

# EGCG对孤独症小鼠小脑浦肯野细胞及行为学的影响

杨贺旻<sup>1</sup>, 孙茂林<sup>2</sup>, 刘适<sup>1</sup>, 殷玥<sup>3</sup>, 张娜<sup>4</sup>, 张明龙<sup>5</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院附属第三医院中心实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 齐齐哈尔医学院附属第三医院办公室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

3. 齐齐哈尔医学院附属第三医院科研科, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

4. 齐齐哈尔医学院附属第三医院放疗科, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

5. 齐齐哈尔医学院遗传学教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**摘要:**目的 探究腹腔注射表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)对丙戊酸钠(valproic acid, VPA)诱导孤独症子代小鼠小脑浦肯野细胞形态和孤独症样行为的影响。方法 构建VPA小鼠模型,腹腔注射EGCG,通过HE染色,免疫荧光实验观察EGCG对VPA诱导的孤独症谱系障碍(autism spectrum disorder, ASD)小鼠小脑浦肯野细胞病理学的影响。通过行为学方法(三箱社交实验、旷场实验、高架十字迷宫实验、新物体识别实验、Morris水迷宫实验)观察正常组小鼠、VPA组小鼠和VPA+EGCG组小鼠、社交水平、自发活动、焦虑以及学习记忆的差异。结果 HE染色和免疫荧光实验表明,腹腔注射EGCG可逆转VPA诱导子代ASD小鼠小脑浦肯野细胞数量减少和病理学改变;三箱社交实验中,腹腔注射EGCG可改善VPA诱导子代ASD小鼠的社交倾向性障碍和新奇社交偏好;旷场实验和高架十字迷宫实验中,EGCG可减轻VPA诱导子代ASD小鼠在新异环境中的自发活动和焦虑状态;新物体识别实验中,EGCG能改善VPA诱导子代ASD小鼠对新物体识别和记忆能力缺陷;Morris水迷宫实验中,EGCG可缓解VPA诱导子代ASD小鼠对空间学习记忆功能障碍。结论 EGCG减轻VPA诱导子代ASD小鼠小脑浦肯野细胞数量和病理学改变,改善ASD小鼠孤独症样行为障碍。

**关键词:**表没食子儿茶素没食子酸酯;孤独症谱系障碍;小脑;浦肯野细胞;行为学

中图分类号:R749

文献标志码:A

## Effects of EGCG on cerebellar Purkinje cells and behavioral phenotypes in a mouse model of autism spectrum disorder

YANG Hemin<sup>1</sup>, SUN Maolin<sup>2</sup>, LIU Shi<sup>1</sup>, YIN Yue<sup>3</sup>, ZHANG Na<sup>4</sup>, ZHANG Minglong<sup>5</sup>

(1. Central Laboratory, The Third Affiliate Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China;

2. Office of the President, The Third Affiliate Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China;

3. Scientific Research Department, The Third Affiliate Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China;

4. Department of Radiation Oncology, The Third Affiliate Hospital of Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China; 5. Department of Genetics, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

**Abstract: Objective** To explore the effects of intraperitoneal epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on cerebellar Purkinje cell morphology and autism-like behaviors in valproic acid-induced autistic offspring mice. **Methods** A valproic acid

收稿日期:2025-04-30

基金项目:黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2022-KYYWF-0795);黑龙江省省属本科高校“优秀青年教师基础研究支持计划”项目(YQJH2024279);齐齐哈尔医学院科学院(博士专项)项目(QMSI2024B-04);齐齐哈尔医学院重点培育项目(2025-ZDPY-005)

通信作者:张明龙。E-mail:jylinyao@163.com

杨贺旻。E-mail:18243393252@163.com

(VPA)-induced mouse model of autism spectrum disorder (ASD) was established. Following intraperitoneal injection of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), hematoxylin and eosin (H&E) staining and immunofluorescence were performed to evaluate the effects of EGCG on VPA-induced pathological changes in cerebellar Purkinje cells. Behavioral tests including the three-chamber social interaction test, open field test, elevated plus maze test, novel object recognition test, and Morris water maze test were performed to assess differences in social behavior, spontaneous locomotor activity, anxiety-like behaviors, and learning/memory performance among control mice, VPA-exposed mice, and VPA + EGCG-treated mice. **Results** H&E staining and immunofluorescence analyses revealed that intraperitoneal administration of EGCG reversed VPA-induced reductions in cerebellar Purkinje cell density and ameliorated pathological alterations in offspring ASD model mice. In the three-chamber social test, EGCG administration improved social preference deficits and restored novelty-induced social interaction in VPA-exposed mice. Behavioral assessments further demonstrated that EGCG significantly reduced hyperactivity in novel environments (open field test) and alleviated anxiety-like behaviors (elevated plus maze test) in VPA-induced offspring. Additionally, EGCG enhanced novel object recognition memory in the novel object recognition test and mitigated spatial learning and memory impairments in the Morris water maze. **Conclusion** EGCG treatment ameliorates the VPA-induced reduction in the number of cerebellar Purkinje cells and the associated pathological changes in the cerebellum of offspring autistic mice, resulting in an improvement in ASD-like behavioral abnormalities.

**Key words:** Epigallocatechin-3-gallate; Autism spectrum disorder; Cerebellum; Purkinje cell; Behavioral

孤独症谱系障碍 (autism spectrum disorder, ASD) 是一种神经发育障碍,其特征是复杂的行为异常,包括社交困难和重复行为,并常伴有智力障碍和焦虑症等<sup>[1-2]</sup>。研究认为 ASD 是由多种遗传变异和环境因素引起的,如产前或产后环境暴露于促氧化因子,如丙戊酸钠 (valproic acid, VPA)、汞、铅、病毒、空气污染物、毒素、沙利度胺和视黄酸等<sup>[3-5]</sup>。在临床研究发现,怀孕期间母体暴露于 VPA 后易导致后代 ASD 的患病率增加,被认为是导致后代 ASD 易感性的一个关键危险因素<sup>[6]</sup>。流行病学研究亦表明,怀孕期间使用 VPA 后,后代出现注意力缺陷、认知功能受损、社交互动受损和多动障碍、明显的刻板现象以及一系列被称为胎儿 VPA 综合征的畸形<sup>[7]</sup>。研究表明,VPA 诱发 ASD 被认为是由小脑、边缘系统和脑干的神经元发育缺陷导致突触连通性中断<sup>[8]</sup>。神经影像学研究发现,ASD 患者小脑区域出现异常的神经活动,提示小脑的功能障碍足以产生与 ASD 相关的行为缺陷<sup>[7]</sup>。浦肯野细胞作为小脑皮层唯一的传出神经元,在整合信息传递中发挥重要作用,浦肯野细胞的退化或功能障碍可能通过破坏小脑-皮层环路影响小脑非运动功能,如社交和认知能力<sup>[9]</sup>。浦肯野细胞的突触传递异常可能导致感觉运动协调障碍,不仅会出现共济失调,还会出现孤独症样行为,包括社交障碍、重复行为和异常超声发声等<sup>[4]</sup>。因此,小脑浦肯野细胞与 ASD 发生发展密切相关,相关小脑脑区的神经活动往往伴随着孤独症核心症状的发生。

来自茶叶中的表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 是茶多酚中最主要的生物活性成分,具有较强的抗氧化性和清除自由基的特性。EGCG 作为一种能够预防神经退行性疾病、炎症和癌症疾病的可能治疗剂,通过多种途径发挥神经保护功能<sup>[10]</sup>。Valenti 等<sup>[11]</sup>发现,EGCG 在 ASD 小鼠模型中能够促进神经发生和可塑性的改变,显示出缓解孤独症症状的潜力。EGCG 还可以通过血脑屏障对大脑起到神经保护的作用<sup>[12]</sup>。然而,EGCG 作为抗 ASD 的研究较少,其干预机制尚未完全阐明。因此,本研究旨在探究 EGCG 对 VPA 诱导子代 ASD 小鼠小脑形态功能以及小鼠运动行为障碍的影响,为临床中预防和治疗孤独症患者运动平衡、认知学习提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

健康成年雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只 (体质量 22~25 g),雌性 C57BL/6J 小鼠 20 只 (体质量 18~20 g),由齐齐哈尔医学院实验动物中心提供。分笼饲养,动物室温度为 (22±2)℃,湿度为 (55±5)%。自由摄食、饮水、适应性喂养 1 周。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 (批准编号为 AECC-2022-007)。

### 1.1.2 主要试剂

VPA、EGCG 均购自美国 Sigma 公司, Calbindin-D28k 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 4% 多聚甲醛固定液购自 Biosharp 生物公司, 氯化钠注射液(生理盐水)购自济宁辰欣药业股份有限公司, 乙醇、二甲苯均购自上海国药集团化学试剂有限公司, EDTA 抗原修复液、柠檬酸抗原修复液、Triton X-100、BSA、DAPI 染色液、抗荧光淬灭封片液均购自上海碧云天生物技术有限公司, 伊红染液、苏木素染液购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 中性树脂胶购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.1.3 主要仪器

脱水机(武汉俊杰电子有限公司)、包埋机(武汉俊杰电子有限公司)、病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)、组织摊片机(武汉俊杰电子有限公司)、冻台(武汉俊杰电子有限公司)、超低温冰箱(美国 Thermo scientific 公司); 显微镜(OLYMPUS)、行为学实验装置(小鼠三箱社交实验、小鼠旷场实验、高架十字迷宫实验、新物体识别实验、Morris 水迷宫实验)(北京众实迪创科技发展有限公司)、Labmaze 动物行为学分析软件(北京众实迪创科技发展有限公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 ASD 小鼠模型的建立

