



重复经颅磁刺激通过影响神经元铁死亡和钙稳态改善阿尔茨海默病小鼠认知功能*

张蒙^{1,2)*} 张泽^{1,2)*} 付蕊^{1,2)} 任子豪^{1,2)} 丁冲^{1,2)***}⁽¹⁾ 河北工业大学生命科学与健康工程学院, 天津 300130; ⁽²⁾ 河北省生物电磁与神经工程重点实验室 (河北工业大学), 天津 300130

摘要 目的 重复经颅磁刺激 (repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS) 是一种非侵入性脑刺激技术, 为治疗阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 提供了一种非药物方法。研究表明, 铁死亡可促进 AD 的病理发生和发展, 而抑制神经元铁死亡可有效改善 AD 的认知障碍。钙离子 (Ca^{2+}) 稳态失衡与 AD 的病理密切相关, 并可通过多种途径驱动铁死亡的发生。本研究旨在探讨 rTMS 是否通过抑制神经元铁死亡或者维持钙稳态来改善 AD 小鼠认知障碍, 从而为 rTMS 在治疗 AD 中的应用奠定理论和实验基础。方法 APP/PS1 AD 小鼠分别经过 0.5 Hz 低频和 20 Hz 高频 rTMS 处理, 通过新物体识别和水迷宫实验评估治疗结果。利用酶联免疫吸附分析 (ELISA) 方法测定各组小鼠海马体中谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、 Fe^{2+} 的水平。使用 Erastin 诱导 HT-22 细胞铁死亡, 经过高低频磁刺激处理后, CCK-8 检测其细胞活性, Fluo-4 AM 检测其胞内钙离子浓度变化。结果 与正常小鼠相比, AD 小鼠表现出显著的认知能力下降, 同时铁死亡水平和胞内钙离子浓度显著升高。高频和低频 rTMS 治疗都能够显著改善 AD 小鼠认知障碍, 并且能够抑制 AD 小鼠神经元铁死亡和胞内钙离子异常增加。结论 高频和低频重复经颅磁刺激都能够有效改善 AD 小鼠认知功能障碍, 这种效应可能是通过改善铁死亡或细胞内钙离子失衡来实现的。

关键词 阿尔茨海默病, 重复经颅磁刺激, 铁死亡, 钙稳态, 认知功能

中图分类号 Q274

DOI: 10.16476/j.pibb.2025.0023

CSTR: 32369.14.pibb.20250023

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是老年人中最普遍的痴呆形式, 已构成重大的公共卫生挑战。目前, 缺乏能够阻止、改善或逆转与衰老相关的认知能力下降的理想治疗干预措施^[1]。因此, 解开学习和记忆退化的潜在机制并确定有效的治疗方法势在必行。

铁死亡是一种独特的细胞死亡形式, 与细胞凋亡、细胞坏死和自噬不同, 主要表现为铁依赖性的脂质过氧化^[2]。近年来, 铁死亡越来越被认为是神经系统疾病, 尤其是神经退行性疾病的潜在机制^[3]。研究发现, AD 患者大脑中存在铁沉积、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭和脂质过氧化, 表明铁死亡是导致 AD 进展的一个因素^[4]。使用去铁胺等药物可有效抑制神经元铁死亡, 消除脑内铁积累, 并且已被发现能减缓 AD 的进展^[5]。因此, 靶向铁死亡可能成为逆转 AD 发病过程中氧化损伤的一种有前景的方法^[6]。

钙离子 (Ca^{2+}) 作为体内第二信使之一, 是维持不同神经元功能的基础。 Ca^{2+} 参与大脑中的数据处理、记忆存储和突触可塑性等生理过程^[7]。神经元对 Ca^{2+} 稳态失衡高度敏感, Ca^{2+} 稳态在维持神经元功能中起着重要作用^[8]。研究表明, 神经元中持续的 Ca^{2+} 稳态紊乱是早期 AD 的原因之一^[9]。 Ca^{2+} 和铁在神经元铁死亡中均起着关键作用。它们共同参与活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 的产生、线粒体稳态和突触可塑性, 并可通过体内 ROS 信号相互作用。值得注意的是, 铁、 Ca^{2+} 和 ROS 信号之间的相互作用是双向的, 因为许多参

