垫料中认为有效埋藏。每只小鼠测试完成后, 用 75%乙醇对装置进行彻底清理, 方可进行下一组实验。

(2) 自我梳理实验

将待检测的小鼠置于旷场实验箱中, 计时 30 min, 记录 4 组小鼠梳理的时间、第一次梳理潜伏时间。每只小鼠测试完成后, 用 75%乙醇对装置进行彻底清理, 方可进行下一组实验。

(3) 加速转棒实验

第一阶段: 适应阶段, 将待检测的小鼠置于转棒上, 保持小鼠平衡, 初始速度为 4 r/min, 均速加速至最大速度 40 r/min, 每只小鼠连续训练 5 d, 每天训练 3 次, 相邻两次训练间隔不少于 30 min, 计时 5 min。第二阶段: 加速测试阶段, 计时 5 min, 记录小鼠在棒时间 (开始旋转至小鼠掉落的时间)、小鼠在棒圈数和小鼠掉落时转速。每只小鼠测试完成后, 用 75%乙醇对装置进行彻底清理, 方可进行下一组实验。

(4) 平衡木实验

第一阶段: 适应阶段, 将待检测的小鼠置于高 100 cm, 长 100 cm, 宽 1.5 cm 的木板中, 保持小鼠平衡, 一侧木板末端放置有小鼠日常用筑巢材料为吸引小鼠进入, 每只小鼠连续训练 2 d, 每天训

练 3 次, 相邻两次训练间隔不少于 10 min。第二阶段: 测试阶段, 每只小鼠进行 3 次独立的测试, 记录完全穿过平衡木所需的时间。每只小鼠测试完成后, 用 75%乙醇对装置进行彻底清理, 方可进行下一组实验。

1.3.4 电生理记录

使用震动切片机将大脑横向切片, 切成包含小脑的矢状面切片, 厚度为 250 μm 。随后, 将切片置于持续通入 95% O_2 和 5% CO_2 、温度为 34 $^{\circ}\text{C}$ 的人工脑脊液中孵育至少一小时。采用红外照明相差的显微镜观察小脑浦肯野细胞。使用硼硅玻璃微电极进行全细胞膜片钳记录。用 Clampex 10.1 软件和 Axon 700B 膜片钳放大器记录细胞电信号。为评估动作电位 (action potential, AP) 发放情况, 在电流钳条件下将细胞维持在接近其静息电位 (-60 mV) 的状态。每隔 400 ms 加 1 次连续的电流注入, 从 0~400 pA, 每次递增 20 pA, 观察 AP 的数量。为评估自发的兴奋性突触后电流 (spontaneous excitatory postsynaptic current, sEPSC) 和抑制性突触后电流 (spontaneous inhibitory postsynaptic currents, sIPSC), 神经元被维持在 -70 mV 的保持电位, 在电压钳的模式下检测 sEPSC, 随后, 神经元被维持在 0 mV 的保持电位, 在电压钳的模式下检测 sIPSC。

人工脑脊液配制: 细胞外液: 主要成分为 118 NaCl, 3 KCl, 1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 NaHCO_3 , 10 D-Glc, 2 CaCl_2 , 单位 nmol/L, pH: 7.3~7.4, 渗透压: 290~300 mOsm。细胞内液: 主要成分为 120 K-Glu、10 HEPES、1 EGTA、5 KCl, 3.5 MgCl_2 , 4 NaCl, 8 Bio, 4 Na_2ATP , 0.2 Na_2GTP , 单位: nmol/L, pH: 7.3; 渗透压: 300 mOsm。