将成年雄性 C57BL/6J 小鼠 10 只, 成年雌性 C57BL/6J 小鼠 20 只, 按照雌雄比 2:1 在 19:00-20:00 期间进行合笼并分别记录体质量。次日 7:00-8:00 期间, 检测雌鼠阴道口处是否黏有乳白色或乳黄色物质。如若检测有阴栓或阴道口张开即为妊娠 E0.5 天。在 E7 天、E10 天测量体质量, 给体质量上升 2~5 g 的雌鼠在妊娠 E12.5 天时腹腔注射 500 mg/kg VPA。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 20 只(体质量 20~25 g)用于实验。VPA 制备方法: 称量 0.5 g VPA 溶于生理盐水中, 定容至 10 mL, 分装保存在 -80 °C 冰箱中, 随后以 500 mg/kg 剂量在雌鼠妊娠 E12.5 天时进行腹腔注射。

采用随机数字法进行分组, 分别为正常组, VPA 模型组(VPA 组), EGCG 治疗组(VPA + EGCG 组), 每组 10 只。

### 1.2.2 EGCG 制备和给药治疗

称量 0.25 g EGCG 溶于生理盐水中, 定容至 100 mL, 分装保存在 -80 °C 冰箱中。在子代小鼠出

生 2 周后, 第 3 周开始腹腔注射给药 EGCG, EGCG 溶于生理盐水, 给药剂量 50 mg/kg, 1 次/d, 持续给药 3 周。正常对照组和 VPA 模型组给予相同质量的生理盐水。

### 1.2.3 组织切片的制备

每组中任选 3 只小鼠, 吸入麻醉后用 4% 多聚甲醛缓冲液灌流进行脑组织固定, 用器械将小鼠全脑小心剥离, 取出小脑组织, 固定 48 h 后, 经乙醇梯度脱水, 石蜡包埋后, 将小脑进行矢状切片, 切片厚度为 3  $\mu$ m, 经处理后切片用于 HE 染色和免疫荧光染色实验。

### 1.2.4 HE 染色

将切片附贴在载玻片上, 晾干, 烘烤后脱蜡处理, 进行苏木素染色和伊红染液染色, 脱水封片后在显微镜下观察小脑组织形态分析, 每张切片随机观察 3 处不同视野。

### 1.2.5 免疫荧光染色

将石蜡切片脱蜡、水化、EDTA 抗原修复, Triton X-100 通透 30 min, BSA 封闭反应 30 min, 4 °C 孵育一抗钙结合蛋白 D28 k 抗体(Calbindin-D28k) 中 24 h, PBS 洗涤 3 次, 置于免疫荧光 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 标记的兔 IgG 二抗 F(ab')<sub>2</sub> 片段二抗中, 避光孵育 50 min, PBS 洗涤 3 次, DAPI 进行复染细胞核, 再次 PBS 洗涤 3 次后用抗荧光淬灭封片剂封片, 封片后 4 °C 避光保存。荧光显微镜下观察浦肯野细胞形态, 每张切片随机观察 3 处不同视野。

### 1.2.6 行为学检测

#### 1.2.6.1 三箱社交实验

检测小鼠社交能力和新奇社交偏好性测试。第一阶段: 适应阶段。第二阶段: 社交倾向性测试, 在一侧金属笼子中放一只同性别小鼠 Stanger1 (年龄为 3 周左右), 另一侧放有空的金属笼子(Empty), 将待检测的小鼠放于中间区域, 计时 5 min, 记录检测小鼠在有无社交对象的两个箱子区域的探索时间和社会交往指数(social index, SI),  $SI = \text{Stanger1 区域活动时间} / \text{Empty 区域活动时间}$ 。第三阶段: 小鼠新奇社交偏好性测试。在三箱两侧, 其中一侧金属笼子中放有第二阶段的同性别小鼠 Stanger1, 另一侧金属笼子中放有一只陌生的同性别小鼠 Stanger2 (年龄为 3 周左右)。计时 5 min, 记录检测小鼠在社交对象的两个箱子区域的探索时间、金属笼周区域的时间和社会偏好指数(social preference index, SPI),  $SPI = \text{Stanger2 区域活动时间} / \text{Stanger1 区域}$

活动时间。实验过程中实验者与分析数据者对小鼠分组进行双盲处理。

#### 1.2.6.2 旷场实验

检测小鼠在新异环境中自主探索行为和焦虑情况。实验装置由4个50 cm×50 cm×50 cm箱子组成,底面及四周均为白色。将待检测的小鼠置于旷场中间区域,计时10 min,记录小鼠在进入旷场中心区域次数,在中心区域运动的时间、距离和旷场勘察指数 OFEI,  $OFEI = \text{中心区域活动距离} / \text{总区域活动距离}$ 。实验过程中实验者与分析数据者对小鼠分组进行双盲处理。

#### 1.2.6.3 高架十字迷宫实验

检测小鼠的焦虑程度。实验装置由两条开放臂和两条闭合臂组成,呈十字形交叉,中间正方形区域为中间区域,臂宽5 cm,臂长35 cm,臂高15 cm。将待检测的小鼠头部面向开放臂置于中间区域,计时10 min,记录小鼠在开放臂活动的时间、次数。实验过程中实验者与分析数据者对小鼠分组进行双盲处理。

#### 1.2.6.4 新物体偏好实验

检测小鼠对环境中新引入物体的识别和记忆能力,在新物体识别实验中,第一阶段:适应阶段,将待检测的小鼠置于实验箱中间区域,计时10 min,记录小鼠在实验箱中自由探索的时间。第二阶段:训练阶段,在实验箱中放置两个相似物体,将待检测的小鼠置于实验箱中间区域,计时10 min,记录小鼠在两个新物体区域活动的时间。第三阶段:测试阶段,在实验箱中将其中一个物体替换成一个新的未知物体,计时10 min,记录小鼠在新物体区域活动的时间和新奇物体辨别系数 DI,  $DI = \text{探索新物体区域的时间} / \text{总探索时间}$ 。实验过程中实验者与分析数据者对小鼠分组进行双盲处理。

#### 1.2.6.5 Morris 水迷宫实验

检测小鼠对空间位置和方向的学习记忆能力。水迷宫实验箱体为直径120 cm、高40 cm的圆形温控水箱,水箱四周分别粘贴不同形状和颜色图形作为空间标记。将一个直径8 cm的圆形 Morris 水迷宫平台置于目的象限中央,浸没于水下1 cm。第一阶段:定位航行实验,小鼠连续训练5 d,每天将小鼠放置在不同象限入水,训练4次,每次训练时长为90 s,直到小鼠找到水下隐藏平台并停留10 s结束,记录小鼠入水后找到水下隐藏平台的时间,记为逃

避潜伏期。如果小鼠在90 s内没有找到水下隐藏平台,则人为地将小鼠引导到平台,并停留10 s,记录小鼠的逃避潜伏期为90 s。在整个训练过程中,水下隐藏平台位置保持不变。第二阶段为空间探索实验,于第6天撤掉水下隐藏平台,从平台所在象限的对立象限放入小鼠,记录在60 s内大鼠经过平台的次数。实验过程中实验者与分析数据者对小鼠分组进行双盲处理。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析。符合正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,满足正态分布且满足方差齐性条件的数据,多组间样本比较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,逃避潜伏期比较采用重复测量的方差分析。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 EGCG 可减轻 VPA 诱导子代孤独症小鼠小脑浦肯野细胞数量和病理学改变

HE 染色结果显示,正常组小鼠小脑浦肯野细胞有序排列,细胞结构完整,呈椭圆形,细胞核清晰,核仁明显,无明显水肿和核固缩。相反,VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞出现萎缩,颜色变深,核仁不清晰。三组间小鼠小脑正常形态浦肯野细胞数量差异有统计学意义 ( $F = 22.91, P < 0.001$ )。与正常组相比,VPA 组小鼠小脑正常形态浦肯野细胞数量减少 ( $14.00 \pm 1.90$  vs.  $6.50 \pm 1.64, q = 9.48, P < 0.001, n = 6$ ),提示 VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞出现退行性改变。腹腔注射 EGCG 后,与 VPA 组相比,VPA+EGCG 组小鼠小脑浦肯野细胞数量增加 ( $6.50 \pm 1.64$  vs.  $11.17 \pm 2.23, q = 5.90, P = 0.002, n = 6$ ),VPA+EGCG 组小鼠小脑浦肯野细胞基本恢复其正常的椭圆形结构。免疫荧光染色实验结果显示,VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞数量减少、树突变短且分支减少,经过腹腔注射 EGCG 后,浦肯野细胞数量增多、树突呈延长,与 HE 染色结果一致,提示经过腹腔注射 EGCG 可抑制 VPA 诱导子代孤独症小鼠小脑浦肯野细胞数量和病理学的改变。见图 1。