* 国家自然科学基金 (52077057, 52207251) 和河北省自然科学基金 (F2022202023) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 14722020113, E-mail: dingchong@hebut.edu.cn

收稿日期: 2025-01-15, 接受日期: 2025-04-27

与细胞抗氧化防御和ROS产生的蛋白质是 Ca^{2+} 依赖性的。铁诱导ROS增加,改变 Ca^{2+} 信号稳态^[10]。反过来, Ca^{2+} 失调通过大量产生脂质过氧化和谷氨酸抑制胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白系统(铁死亡调控的核心节点)来驱动铁死亡^[11-12]。有研究表明,胞质钙增加是铁死亡的标志,可被铁死亡特异性抑制剂铁抑素(ferrostatin-1, Fer-1)抑制^[13]。综合来看,铁死亡和钙稳态之间的联系密不可分,并且都在AD的发展机制中发挥着重要的作用。

重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)作为一种安全且无创的治疗方式在各种神经系统疾病的研究和治疗中获得了广泛的应用^[14-15],特别是应用于AD^[16-17]。rTMS通过向特定脑区施加序列化磁脉冲,实现对目标区域及其功能网络的瞬时调控。其在AD治疗方面的作用机制涉及两个层面:a.通过电磁感应改变神经元跨膜电位,调节皮层兴奋性阈值及同步化放电模式;b.通过长时程增强或抑制效应重塑突触传递效能。临床证据显示,rTMS干预可诱导神经元再生标志物表达上调,同时显著降低淀粉样前体蛋白裂解产物 $\text{A}\beta_{1-42}$ 的脑内沉积浓度,这些分子改变与认知功能改善呈显著相关性^[16, 18]。另外,频率通常被认为是rTMS调节兴奋性的关键决定因素^[19],在rTMS中,超过1 Hz的刺激被归类为高频,而低于1 Hz的刺激被认为是低频的^[20]。大量临床研究表明,rTMS对AD模型动物认知功能障碍具有改善作用,相较于临床研究中多用高频刺激,在AD模型动物的治疗中,低频和高频rTMS均表现出对AD导致的认知功能障碍的改善作用。Tan等^[21]和Zhang等^[22]发现,低频rTMS可改善AD模型鼠认知障碍。而Chen等^[23]和Choung等^[24]发现,低频和高频rTMS对注射 $\text{A}\beta$ 小鼠的空间工作记忆及感觉运动能力有积极作用。但相较于低频(1 Hz),高频(10 Hz和20 Hz)的干预效果更好。综上所述,在对rTMS改善AD模型鼠的认知障碍的研究中,发现高频rTMS和低频rTMS均有积极作用,但对于低频和高频的作用差异结论不一。

本研究采用APP/PS1双转基因AD模型小鼠,探究rTMS的神经保护机制。实验设计采用高频(20 Hz)与低频(0.5 Hz)两种rTMS干预方案,通过为期14 d的连续刺激,旨在揭示不同频率磁刺激通过调控铁死亡和钙稳态通路改善认知功能障碍的分子机制。研究结果表明,高频20 Hz和低频

0.5 Hz rTMS均能显著增强AD小鼠认知功能。酶联免疫吸附分析(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)检测试剂盒揭示了不同频率磁刺激均可抑制AD小鼠海马神经元铁死亡。进一步研究发现,胞内钙的激增参与了因Erastin诱导的细胞铁死亡,对海马神经细胞施加0.5 Hz和20 Hz的磁刺激之后,可以降低因细胞铁死亡导致的异常升高的胞内 Ca^{2+} 浓度。这些结果表明,rTMS可能通过抑制铁死亡改善AD小鼠认知障碍,其中调节机制还涉及细胞内钙稳态。

1 材料与方法

1.1 动物

C57因其品系稳定被广泛应用于构建病理动物模型及转基因实验动物模型。APP/PS1小鼠是以C57小鼠为遗传背景的携带人APP以及突变人早老蛋白1的双转基因AD模型小鼠^[25]。APP/PS1小鼠认知缺陷在3~12月内随着年龄的增加而显著加重^[26-27]。