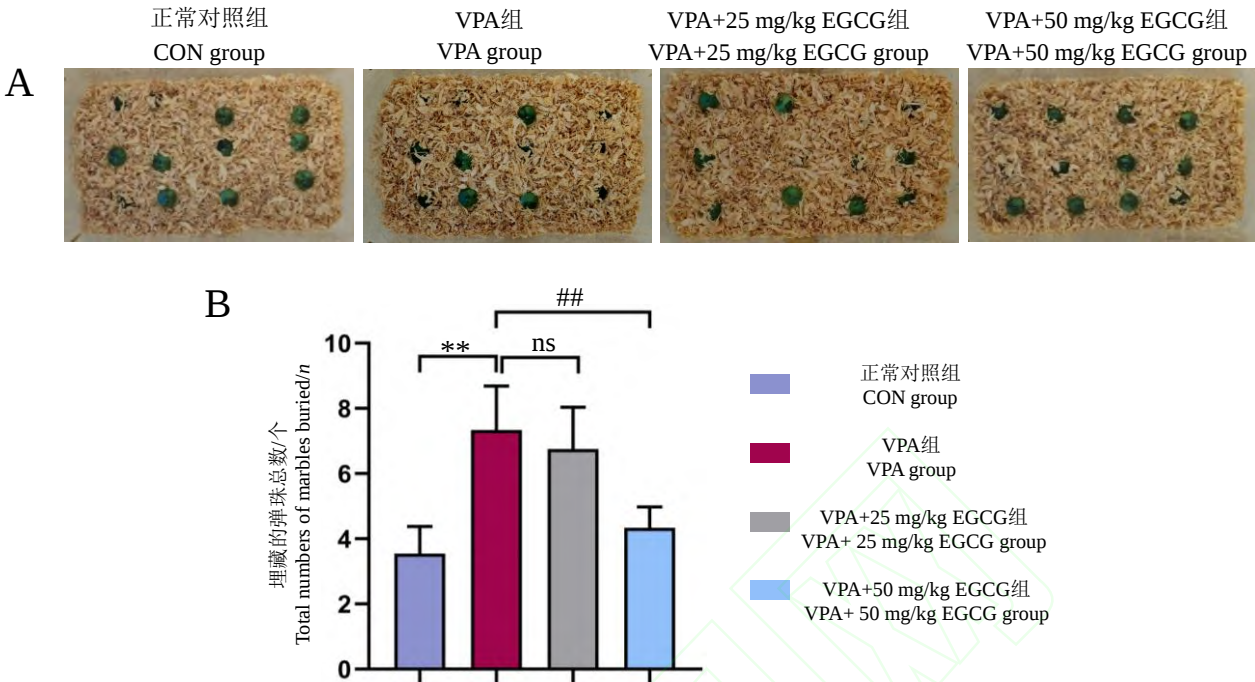
1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。实验结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各组间数据采用单因素方差分析, 两两比较采用 Tukey 检验, 不满足正态分布的数据, 两组间样本比较采用 Mann-Whitney U 检验, 多组间样本比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 组间两两样本比较采用 Dunn's 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 减轻 VPA 诱导 ASD 小鼠重复刻板行为

通过埋球实验检测小鼠的重复刻板行为, 结果如图 1 所示, 在 30 min 的埋球实验中, VPA 组小鼠埋球的数量明显高于 CON 组小鼠 ($P<0.01$, 图 1B), 提示 VPA 诱导 ASD 小鼠出现重复刻板行为。经过腹腔注射 EGCG 后, 与 VPA 组相比较, VPA+25 mg/kg EGCG 组和 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠埋球数量均有下降的趋势, 其中 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠埋球数量显著降低, 且差异有统计学意义 ($P<0.01$, 图 1B), 提示 EGCG 对 VPA 诱导 ASD 小鼠重复刻板行为具有一定的改善作用, 且 50 mg/kg EGCG 剂量效果显著。



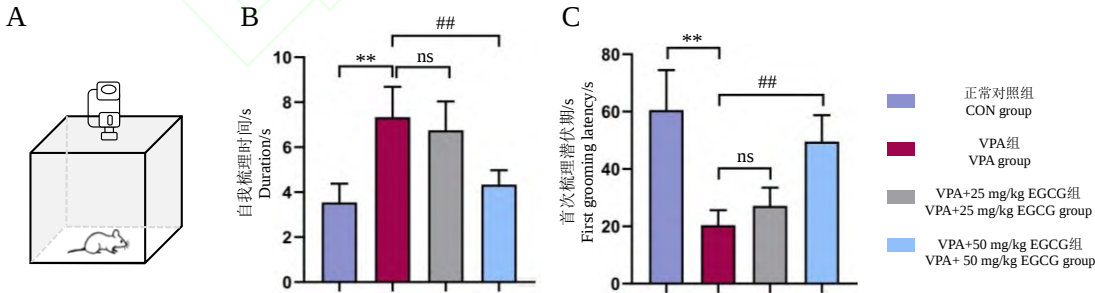
注：A：埋球实验结果示意图；B：埋藏的弹珠总数。与正常对照组相比，** $P<0.01$ ；与 VPA 组相比，## $P<0.01$ 。

图 1 埋球实验结果

Note. A, Schematic diagram of the marbles buried test. B, Total numbers of arbles buried. Compared with CON group, ** $P<0.01$. Compared with VPA group, ## $P<0.01$.