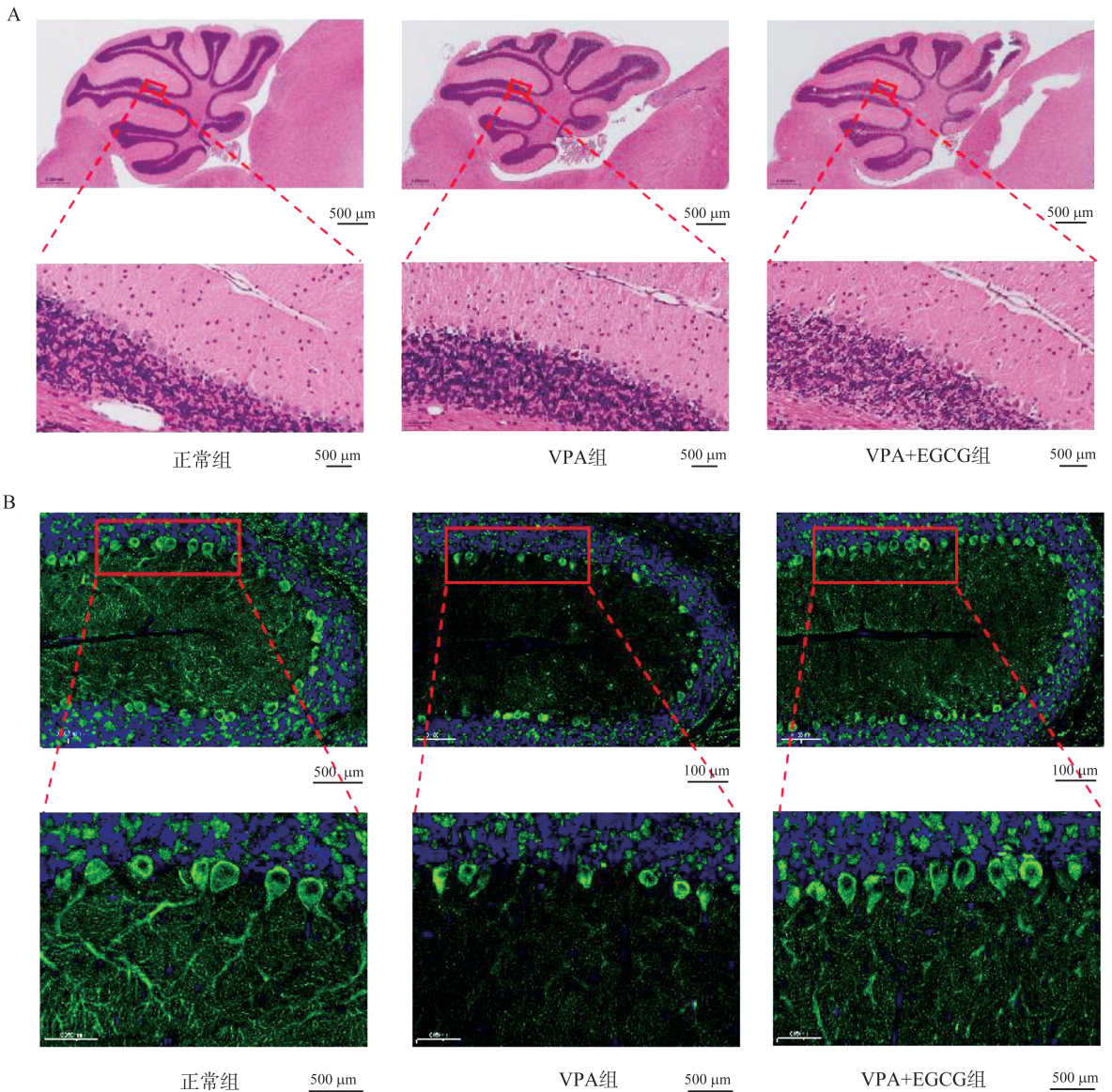


图1 小鼠小脑 HE 染色(A)和免疫荧光染色(B)实验结果

Figure 1 Results of H&E staining (A) and immunofluorescence staining (B) in mouse cerebellum

## 2.2 EGCG 可改善 VPA 诱导子代孤独症小鼠社交倾向性缺陷

三箱社交实验第三阶段社交倾向性测试期间,三组间小鼠在有社交对象 S1 的箱子中探索时间差异有统计学意义 ( $F = 84.04, P < 0.001$ )。VPA 组小鼠在有社交对象 Stanger1 的箱子中探索时间低于正常组小鼠,且差异有统计学意义 [(81.69±6.13)s vs. (49.35±2.85)s,  $q = 12.06, P < 0.001, n = 8$ ],提示 VPA 组小鼠社交能力有所下降,表现出社交倾向性缺陷。经过腹腔注射 EGCG 后,与 VPA 组相比,VPA+EGCG 组小鼠在有社交对象 Stanger1 的箱子中探索时间高于 VPA 组小鼠,且差异有统计学意义 [(49.35±2.85)s vs. (97.61±11.27)s,  $q = 17.99, P <$

0.001,  $n = 8$ ],提示 VPA+EGCG 组小鼠社交能力逐渐恢复正常。社会交往指数 SI 结果显示,三组间小鼠社会交往指数 SI 数值差异有统计学意义 ( $F = 24.74, P < 0.001$ )。与正常组小鼠相比,VPA 组小鼠对于有社交对象的箱体和无社交对象的箱体未表现出显著的偏好 ( $2.25 \pm 0.34$  vs.  $1.30 \pm 0.14, q = 9.20, P < 0.001, n = 8$ ),经过腹腔注射 EGCG 后,与 VPA 组相比,VPA+EGCG 组小鼠在有社交对象的箱体和没有社交对象的箱体表现出显著的偏好行为 ( $1.30 \pm 0.14$  vs.  $2.11 \pm 0.34, q = 7.88, P < 0.001, n = 8$ ),提示 VPA 组小鼠表现出明显的社交倾向性障碍,而 EGCG 的长期腹腔给药可改善 VPA 组小鼠的这种社交倾向性障碍表现。见图 2。

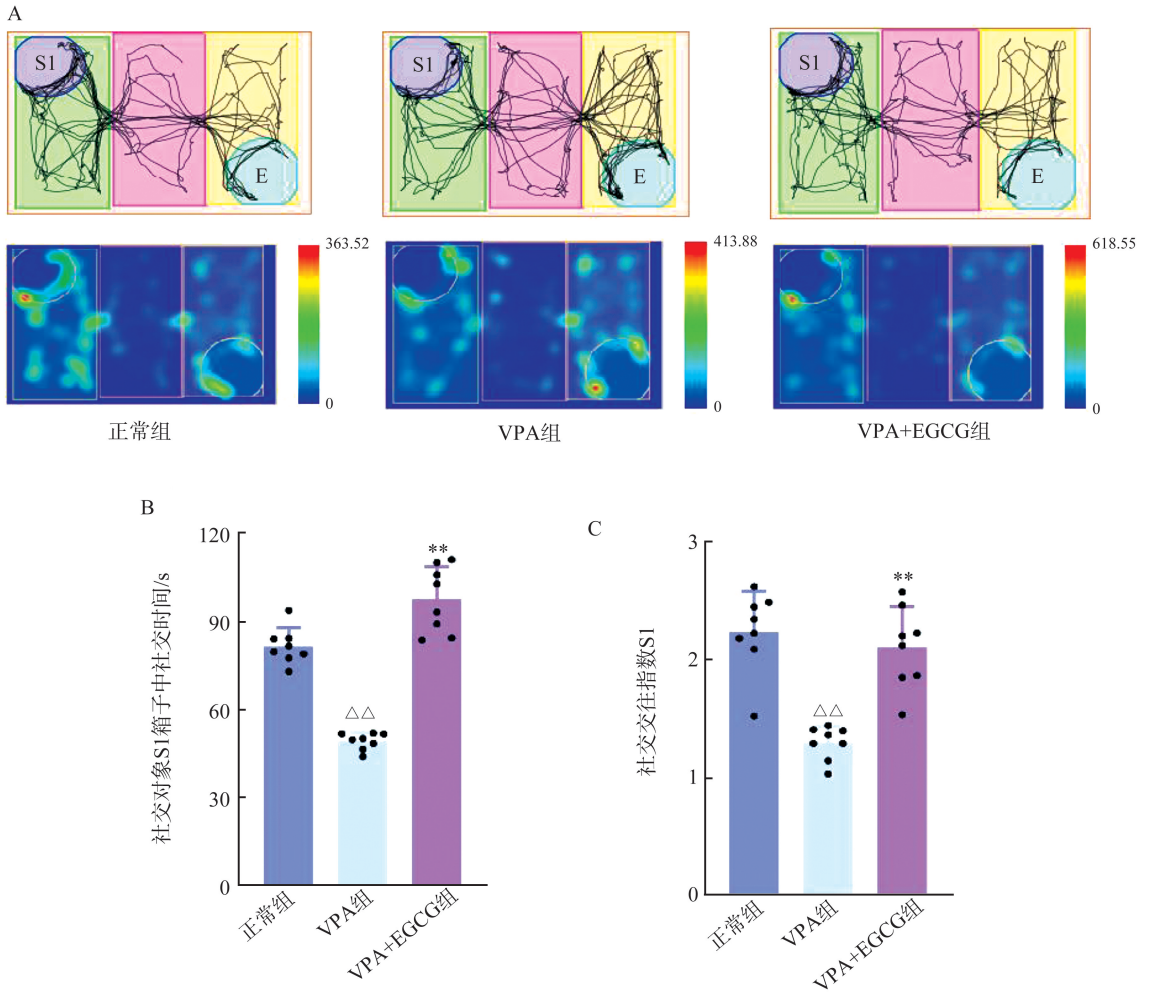


图2 三箱社交实验社交倾向性测试实验结果

A: 三箱社交实验第一阶段社交倾向性测试阶段运动轨迹图和热图(S1:有社交对象的箱体;E:无社交对象的箱体); B:小鼠在有社交对象S1的箱子中的探索时间; C:社会交往指数SI。 $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. 正常组; \*\* $P < 0.01$  vs. VPA组。

Figure 2 Results from the three-chamber sociability test

A: Representative track plots and heatmaps of social testing (Phase 1) in the three-chamber sociability test (S1: Social stimulus chamber; E: Empty chamber); B: Exploration time in the social stimulus (S1) chamber; C: Social index (SI).  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. Control group; \*\* $P < 0.01$  vs. VPA group.