在本研究中,采用24只雌性APP/PS1双转基因AD模型小鼠和8只雌性C57BL/6J小鼠,年龄4个月,体重25~30 g,来源于恒容生物科技(天津)有限公司。小鼠先接受1周的适应性饲养,饲养环境保持恒温(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,供应食物和饮用水,光照明/暗周期为12 h。经过适应性喂养后将AD模型小鼠随机分为AD+Sham组、AD+L rTMS组和AD+H rTMS组,C57BL/6J小鼠作为Control组,每组8只动物。该动物实验全部内容均根据中国相关指南和规定进行,由河北工业大学生物医学伦理委员会审批(编号:HEBUTaCUC2022028),且符合实验动物使用规范。

1.2 经颅磁刺激

在本实验中,选用的经颅磁刺激设备来自于武汉依瑞德科技有限公司,具体型号为CCY-IA型经颅磁刺激仪,配备的标准刺激线圈为适用于动物实验的圆形线圈,其几何尺寸规格如下:线圈横截面积为64 mm $\times$ 30 mm,外部直径为56 mm,内部空腔直径为14 mm,线圈的高度为23 mm。小鼠保持清醒并固定在一个专门设计的塑料圆柱体内。线圈与小鼠头部的中心对齐,平行于小鼠的颅骨。对于AD+L rTMS组,实验参数包括0.5 Hz的低频和0.3 T的刺激强度(线圈最大输出的14%,即2.2 T)。用500个脉冲/d进行刺激。AD+H rTMS组实验参数为20 Hz的高频和0.3 T的刺激强度,接收

500个脉冲/d, 连续 14 d。同时给予对照组和 Sham 组小鼠相应的伪刺激, 即线圈垂直翻转, 远离小鼠头部一定距离, 使小鼠听到刺激但不接收刺激。每

天早上 8:00~10:00 进行刺激。本研究实验设计的时间安排如图 1 所示。

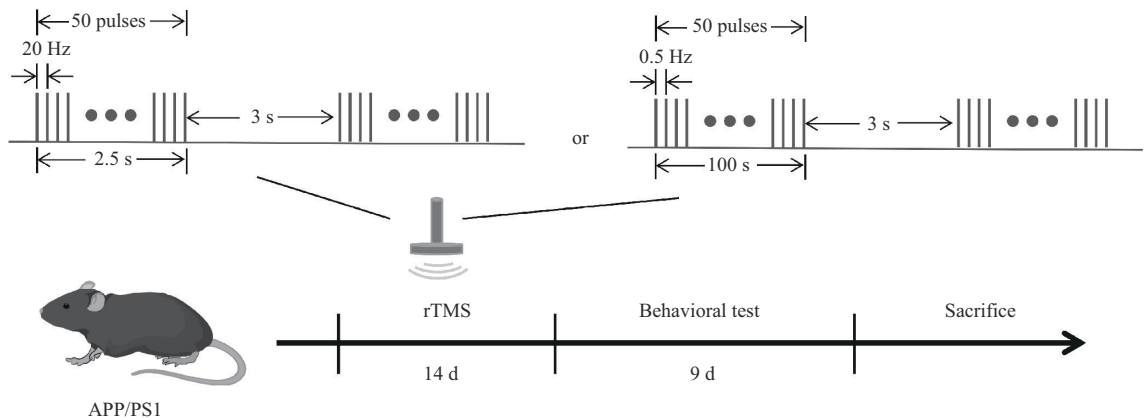


Fig. 1 The experimental timeline of rTMS treatment and behavioral tests

1.3 Morris水迷宫实验

在 rTMS 干预之后, 进行了 Morris 水迷宫实验, 水迷宫实验主要涵盖了定位航行和空间探索两个核心环节。首先, 在定位航行阶段, 实验自平台相对的象限起始, 将小鼠面向游泳池壁放入水中, 同步启动摄像跟踪系统, 系统将自动捕捉并记录小鼠自投入水中直至寻找到隐藏平台所需的时间, 即所谓的逃避潜伏期。依次对平台所在象限及邻近象限各执行 1 次训练, 持续 5 d。到了实验进程的第 6 天, 进入空间探索测试阶段。此刻, 隐藏平台已被移除, 实验依然从对侧象限起始, 小鼠面向泳池壁放入水中, 同时继续启用摄像跟踪系统。在 60 s 的时间窗口内, 系统详细记录小鼠在水中的游动轨迹。特别关注的包括小鼠在目标平台所在象限的停留总时长, 以及穿越原平台区域的次数, 这两项数据均由实验系统自动抓取并记录。