Figure 1 Results from the marbles buried test

通过自我梳理实验检测小鼠的刻板行为，结果如图 2 所示，在 30 min 的自我梳理实验中，VPA 组小鼠自我梳理时间（ $P<0.01$ ，图 2B），首次梳理潜伏期（ $P<0.01$ ，图 2C）与 CON 组相比有显著性差异。经过腹腔注射 EGCG 后，与 VPA 组相比较，VPA+25 mg/kg EGCG 组和 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠自我梳理时间有下降趋势，其中 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠自我梳理时间显著降低，且差异有统计学意义（ $P<0.01$ ，图 2B）。VPA+25 mg/kg EGCG 组和 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠首次梳理潜伏期时间延长，其中 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠首次梳理潜伏期时间显著增加，且差异有统计学意义（ $P<0.01$ ，图 2C）。提示，50 mg/kg EGCG 干预可显著减轻 VPA 诱导 ASD 小鼠刻板行为，且 50 mg/kg EGCG 剂量效果显著。



注：A：自我梳理实验示意图；B：自我梳理时间；C：首次梳理潜伏期。与正常对照组相比，** $P<0.01$ ；与 VPA 组相比，## $P<0.01$ 。

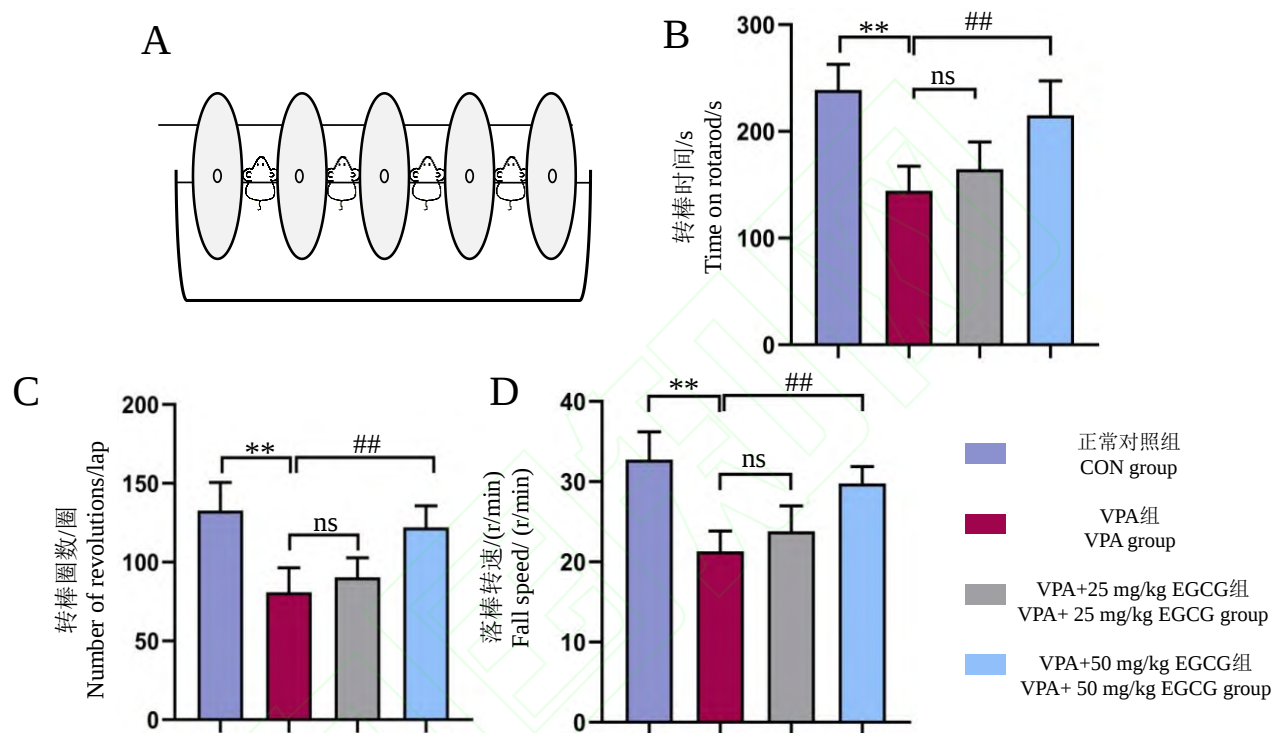
图 2 自我梳理实验结果

Note. A, Schematic diagram of the self-grooming test. B, Durations of Self-grooming time. C, Latency of the first Self-grooming. Compared with CON group, ** $P<0.01$. Compared with VPA group, ## $P<0.01$.

Figure 2 Results from the self-grooming test

2.2 EGCG 改善 VPA 诱导 ASD 小鼠运动协调与平衡障碍

通过加速转棒实验检测小鼠运动协调和平衡能力,结果如图 3 所示,在加速转棒实验中,VPA 组小鼠转棒时间($P<0.01$,图 3B)、转棒圈数($P<0.01$,图 3C)和掉落时转速($P<0.01$,图 3D)明显少于 CON 组小鼠,提示 VPA 诱导 ASD 小鼠运动协调和平衡能力减弱。经过腹腔注射 EGCG 后,与 VPA 组相比较,VPA+25 mg/kg EGCG 组和 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠转棒时间、转棒圈数和掉落时转速均有所增加,其中 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠转棒时间($P<0.01$,图 3B)、转棒圈数($P<0.01$,图 3C)和掉落时转速($P<0.01$,图 3D)均显著增加,且差异有统计学意义,提示 EGCG 能够显著改善 VPA 诱导 ASD 小鼠运动协调与平衡障碍,且 50 mg/kg EGCG 剂量干预效果显著。