### 2.3 EGCG可改善VPA诱导子代孤独症小鼠新奇社交偏好性缺陷

在三箱社交实验第三阶段,小鼠新奇社交偏好性测试期间,三组间小鼠在有陌生小鼠 Stanger2 箱子中的社交时间差异有统计学意义( $F = 13.27$ ,  $P < 0.001$ )。与正常组相比,VPA组小鼠在有陌生小鼠 Stanger2 箱子中的社交时间明显少于正常组小鼠,且差异有统计学意义[(95.68 ± 7.87) s vs. (63.00 ± 14.72) s,  $q = 6.94$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 8$ ];经过腹腔注射EGCG后,与VPA组相比,VPA+EGCG组小鼠在有陌生鼠 Stanger2 箱子中的社交时间明显增加,且差异有统计学意义[(63.00 ± 14.72) s vs. (88.43 ± 15.93) s,  $q = 5.40$ ,  $P = 0.028$ ,  $n = 8$ ]。但在第三阶段小鼠新奇社交偏好性测试期间,三组小鼠停留在两

个笼周区域的总时间之间差异无统计学意义( $F = 0.28$ ,  $P = 0.760$ ),同时,社会偏好指数SPI结果显示,三组间小鼠社会偏好指数SPI数值差异有统计学意义( $F = 5.96$ ,  $P = 0.009$ )。VPA组小鼠社会偏好指数SPI低于正常组小鼠(1.07 ± 0.53 vs. 2.15 ± 0.91,  $q = 4.65$ ,  $P = 0.014$ ,  $n = 8$ ),经过EGCG药物治疗后,与VPA组相比,VPA+EGCG组小鼠社会偏好指数SPI显著升高,且差异有统计学意义(1.07 ± 0.53 vs. 1.91 ± 0.45,  $q = 3.62$ ,  $P = 0.006$ ,  $n = 8$ )。提示三箱社交实验小鼠新奇社交偏好性测试期间,VPA组小鼠表现出明显的新奇社交偏好性缺陷,而EGCG的长期腹腔给药可改善VPA组小鼠的这种缺陷。见图3。

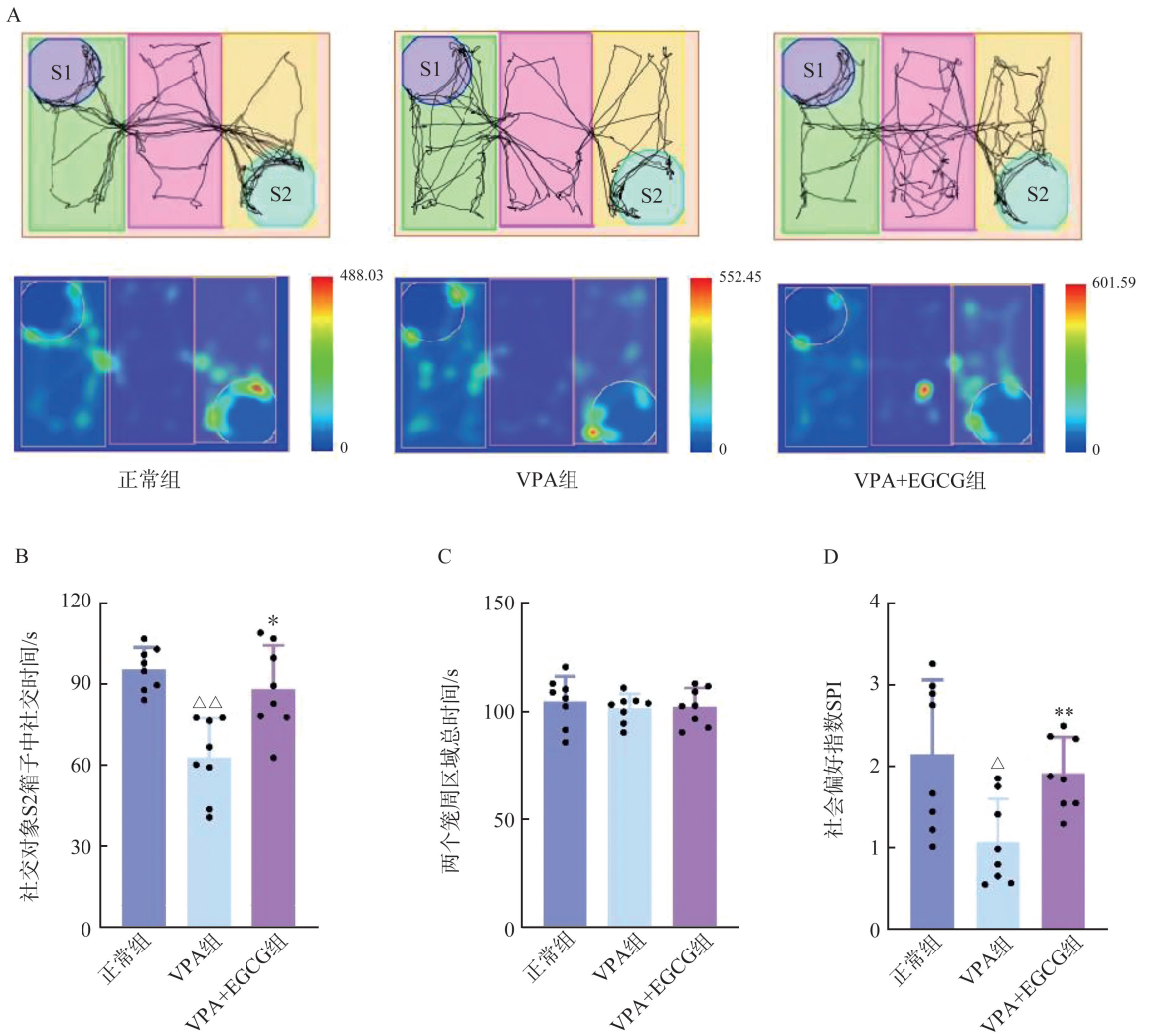


图3 三箱社交实验新奇社交偏好性测试实验结果

A: 三箱社交实验第二阶段新奇社交偏好性测试阶段运动轨迹图和热图 (S1: 有熟悉小鼠的箱体; S2: 有陌生小鼠的箱体); B: 小鼠在有陌生小鼠 S2 箱子中的社交时间; C: 小鼠停留在两个笼周区域的总时间; D: 社会偏好指数 SPI。<sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs. 正常组; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. VPA 组。

Figure 3 Results from the three-chamber social novelty preference

A: Representative track plots and heatmaps of social preference testing (Phase 2) in the three-chamber social novelty preference test (S1: Familiar mouse chamber; S2: Unfamiliar mouse chamber); B: Social interaction time in the social stimulus (S2) chamber; C: Total time spent in the proximity of the two cages was measured; D: Social preference index (SPI). <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs. Control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. VPA group.

### 2.4 EGCG 可改善 VPA 诱导子代孤独症小鼠自发活动和探索活动缺陷

旷场实验中, 3 组间小鼠进入中心区域的次数差异有统计学意义 ( $F = 9.32, P = 0.001$ )。与正常组相比, VPA 组小鼠进入中心区域的次数明显减少, 且差异有统计学意义 ( $22.40 \pm 4.98$  vs.  $14.25 \pm 2.31, q = 6.05, P < 0.001, n = 8$ ), 经过腹腔注射 EGCG 后, 与 VPA 组相比, VPA+EGCG 组小鼠进入中心区域的次数增加, 且差异有统计学意义 ( $14.25 \pm 2.31$  vs.  $19.20 \pm 3.62, q = 3.72, P = 0.005, n = 8$ ); 同时, 3 组小鼠在中心区域活动的时间 ( $F = 14.60, P < 0.001$ )、中心区域活动的距离 ( $F = 13.54, P < 0.001$ )、旷场勘探

指数 OFEI ( $F = 45.75, P < 0.001$ ) 差异有统计学意义。与 Control 组相比, VPA 组小鼠在中心区域的时间 [ $(40.24 \pm 8.99)$  s vs.  $(22.53 \pm 3.63)$  s,  $q = 7.16, P < 0.001, n = 8$ ]、中心区域活动的距离 [ $(309.79 \pm 46.60)$  cm vs.  $(193.21 \pm 36.59)$  cm,  $q = 7.13, P < 0.001, n = 8$ ] 以及旷场勘探指数 OFEI ( $0.20 \pm 0.03$  vs.  $0.09 \pm 0.02, q = 12.19, P < 0.001, n = 8$ ) 均减少, 提示 VPA 组小鼠在接触新异环境时明显表现出焦虑现象, 存在自发运动和自主探索行为的缺陷。经过腹腔注射 EGCG 后, VPA + EGCG 组小鼠中心区域活动的时间 [ $(22.53 \pm 3.63)$  s vs.  $(37.12 \pm 7.27)$  s,  $q = 5.90, P = 0.001, n = 8$ ]、中心区域活动的距离 [ $(193.21 \pm 36.59)$  cm

vs.  $(277.28 \pm 53.90)$  cm,  $q = 5.14, P = 0.021, n = 8$ ] 以及旷场勘探指数 OFEI ( $0.09 \pm 0.02$  vs.  $0.19 \pm 0.02$ ,  $q = 11.18, P < 0.001, n = 8$ ) 均增加, 且差异有统计学