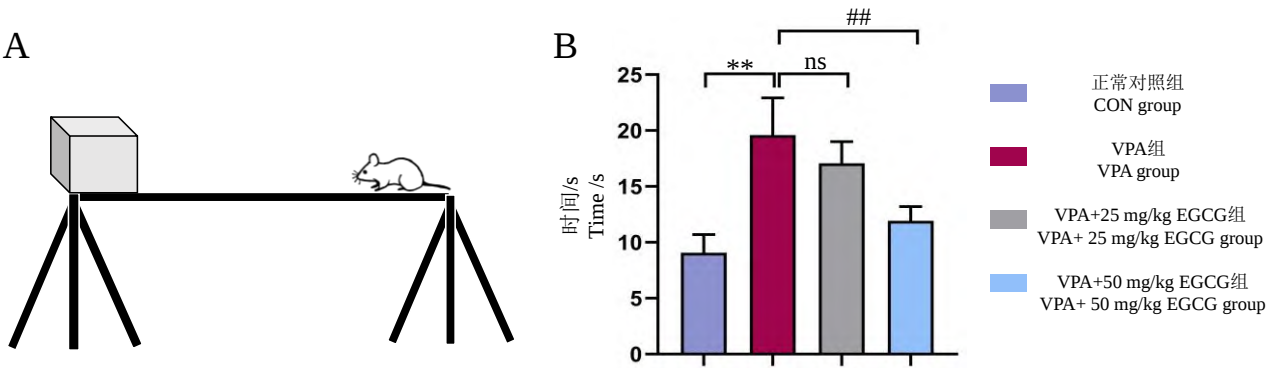
注: A: 加速转棒实验示意图; B: 转棒时间; C: 转棒圈数; D: 落棒转速。与正常对照组相比, ** $P<0.01$; 与 VPA 组相比, ## $P<0.01$ 。

图 3 加速转棒实验结果

Note. A, Schematic diagram of the accelerated rotarod test. B, Time on rotarod. C, Number of revolutions. D, Rotation speed at fall. Compared with CON group, ** $P<0.01$. Compared with VPA group, ## $P<0.01$.

Figure 3 Results from the accelerated rotarod test

通过平衡木实验检测小鼠的运动协调和平衡能力,结果如图 4 所示,在平衡木实验中,VPA 组小鼠完全通过平衡木时间($P<0.01$,图 4B)明显多于 CON 组小鼠,提示 VPA 组小鼠运动协调与平衡能力减弱。经过腹腔注射 EGCG 后,与 VPA 组相比较,VPA+25 mg/kg EGCG 组和 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠通过完全通过平衡木的时间均有所缩短,其中 VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠完全通过平衡木时间($P<0.01$,图 4B)显著减少,且差异有统计学意义,提示 EGCG 能够显著改善 VPA 诱导 ASD 小鼠运动协调与平衡障碍,且 50 mg/kg EGCG 剂量改善作用显著。



注：A：平衡木实验示意图；B：完全通过平衡木时间。与正常对照组相比，** $P<0.01$ ；与 VPA 组相比，## $P<0.01$ 。

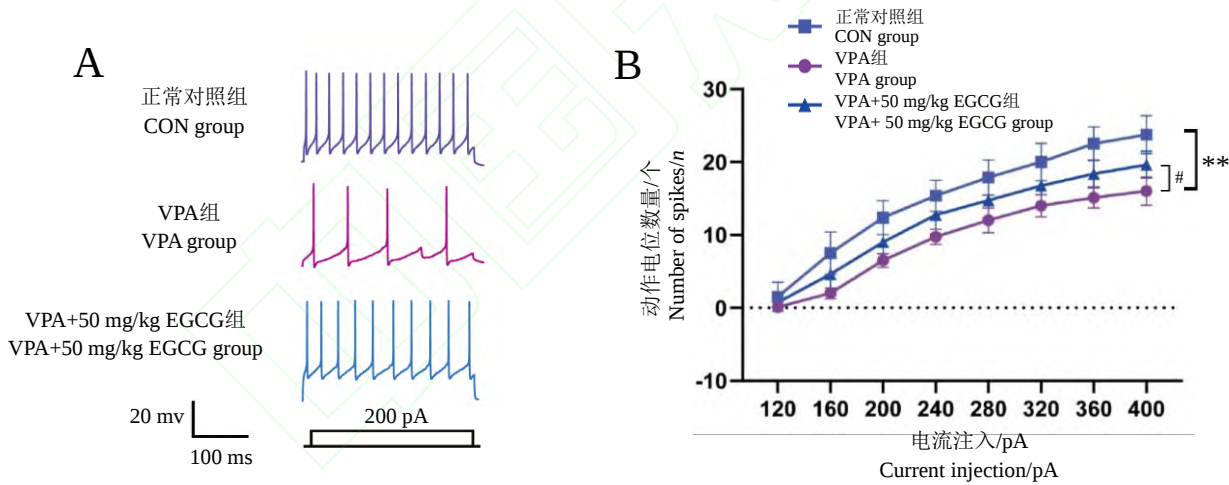
图 4 平衡木实验结果

Note. A, Schematic diagram of the balance beam test. B, Time on balance beam. Compared with CON group, ** $P<0.01$. Compared with VPA group, ## $P<0.01$.

Figure 4 Results from the balance beam test

2.3 EGCG 改善 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性降低

为进一步探究 EGCG 对 VPA 诱导子代 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性的影响，结果如图 5 所示，应用全细胞膜片钳记录小脑浦肯野细胞 AP 发放情况，观察 AP 的数量。与 CON 组小鼠相比，VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞放电频率明显降低，兴奋性减弱 ($P<0.01$ ，图 5B)，经过腹腔注射 50 mg/kg EGCG 后，VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠小脑浦肯野细胞放电部分恢复 ($P<0.01$ ，图 5B)，提示 EGCG 能够显著改善 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞放电频率减少及兴奋性降低。



注：A：小脑浦肯野细胞 AP 示意图；B：AP 数量。与正常对照组相比，** $P<0.01$ ；与 VPA 组相比，# $P<0.05$ 。

图 5 小脑浦肯野细胞 AP 实验结果

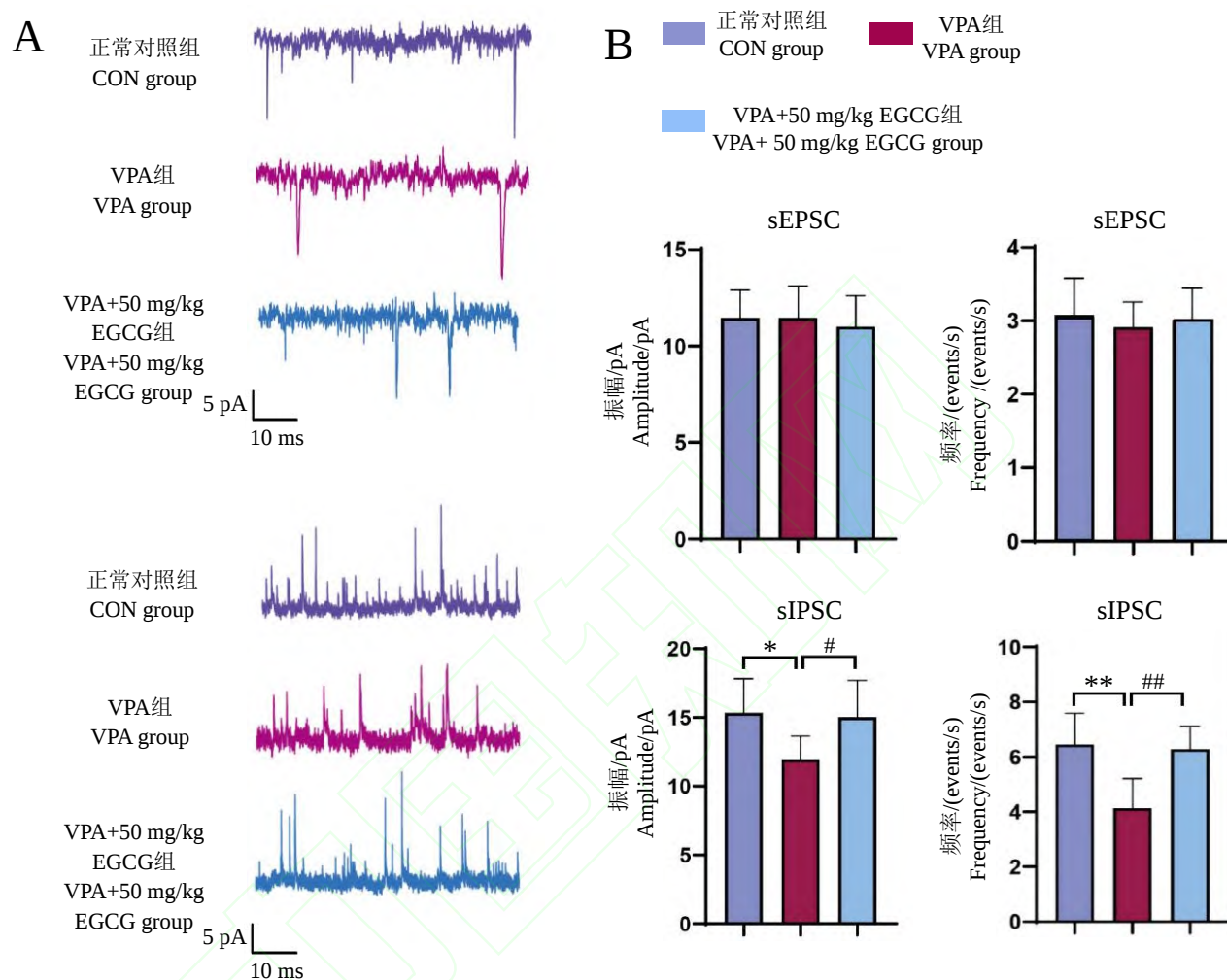
Note. A, Schematic diagram of the APs in Purkinje cells. B, Number of spikes in Purkinje cells. Compared with CON group, ** $P<0.01$. Compared with VPA group, # $P<0.05$.