意义。提示在旷场实验中, 经过腹腔注射 EGCG 可减轻 VPA 诱导子代 ASD 小鼠在新异环境中紧张焦虑的状态, 促进小鼠自发活动和探索活动。见图 4。

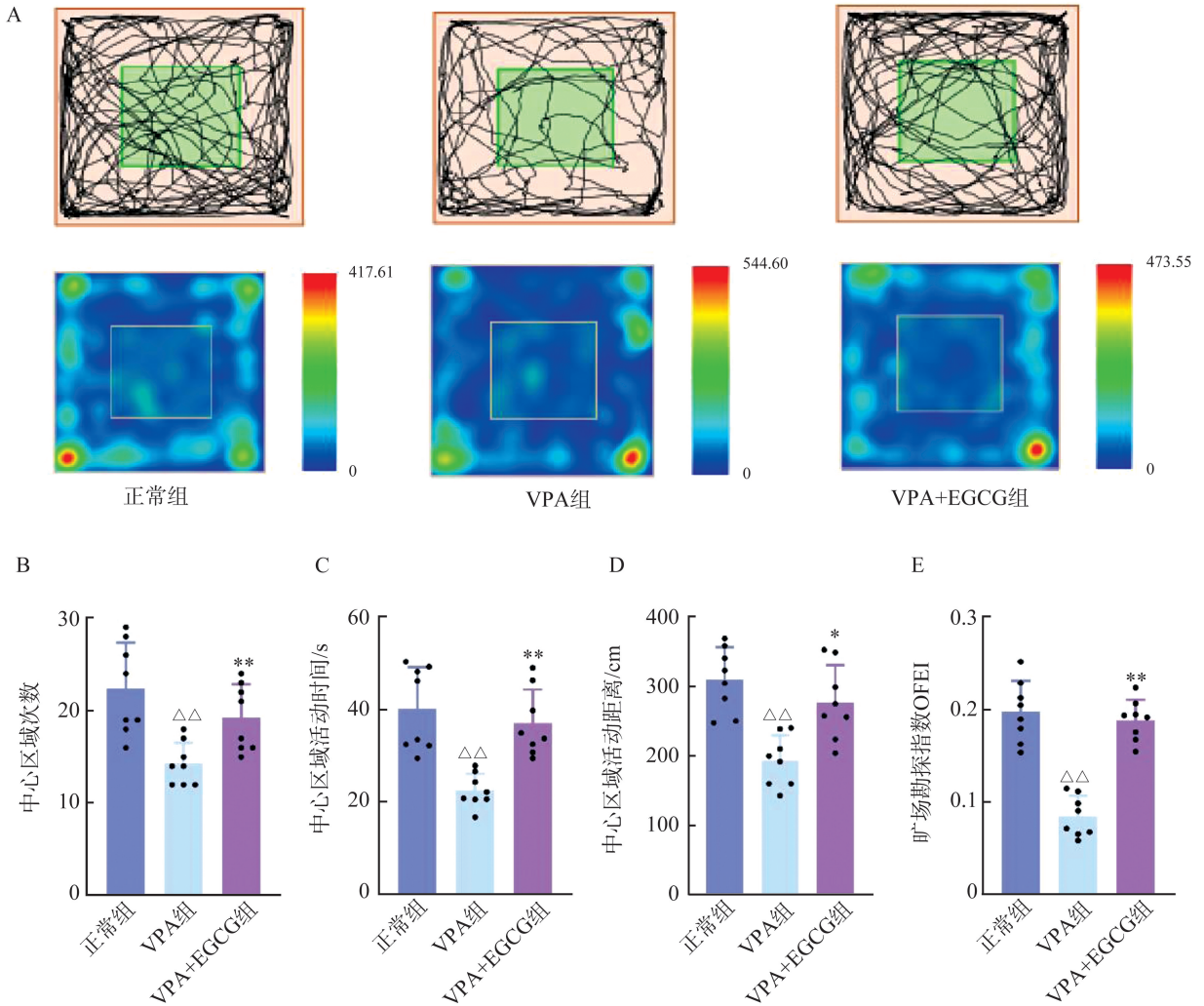


图 4 旷场实验在新异环境中自主探索行为和焦虑测试实验结果

A: 旷场实验小鼠运动轨迹图和热图; B: 小鼠进入中心区域的次数; C: 小鼠在中心区域活动的时间; D: 小鼠在中心区域活动的距离; E: 旷场勘探指数 OFEI.  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. 正常组;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs. VPA 组。

Figure 4 Results from the autonomous exploratory behavior and anxiety in the open field test under a novel environment

A: Representative track plots and heatmaps in the open field test; B: Center entries OFT; C: Inner area time; D: Inner area distance; E: Open field exploration index.  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. Control group;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  vs. VPA group.

## 2.5 EGCG 可改善 VPA 诱导子代孤独症小鼠焦虑程度

高架十字迷宫实验中, 3 组间小鼠在开放臂活动的时间百分比 ( $F = 5.04, P = 0.016$ )、开放臂活动的次数百分比 ( $F = 6.94, P = 0.005$ ) 差异有统计学意义。与正常组相比, VPA 组小鼠在开放臂活动的时间百分比 ( $0.44 \pm 0.05$  vs.  $0.30 \pm 0.09, q = 4.16, P = 0.020, n = 8$ )、开放臂活动的次数百分比 ( $0.51 \pm 0.075$  vs.  $0.36 \pm 0.08, q = 4.90, P < 0.001, n = 8$ ) 均明显

减少, 且差异有统计学意义, 提示 VPA 组小鼠表现出更高的焦虑。经过腹腔注射 EGCG 后, 与 VPA 组相比, VPA+EGCG 组小鼠在开放臂活动的时间百分比 ( $0.30 \pm 0.09$  vs.  $0.42 \pm 0.12, q = 3.54, P = 0.044, n = 8$ )、开放臂活动的次数百分比均明显减少, 且差异有统计学意义 ( $0.36 \pm 0.08$  vs.  $0.49 \pm 0.11, q = 4.13, P = 0.021, n = 8$ ), 提示, 经过腹腔注射 EGCG 可减轻 VPA 诱导子代 ASD 小鼠的焦虑程度。见图 5。

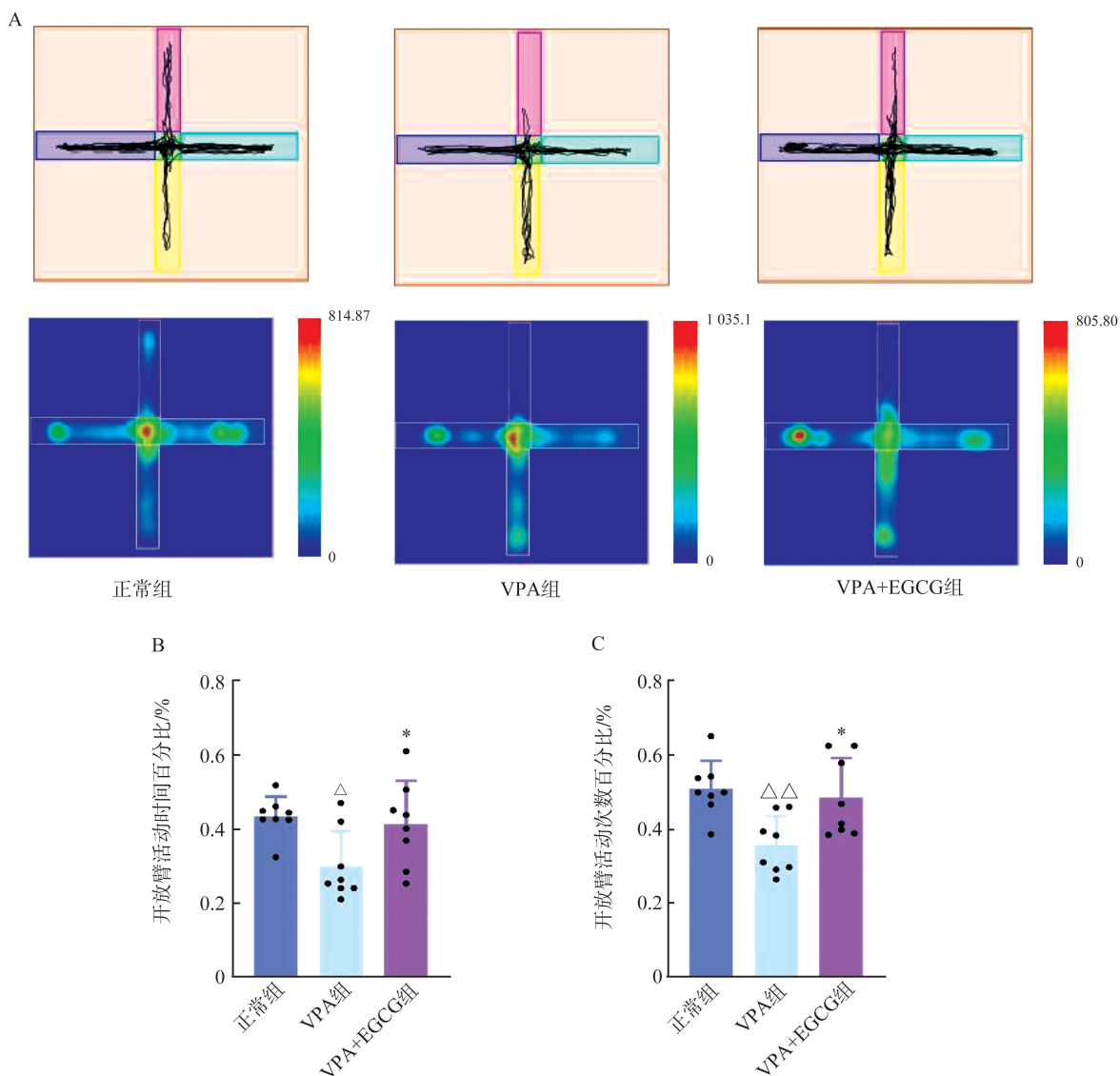


图5 高架十字迷宫实验对小鼠焦虑程度测试实验结果

A: 高架十字迷宫实验小鼠运动轨迹图和热图; B: 小鼠在开放臂活动的时间百分比; C: 小鼠在开放臂活动的次数百分比。 $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. 正常组; \* $P < 0.05$  vs. VPA组。

Figure 5 Results from the anxiety-like behavior in the elevated plus maze (EPM) test

A: Representative track plots and heatmaps in the open field test; B: The percentage of time spent in the open arms; C: The percentage of entries into open arms.  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. Control group; \* $P < 0.05$  vs. VPA group.