Figure 5 Results from the APs in cerebellum Purkinje cells

2.4 EGCG 改善 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞抑制性突触活性

为进一步探究 EGCG 对 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞的兴奋性和抑制性突触活性的影响。应用全细胞膜片钳记录小脑浦肯野细胞 sEPSC 和 sIPSC。研究发现，与 CON 组小鼠相比，VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞 sEPSC 的频率 ($P>0.05$ ，图 6B) 和振幅 ($P>0.05$ ，图 6B) 均无明显改变，然而，VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞 sIPSC 的频率 ($P<0.01$ ，图 6B) 和振幅 ($P<0.05$ ，图 6B) 均显著降低，经过腹腔注射 50 mg/kg EGCG 后，VPA+50 mg/kg EGCG 组小鼠小脑浦肯野细胞 sEPSC 的频率

($P>0.05$, 图 6B) 和振幅 ($P>0.5$, 图 6B) 亦无明显改变, sIPSC 的频率 ($P<0.01$, 图 6B) 和振幅 ($P<0.05$, 图 6B) 均显著升高, 且差异有统计学差异, 提示 EGCG 可显著改善 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞抑制性突触活性的降低。



注: A: 小脑浦肯野细胞 sEPSC 和 sIPSC 示意图; B: sEPSC 频率和振幅、sIPSC 频率和振幅。与正常对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 VPA 组相比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 6. 小脑浦肯野细胞 sEPSC 和 sIPSC 实验结果

Note. A, Schematic diagram of the sEPSC and sIPSC in cerebellar Purkinje cells. B, Cumulative probability curves for sEPSC amplitude and frequency, sIPSC amplitude and frequency. Compared with CON group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with VPA group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 6 Results from the sEPSC and sIPSC in cerebellar Purkinje cells

3 讨论

ASD 包括一系列复杂的神经发育障碍, 其特征是重复刻板 and 社交互动障碍行为模式^[14]。研究发现, 妊娠期 VPA 暴露后啮齿类动物子代表现出与 ASD 患者相似的行为缺陷, 包括明显的重复刻板行为、认知功能障碍和社交互动能力缺陷等^[2]。本研究通过埋球实验和自我梳理实验检测 ASD 小鼠重复刻板行为, 结果发现, 与 CON 组小鼠相比, 经 VPA 诱导后 ASD 小鼠表现出明显的重复刻板行为; 通过加速转棒实验、平衡木实验检测 ASD 小鼠的运动协调与平衡障碍, 结果发现, 与 CON 组小鼠相比, 经 VPA 诱导后 ASD 小鼠出现运动失调与平衡障碍, 这与 Zheng 等^[15]报道的结果一致。有研究认为, 日常饮用适量的绿茶可显著降低认患者出现认知障碍的风险, 茶叶中富含的多种生物活性成分, 使其神经保护作用呈现出多靶点、低毒性及协同增效的特点^[16,17]。EGCG 是茶叶中含量最多的多

酚类化合物,

在神经系统中的作用机制主要通过调节氧化应激、炎症反应和自噬等过程,从而对多种神经疾病的发生发展产生干预作用^[18]。本研究中,通过腹腔注射 25 mg/kg EGCG 和 50 mg/kg EGCG 后发现,50 mg/kg EGCG 干预能够显著减轻 VPA 诱导 ASD 小鼠重复刻板行为,改善 VPA 诱导 ASD 小鼠运动协调与平衡障碍。