## 2.6 EGCG可改善VPA诱导子代孤独症小鼠新物体识别偏好和记忆能力缺陷

在新物体识别实验中,在第二阶段中,三组间小鼠进入两个新物体区域的总时间差异有统计学意义( $F = 11.94, P < 0.001$ )。VPA组小鼠进入两个新物体区域的总时间少于正常组小鼠[(215.51±17.75) s vs. (152.21±20.61) s,  $q = 5.88, P < 0.001, n = 8$ ],经过腹腔注射EGCG后,与VPA组相比,VPA+EGCG组小鼠进入两个新物体区域的总时间增加[(152.21±20.61) s vs. (217.63±45.14) s,  $q = 6.08, P < 0.001, n = 8$ ],且差异有统计学差异。在第三阶段测试阶段中,将其中一个物体替换成一个新的未知物体,三组间小鼠进入新物体区域的时间差异有统计学意义

( $F = 39.25, P < 0.001$ )。VPA组小鼠进入新物体区域的时间明显少于正常组小鼠[(155.80±26.07) s vs. (70.36±8.11) s,  $q = 11.90, P < 0.001, n = 8$ ],经过腹腔注射EGCG后,与VPA组相比,VPA+EGCG组小鼠进入新物体区域的时间有所增加,且差异有统计学意义[(70.36±8.11) s vs. (137.41±22.16) s,  $q = 9.34, P < 0.001, n = 8$ ]。此外,新奇物体辨别系数DI是反映小鼠的识别记忆和对新物体的偏好能力,结果显示,3组间小鼠新奇物体辨别系数DI差异有统计学意义( $F = 17.01, P < 0.001$ )。与正常组相比,VPA组小鼠新奇物体辨别系数DI显著低于正常组小鼠(79.89±9.32 vs. 53.63±9.10,  $q = 8.24, P < 0.001, n = 8$ ),经过腹腔注射EGCG后,与VPA组相比,

VPA+EGCG组小鼠新奇物体辨别系数DI有所增加,且差异有统计学意义( $53.63 \pm 9.10$  vs.  $67.71 \pm 8.59$ ,  $q=4.42$ ,  $P=0.014$ ,  $n=8$ )。提示,经过腹腔注

射EGCG可改善VPA诱导子代ASD小鼠对新物体识别偏好和记忆能力缺陷的影响。见图6。

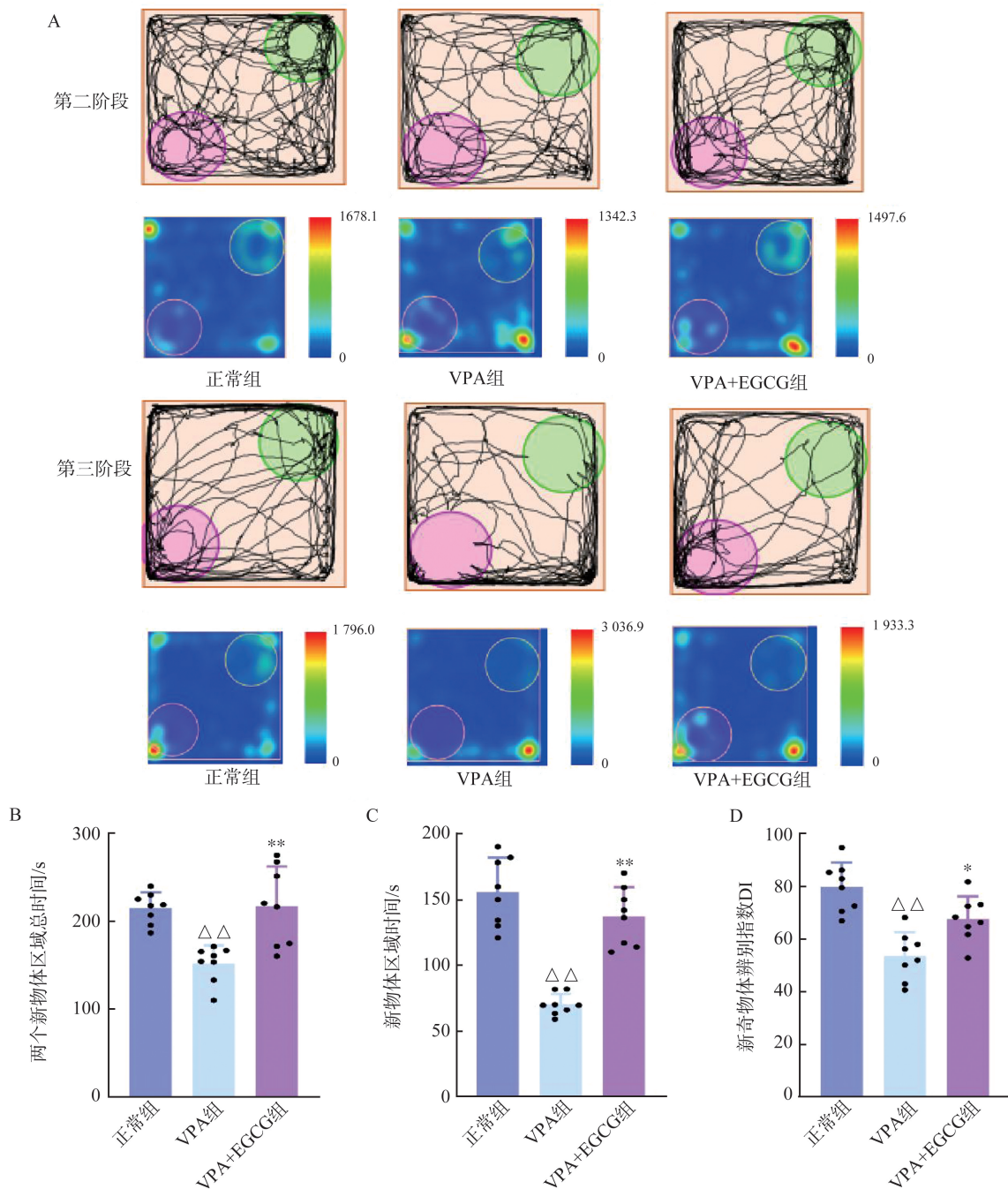


图6 新物体识别实验对环境中新引入物体的识别和记忆能力测试实验结果

A: 新物体识别实验小鼠运动轨迹图和热图; B: 第二阶段小鼠进入两个新物体区域的总时间; C: 第三阶段小鼠进入新物体区域的时间; D: 新奇物体辨别系数DI。 $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. 正常组; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. VPA组。

Figure 6 Results from the novel object recognition (NOR) paradigm evaluate the recognition and memory of novel objects introduced into the environment

A: Representative track plots and heatmaps of the novel object recognition test; B: Total sniffing time in the two novel object areas; C: Sniffing time in the novel object areas; D: Discrimination index (DI).  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. Control group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. VPA group.

### 2.7 EGCG可缓解VPA诱导子代孤独症小鼠空间学习记忆功能障碍

在Morris水迷宫实验中,在为期5天的定位航行实验中,3组间小鼠逃避潜伏期时间差异有统计学意义( $F_{组间}=7.17, P=0.004; F_{时间}=100.10, P<0.001; F_{交互}=2.48, P=0.018$ )。与正常组相比,第1天至第3天VPA组小鼠逃避潜伏期时间有缩短的趋势,但差异无统计学意义,第4天至第5天,VPA组与正常组小鼠相比逃避潜伏期时间延长,且差异有统计学意义[第4天:( $48.88\pm 4.00$ )s vs. ( $61.27\pm 2.94$ )s,  $q=3.79, P=0.023, n=8$ ;第5天:( $31.02\pm 2.10$ )s vs. ( $48.88\pm 2.43$ )s,  $q=5.47, P<0.001, n=8$ ]。腹腔注射EGCG后,与VPA组相比,VPA+EGCG组小鼠逃避潜伏期时间缩短,前3天逃避潜伏期时间差异无统计学意义,然而第4天和第5天逃避潜伏期时间缩

短,且差异有统计学意义[第4天:( $61.27\pm 2.94$ )s vs. ( $47.38\pm 3.93$ )s,  $q=4.25, P=0.022, n=8$ ;第5天:( $48.88\pm 2.43$ )s vs. ( $32.17\pm 2.93$ )s,  $q=5.12, P<0.001, n=8$ ]。

在第6天空间探索实验期间,3组间小鼠经过平台的次数差异有统计学意义( $F=16.93, P<0.001$ )。与正常组相比,VPA组小鼠经过平台的次数显著减少,且差异有统计学意义[( $3.88\pm 0.64$ )s vs. ( $1.75\pm 0.89$ )s,  $q=7.87, P=0.001, n=8$ ]。经过腹腔注射EGCG后,与VPA组相比,VPA+EGCG组小鼠经过平台的次数显著增加[( $1.75\pm 0.89$ )s vs. ( $3.38\pm 0.74$ )s,  $q=6.02, P=0.010, n=8$ ]提示,经过腹腔注射EGCG可缓解VPA诱导子代ASD小鼠对空间学习记忆功能障碍的影响。见图7。