小脑是许多 ASD 易感基因高度共表达的区域,近年来小脑在调控情感、认知功能以及注意力调控等高级神经活动中起着至关重要的作用^[19]。其中浦肯野细胞作为小脑中唯一的传出神经元,其结构和功能异常与临床中 ASD 患者运动协调障碍及认知功能损害密切相关^[20,21]。本课题组前期研究发现,VPA 暴露后 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞数量减少并且出现退行性改变^[22]。本研究中,进一步观察 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性及抑制性突触活性,通过全细胞膜片钳记录小脑浦肯野 AP 放电情况,发现 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野放电频率减少及兴奋性降低,进一步证实 VPA 诱导子代 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞电生理功能异常。既往研究表明,EGCG 通过多重途径调节神经元的兴奋性,包括小电导钙激活钾通道(SK 通道)、电压门控钙离子通道、酸感离子通道和非选择性离子通道(如抑制谷氨酸能突触传递)等^[23]。在小脑神经环路中,浦肯野细胞接收大量来自大脑和脊髓的兴奋性输入和局部抑制性输入,通过轴突末梢释放抑制性的神经递质 γ -氨基丁酸^[24],此外,EGCG 通过激活 γ -氨基丁酸受体抑制自发兴奋性突触传递,发挥类似苯二氮卓类药物的抗焦虑及神经保护作用^[25]。基于此,本研究观察了 EGCG 对 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞的兴奋性和抑制性突触活性的影响,通过全细胞膜片钳记录小脑浦肯野细胞 sEPSC 和 sIPSC,结果发现 EGCG 能够改善 VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞 sIPSC 的频率和振幅降低,但对 sEPSC 的频率和振幅无明显影响,发现 EGCG 对 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞抑制性突触活性降低有显著改善作用。

本研究在 EGCG 调节小脑浦肯野细胞兴奋性改善 VPA 诱导小鼠行为缺陷方面取得初步进展,研究表明通过腹腔注射 EGCG 对 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞放电频率的降低和兴奋性减弱,并改变抑制性突触活性,从而有效缓解 ASD 小鼠行为缺陷。但本研究存在一定的局限性,首先,本研究集中于 EGCG 对小脑浦肯野细胞功能学的分析,虽然前期研究结果明确 EGCG 可逆转 ASD 诱导 VPA 小鼠小脑浦肯野细胞数量减少和病理结构改变,接下来的研究重点将形态学指标与功能学参数进行关联和整合分析,通过双光子活体成像同步监测小脑浦肯野细胞变化与突触传递效能,为阐明 VPA 诱导的病理改变与浦肯野细胞功能异常之间的因果关系提供更为直接和有力的证据。其次,目前机制研究仅聚焦于小脑单一脑区,未能深入探究 EGCG 对其他脑区(如前额叶皮质、海马等)神经元活动的调控作用。此外,接下来需明确 EGCG 在神经系统疾病中多靶点协同调控机制。据了解,EGCG 作为神经系统疾病的有效保护剂,其通过维持神经递质稳态、抑制淀粉样蛋白异常沉积、调节氧化应激-炎症级联反应等多靶点机制干预神经退行性疾病、认知功能障碍、神经损伤以及脑损伤等疾病的治疗药物研发中具有重要前景^[26]。EGCG 可通过抑制淀粉样蛋白异常沉积、增强海马 CA3 和 CA1 区域的突触传递,从而延缓淀粉样变性进程并改善认知功能障碍^[27]。未来需进一步开展跨脑区、多层次的机制研究,以阐明 EGCG 的神经调控作用,为其在神经疾病及认知障碍等治疗中的合理应用提供理论依据。

综上所述,本研究结果表明 EGCG 能够剂量依赖性调节 VPA 诱导 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞兴奋性和抑制性突触活性,从而改善 VPA 诱导 ASD 小鼠孤独症样刻板行为、运动协调与平衡障碍。这为 EGCG 作为天然活性分子在 ASD 干预中的应用提供了有力依据,为深入理解 ASD 的环路机制及临床中预防、治疗和干预 ASD 患者提供更多的思路及方法。

参 考 文 献

- [1] Jiang P, Zhou L, Zhao L, et al. Puerarin attenuates valproate-induced features of ASD in male mice via regulating Slc7a11-dependent ferroptosis [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2024, 49(3): 497-507.
- [2] Fujishiro S, Tsuji S, Akagawa S, et al. Dysbiosis in gut microbiota in children born preterm who developed autism spectrum disorder: a pilot study [J]. *J Autism Dev Disord*, 2023, 53(10): 4012-4020.
- [3] Qi C, Chen A, Mao H, et al. Excitatory and inhibitory synaptic imbalance caused by brain-derived neurotrophic factor deficits during development in a valproic acid mouse model of autism [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 860275.
- [4] De La Rubia Ortí J E, Moneti C, Serrano-Ballesteros P, et al. Liposomal epigallocatechin-3-gallate for the treatment of intestinal dysbiosis in

- children with autism spectrum disorder: a comprehensive review [J]. *Nutrients*, 2023, 15(14): 3265.
- [5] Fatemi S H, Aldinger K A, Ashwood P, et al. Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism [J]. *Cerebellum*, 2012, 11(3): 777-807.
- [6] Van Overwalle F, Manto M, Cattaneo Z, et al. Consensus paper: cerebellum and social cognition [J]. *Cerebellum*, 2020, 19(6): 833-868.
- [7] Wang L, Chen J, Hu Y, et al. Progranulin improves neural development via the PI3K/Akt/GSK-3 β pathway in the cerebellum of a VPA-induced rat model of ASD [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 114.
- [8] Bernardi S, Gemignani F, Marchese M. The involvement of Purkinje cells in progressive myoclonic epilepsy: Focus on neuronal ceroid lipofuscinosis [J]. *Neurobiol Dis*, 2023, 185: 106258.
- [9] Liu Y, Chen Z J, Fei Y, et al. Investigating the therapeutic potential of epigallocatechin gallate (EGCG) for chronic pain management: mechanisms, applications, and future perspectives [J]. *Fitoterapia*, 2025, 184: 106646.
- [10] Yao L, Yang Y, Yang X, et al. The interaction between nutraceuticals and gut microbiota: a novel therapeutic approach to prevent and treatment Parkinson's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(11): 9078-9109.
- [11] El-Missiry M A, Othman A I, El-Sawy M R, et al. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on radiation-induced damage and apoptosis in the rat hippocampus [J]. *Int J Radiat Biol*, 2018, 94(9): 798-808.
- [12] Ge M M, Hu F, Lou Z Y, et al. Role of Wnt/ β -catenin signaling in the protective effect of epigallocatechin-3-gallate on lead-induced impairments of spine formation in the hippocampus of rats [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(40): 31622-31628.
- [13] De La Torre R, De Sola S, Pons M, et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(2): 278-288.
- [14] Wang X, Li Y, Li R, et al. Low-frequency RTMS attenuates social impairment in the VPA-induced mouse model [J]. *Behav Brain Res*, 2024, 472: 115156.
- [15] Zheng W A, Wang M, Cui Y, et al. Establishment of a two-hit mouse model of environmental factor induced autism spectrum disorder [J]. *Heliyon*, 2024, 10(9): e30617.
- [16] El-Borm H T, Abd El-Gaber A S. Effect of prenatal exposure of green tea extract on the developing central nervous system of rat fetuses; histological, immune-histochemical and ultrastructural studies [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(8): 4704-4716.
- [17] Payne A, Nahashon S, Taka E, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): new therapeutic perspectives for neuroprotection, aging, and neuroinflammation for the modern age [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 371.
- [18] Chen Y, Liu Z, Gong Y. Neuron-immunity communication: mechanism of neuroprotective effects in EGCG [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64(25): 9333-9352.
- [19] Sivalingam A M, Pandian A. Cerebellar roles in motor and social functions and implications for ASD [J]. *Cerebellum*, 2024, 23(6): 2564-2574.
- [20] Hanzel M, Fernando K, Maloney S E, et al. Mice lacking *Astn2* have ASD-like behaviors and altered cerebellar circuit properties [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2024, 121(34): e2405901121.
- [21] Kiffmeyer E A, Cosgrove J A, Siganos J K, et al. Deficits in cerebellum-dependent learning and cerebellar morphology in male and female BTBR autism model mice [J]. *NeuroSci*, 2022, 3(4): 624-644.
- [22] 杨贺旻, 孙茂林, 刘适, 等. EGCG 对孤独症小鼠小脑浦肯野细胞及行为学的影响 [J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2026, 64 (1): 43-56.
- Yang H M, Sun M L, Liu S, et al. Effects of EGCG on cerebellar Purkinje cells and behavioral phenotypes in a mouse model of autism spectrum disorder [J]. *J Shandong Univ Heal Sci*, 2026, 64(1): 43-56.
- [23] Uchino M, Sashide Y, Takeda M. Suppression of the excitability of rat nociceptive secondary sensory neurons following local administration of the Phytochemical, (-)-Epigallocatechin-3-gallate [J]. *Brain Res*, 2023, 1813: 6148426.
- [24] Bai J, Ye T, Wei Y B, et al. Opioid receptors modulate parallel fiber-Purkinje cell synaptic transmission in mouse cerebellum [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 770: 136356.
- [25] Park K S, Oh J H, Yoo H S, et al. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) reverses caffeine-induced anxiogenic-like effects [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 481(2): 131-134.
- [26] Öztürk H, Köse D, Bayrakdar A B, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) decreases neuronal network excitability and interictal like activity in mouse brain slices [J]. *Neurosci Lett*, 2025, 859-861: 138274.
- [27] Gonçalves P B, Sodero A C R, Cordeiro Y. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) targeting protein misfolding in drug discovery for neurodegenerative diseases [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 767.