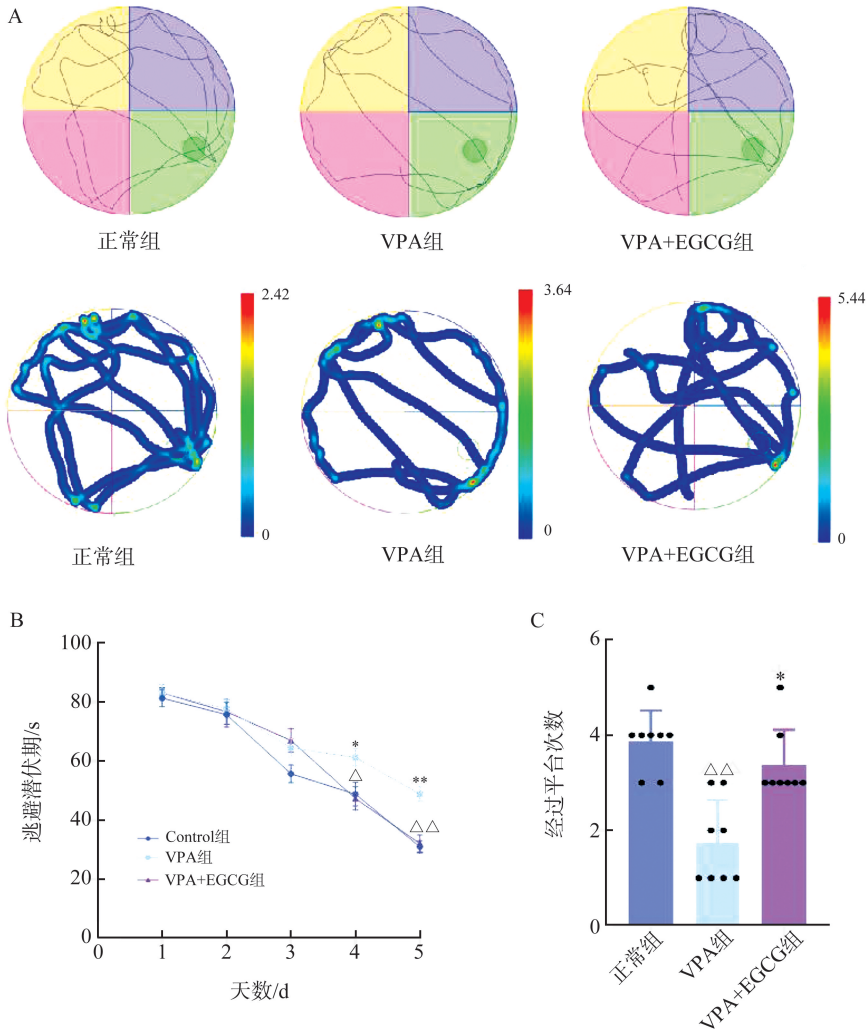


图7 Morris水迷宫实验对小鼠空间学习记忆能力测试实验结果

A: Morris水迷宫实验小鼠运动轨迹图和热图; B: 逃避潜伏期; C: 经过平台的次数。 $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$  vs. 正常组;  $*P<0.05, **P<0.01$  vs. VPA组。

Figure 7 Results from Morris water maze test on spatial learning and memory in mice

A: Representative track plots and heatmaps in the Morris water maze test; B: Escape latency; C: Number of platform crossings.  $\Delta P<0.05, \Delta\Delta P<0.01$  vs. Control group;  $*P<0.05, **P<0.01$  vs. VPA group.

### 3 讨论

ASD 包括一系列复杂的神经发育障碍,其特征是社交沟通和互动障碍以及重复的行为模式<sup>[2]</sup>。虽然孤独症的确切病因尚不清楚,但有迹象表明,它可能是由遗传、表观遗传和环境因素共同引起的<sup>[3]</sup>。临床研究证实怀孕期间服用 VPA 增加神经管缺陷(如腹裂和畸形)、发育迟缓、认知障碍和孤独症的发生率<sup>[7]</sup>。研究表明,ASD 的发生发展与小脑、边缘系统和脑干的神经元异常发育有关<sup>[8]</sup>。对小鼠模型的研究发现,小脑功能障碍足以引起小鼠产生与孤独症相关的行为缺陷<sup>[13-15]</sup>。小脑作为神经环路中的重要组成部分,不仅在调节运动协调和复杂的运动学习行为中起到关键作用,也在情绪行为和认知功能中发挥决定性的作用<sup>[16]</sup>。临床研究发现,许多 ASD 患者存在小脑畸形,包括小脑体积异常,浦肯野细胞形状和密度的改变,或小脑白质束的破坏<sup>[17]</sup>。浦肯野细胞作为小脑唯一的传出神经元,在整合信息传递过程中发挥中重要作用<sup>[18]</sup>。本研究通过对怀孕小鼠进行产前腹腔注射 VPA,通过 HE 染色和免疫荧光染色对小脑浦肯野细胞进行检测,发现 VPA 组小鼠小脑浦肯野细胞数量减少并且出现退行性改变。此外,有研究发现,怀孕关键时期暴露 VPA 扰乱神经发育机制会导致人类和啮齿动物出现类似孤独症样的行为<sup>[19]</sup>。因此,本研究进一步验证通过产前腹腔注射 VPA 后,其子代 ASD 小鼠孤独症样行为的表现,在三箱社交实验中,VPA 诱导子代孤独症小鼠出现明显的社交倾向缺陷和社交偏好障碍。

ASD 和焦虑症是高度共患疾病,患有 ASD 的儿童对焦虑症的易感性增加<sup>[20]</sup>。在旷场实验中,探究小鼠在新异环境中的自主探索行为及焦虑状态,观察到 VPA 组小鼠进入中间区域的次数、在中心区域活动的时间、距离以及旷场勘探指数均减少。为进一步检测小鼠的焦虑程度,在高架十字迷宫实验中,VPA 组小鼠在开放臂活动的时间和开放臂活动的次数均减少,提示 ASD 小鼠在接触新异环境时表现出明显焦虑现象,存在自发运动和自主探索行为的缺陷。临床研究发现,孤独症患者经常伴有因神经元突触传递功能异常引起的认知学习障碍、空间记忆损伤和智力低下,相关症状通常在 2~3 岁时出现,随着年龄的增长而慢慢加重<sup>[21]</sup>。在新物体识别实验中,观察到 ASD 小鼠对新物体的探索时间减少,表现出对新物体识别偏好能力差,记忆力减弱,

以及在 Morris 水迷宫实验中,观察到 VPA 小鼠逃避潜伏期延长,经过平台的次数减少,孤独症小鼠表现出空间学习记忆功能障碍。

临床上常规使用的治疗 ASD 的药物会导致严重的不良反应,因此从天然植物中寻找有效的抗孤独症成分受到越来越多研究者的关注。来自茶叶中的 EGCG 是茶叶中最主要的生物活性成分<sup>[22]</sup>,在痴呆大鼠模型中,服用 EGCG [10 mg/(kg·d),持续 1 个月]可逆转认知缺陷,并显著降低活性氧水平和促进一氧化氮的生成<sup>[23]</sup>,EGCG 还可以减轻脂多糖诱导的记忆障碍和神经元凋亡,同时可降低炎症细胞因子肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白细胞介素-1 $\beta$  和白细胞介素-6 的表达<sup>[24]</sup>。EGCG 通过多种途径发挥神经保护功能<sup>[12]</sup>,并且与其他抗氧化剂联合使用可以起到缓解情绪、治疗抑郁症的作用<sup>[25]</sup>。因此,探究 EGCG 对 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞病理学改变及行为学的影响成为本研究的重点。首先,通过腹腔注射 EGCG 后发现,EGCG 能够抑制 VPA 诱导子代 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞数量和病理学的改变;其次,明确了 EGCG 对 VPA 诱导的 ASD 小鼠行为异常的影响。在三箱社交实验中,经过 EGCG 治疗后的 ASD 小鼠社交倾向性障碍和社会偏好性缺陷均得到改善。在旷场实验和高架十字迷宫实验中,经过腹腔注射 EGCG 后可减轻 VPA 诱导子代 ASD 小鼠在新异环境中紧张焦虑的状态,促进小鼠自发活动和探索活动。在新物体识别实验中,EGCG 对 ASD 小鼠在环境中引入新物体识别和记忆能力也有积极的影响,在 Morris 水迷宫实验中,EGCG 可缓解 VPA 诱导子代 ASD 小鼠对空间学习记忆功能障碍的影响。综上所述,EGCG 能够减轻孤独症小鼠小脑浦肯野细胞退行性改变,并有效缓解孤独症样行为异常。基于此发现,靶向调控浦肯野细胞功能可能为孤独症治疗策略的创新提供重要理论依据。

研究发现,EGCG 与苯二氮卓类药物有相似的抗焦虑和健忘症作用,其通过激活  $\gamma$ -氨基丁酸 ( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 受体起到抑制自发性兴奋性突触传递<sup>[26]</sup>。小脑由特定的和高度规律的众多神经元环路组成,小脑中浦肯野细胞作为抑制性神经元,通过轴突末梢释放抑制性的神经递质 GABA,而小脑中的兴奋性神经元,在突触传递过程中其轴突末梢释放兴奋性神经递质,即谷氨酸 (glutamate, Glu)<sup>[27-28]</sup>。中枢神经系统的 E/I 平衡是通过谷氨酸为代表的兴奋性递质和以 GABA 为代表的抑制性递质发挥协同作用<sup>[29]</sup>。研究发现,谷氨酸能和 GABA 能神经传递异常在 ASD 的发病机

制中起到至关重要的作用, E/I 比值的改变被认为是孤独症潜在的病理机制<sup>[30-31]</sup>。因此, 本研究认为 VPA 诱导子代 ASD 小鼠小脑中神经递质表达失衡是其小脑行为活动异常的重要原因, EGCG 能否改善 E/I 失衡并进一步调节运动功能障碍是我们接下来研究的重点。

本研究在 EGCG 对 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞及行为学的影响方面取得初步成果, 研究表明, EGCG 可逆转 VPA 诱导子代 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞数量减少和病理学改变, 改善 ASD 小鼠的孤独症样行为障碍。但本研究局限在动物实验方面, 相关结论向临床方面转化仍存在诸多局限。据了解, 动物模型与人类 ASD 的临床异质性存在显著差异, 尽管妊娠期暴露于 VPA 后可诱导小鼠出现类似 ASD 患者的核心症状, 但由于临床 ASD 患者病因极为复杂, 涉及多基因突变及表观遗传调控异常<sup>[32-33]</sup>。本研究仅通过单一环境因素 VPA 构建模型, 尚不能完全涵盖临床 ASD 的多因素致病机制。因此, 后续研究需进一步构建基因-环境多因素模型(如 SHANK3 基因缺陷联合 VPA 暴露), 同时结合临床病例展开多方面综合研究, 推动基础研究向临床精准干预策略的转化。

综上所述, 本研究验证 EGCG 减轻 VPA 诱导子代 ASD 小鼠小脑浦肯野细胞数量和病理学改变, 改善 ASD 小鼠孤独症样行为障碍。

## 参考文献:

- [1] Roy M, Strate P. Autism spectrum disorders in adulthood—symptoms, diagnosis, and treatment [J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2023, 120(6): 87-93.
- [2] Lai MC, Lombardo MV, Baron-Cohen S. Autism [J]. *Lancet*, 2014, 383(9920): 896-910.
- [3] Hirota T, King BH. Autism spectrum disorder: a review [J]. *JAMA*, 2023, 329(2): 157-168.
- [4] Chen CM, Wu CC, Kim Y, et al. Enhancing social behavior in an autism spectrum disorder mouse model: investigating the underlying mechanisms of *Lactiplantibacillus plantarum* intervention [J]. *Gut Microbes*, 2024, 16(1): 2359501. doi: 10.1080/19490976.2024.2359501
- [5] Banji D, Banji OJF, Abbagoni S, et al. Amelioration of behavioral aberrations and oxidative markers by green tea extract in valproate induced autism in animals [J]. *Brain Res*, 2011, 1410: 141-151. doi: 10.1016/j.brainres.2011.06.063
- [6] Lord C, Brugha TS, Charman T, et al. Autism spectrum disorder [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2020, 6: 5. doi: 10.1038/s41572-019-0138-4
- [7] Kelly E, Meng FT, Fujita H, et al. Regulation of autism-relevant behaviors by cerebellar-prefrontal cortical circuits [J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(9): 1102-1110.
- [8] Cupolillo D, Hoxha E, Faralli A, et al. Autistic-like traits and cerebellar dysfunction in Purkinje cell PTEN knock-out mice [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2016, 41(6): 1457-1466.
- [9] Moreno-Rius J. Is there an “antisocial” cerebellum? Evidence from disorders other than autism characterized by abnormal social behaviours [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2019, 89: 1-8. doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.08.025
- [10] Serra D, Almeida LM, Dinis TCP. Polyphenols as food bioactive compounds in the context of Autism Spectrum Disorders: a critical mini-review [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2019, 102: 290-298. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.05.010
- [11] Valenti D, de Bari L, de Rasmio D, et al. The polyphenols resveratrol and epigallocatechin-3-gallate restore the severe impairment of mitochondria in hippocampal progenitor cells from a Down syndrome mouse model [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862(6): 1093-1104.
- [12] Singh BN, Shankar S, Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(12): 1807-1821.
- [13] Wang CY, Derderian KD, Hamada E, et al. Impaired cerebellar plasticity hypersensitizes sensory reflexes in SCN2A-associated ASD [J]. *Neuron*, 2024, 112(9): 1444-1455.
- [14] Wang RN, Tan JH, Guo JX, et al. Aberrant development and synaptic transmission of cerebellar cortex in a VPA induced mouse autism model [J]. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 500. doi: 10.3389/fncel.2018.00500
- [15] Han JK, Kwon SH, Kim YG, et al. Ablation of STAT3 in Purkinje cells reorganizes cerebellar synaptic plasticity in long-term fear memory network [J]. *eLife*, 2021, 10: e63291. doi: 10.7554/eLife.63291
- [16] Bai J, Ye T, Wei YB, et al. Opioid receptors modulate parallel fiber-Purkinje cell synaptic transmission in mouse cerebellum [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 770: 136356. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136356
- [17] Wang LL, Chen JH, Hu YL, et al. Progranulin improves neural development via the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway in the cerebellum of a VPA-induced rat model of ASD [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 114. doi: 10.1038/s41398-022-01875-4
- [18] Yang HM, Zhan LJ, Lin XQ, et al. Fentanyl inhibits air puff-evoked sensory information processing in mouse

- cerebellar neurons recorded in vivo[J]. *Front Syst Neurosci*, 2020, 14: 51. doi: 10.3389/fnsys.2020.00051
- [19] Wang JF, Cao Y, Hou WL, et al. Fecal microbiota transplantation improves VPA-induced ASD mice by modulating the serotonergic and glutamatergic synapse signaling pathways [J]. *Transl Psychiatry*, 2023, 13(1): 17. doi: 10.1038/s41398-023-02307-7
- [20] Diehl MM, Iruveda-Garcia JM, Morán-Sierra J, et al. Divergent projections of the prelimbic cortex bidirectionally regulate active avoidance [J]. *eLife*, 2020, 9: e59281. doi: 10.7554/eLife.59281
- [21] Wu JX, Zhang JL, Chen XL, et al. Microglial over-pruning of synapses during development in autism-associated SCN2A-deficient mice and human cerebral organoids [J]. *Mol Psychiatry*, 2024, 29(8): 2424-2437.
- [22] Li SY, Wang ZY, Liu G, et al. Neurodegenerative diseases and catechins: (-)-epigallocatechin-3-gallate is a modulator of chronic neuroinflammation and oxidative stress [J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1425839. doi: 10.3389/fnut.2024.1425839
- [23] Chen TT, Yang YF, Zhu SJ, et al. Inhibition of A $\beta$  aggregates in Alzheimer's disease by epigallocatechin and epicatechin-3-gallate from green tea [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 105: 104382. doi: 10.1016/j.bioorg.2020.104382
- [24] Lee YJ, Choi DY, Yun YP, et al. Epigallocatechin-3-gallate prevents systemic inflammation-induced memory deficiency and amyloidogenesis via its anti-neuroinflammatory properties [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(1): 298-310.
- [25] Singh NA, Mandal AKA, Khan ZA. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) [J]. *Nutr J*, 2016, 15(1): 60. doi: 10.1186/s12937-016-0179-4
- [26] Park KS, Oh JH, Yoo HS, et al. (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) reverses caffeine-induced anxiogenic-like effects [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 481(2): 131-134.
- [27] Johnson AJ, Shankland E, Richards T, et al. Relationships between GABA, glutamate, and GABA/glutamate and social and olfactory processing in children with autism spectrum disorder [J]. *Psychiatry Res Neuroimaging*, 2023, 336: 111745. doi: 10.1016/j.psychresns.2023.111745
- [28] Wang XN, Zhao ZQ, Guo JS, et al. GABAB1 receptor knockdown in prefrontal cortex induces behavioral aberrations associated with autism spectrum disorder in mice [J]. *Brain Res Bull*, 2023, 202: 110755. doi: 10.1016/j.brainresbull.2023.110755
- [29] 石岳, 朱波, 黄宇光. 兴奋-抑制失衡与孤独症谱系障碍: 作用机制及治疗进展 [J]. *协和医学杂志*, 2023, 14(4): 844-849.  
SHI Yue, ZHU Bo, HUANG Yuguang. Excitatory-inhibitory imbalance and autism spectrum disorder: mechanism and treatment progress [J]. *Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital*, 2023, 14(4): 844-849.
- [30] Lenart J, Augustyniak J, Lazarewicz JW, et al. Altered expression of glutamatergic and GABAergic genes in the valproic acid-induced rat model of autism: a screening test [J]. *Toxicology*, 2020, 440: 152500. doi: 10.1016/j.tox.2020.152500
- [31] Pietropaolo S, Provenzano G. Editorial: targeting excitation-inhibition imbalance in neurodevelopmental and autism spectrum disorders [J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 968115. doi: 10.3389/fnins.2022.968115
- [32] Salari N, Rasoulpoor S, Rasoulpoor S, et al. The global prevalence of autism spectrum disorder: a comprehensive systematic review and meta-analysis [J]. *Ital J Pediatr*, 2022, 48(1): 112. doi: 10.1186/s13052-022-01310-w
- [33] Wang L, Wang BQ, Wu CY, et al. Autism spectrum disorder: neurodevelopmental risk factors, biological mechanism, and precision therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 1819. doi: 10.3390/ijms24031819

(编辑:房红娟)