1.4 新物体实验

新物体识别实验 (novel object recognition experiment) 是经典啮齿类动物认知功能测试实验, 是模仿人类失忆症的测试发展起来的, 它依赖于啮齿类动物探索新事物的天性。新物体识别实验是一种常用于评估情景性陈述性记忆的行为测试, 它的优点是可以让动物在自然非应激状态下进行学习记忆测试, 模拟人类学习记忆行为, 便于修改, 可以检测学习和记忆的不同阶段, 也可以设置不同的间隔时间以评价短期和长期记忆 [28-29]。新物体

识别实验已广泛用于大小鼠和其他物种的认知功能测试。

实验所用新物体识别实验箱配制专用动物追踪摄像头, 并可使用配套的 Any-maze 行为跟踪软件完成对实验动物的实时运动轨迹追踪以及探索物体行为测定。实验箱箱体长宽高均为 40 cm, 软件设置追踪目标为小鼠头部, 自动识别小鼠在进入物体所在范围的探索时间, 并删除小鼠站于物体上向上探索的时间, 记为小鼠探测物体时间。新物体识别实验共分为 4 个阶段。a. 空箱适应期, 依次单独将小鼠放入空箱自由探索 20 min, 以便适应实验环境, 减少实验时小鼠应激性。b. 物体熟悉期, 空箱适应期 24 h 后, 在实验箱体底板一侧相邻位置放置两个相同的物体 (蓝色圆柱体), 将小鼠以面对物体对侧箱体方式放入箱子自由探索 10 min。c. 测试 I 期, 在物体熟悉期 1 h 后, 用一个新物体 (红色正方体) 代替右侧旧物体 (蓝色圆柱体), 将小鼠放入箱内自由探索测试 5 min, 记录小鼠运动轨迹、探索物体时间。d. 测试 II 期, 在测试 I 期结束 24 h 后, 用另一个新物体 (黄色三角体) 代替左侧旧物体 (蓝色圆柱体), 将小鼠放入箱内自由探索测试 5 min, 记录小鼠运动轨迹、探索物体时间。新物体识别实验流程如图 2 所示。在新物体识别实验的测试 I 期与测试 II 期阶段, 通过对每只小鼠的探索行为进行细致的视频追踪记录, 实验可以精准统计每只小鼠探索新物体的时间 T_1 与探索旧物体

的时间 T_2 , 计算得到测试 I 期与测试 II 期的认知指数 CI , 分别记为 $CI(1\text{ h})$ 与 $CI(24\text{ h})$ 。认知指数计算公式如下:

$$CI = T_1 / (T_1 + T_2)$$

式中 T_1 (s) 表示小鼠探索新物体的时间, T_2 (s) 表示探索旧物体的时间。

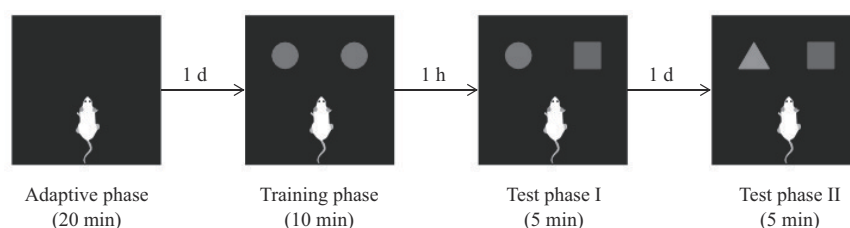


Fig. 2 Flow chart of the novel object recognition experiment

1.5 ELISA

实验动物完成行为学测试后, 采用颈椎脱臼法实施安乐死并立即进行脑组织取材。完整脑组织离体后迅速转移至预冷到 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 的解剖操作台, 在体视显微镜辅助下进行精细解剖, 重点分离双侧海马区组织。分离获得的样本经液氮速冻处理 45 s 后, 转移至预冷冻存管并密封, 随后转移至 -80°C 超低温冰箱长期保存, 所有操作需在冰上完成, 且全程操作时间控制在 3 min 内。

采用 ELISA 双抗夹心法检测各组小鼠海马组织中 GSH、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、组织铁、 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 含量以及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 具体操作参照试剂盒说明书进行 (BC1170; BC0025; BC4355; BC5415; BC0175; 北京索莱宝科技有限公司)。

1.6 细胞培养及分组

将购置于青旗生物技术发展有限公司的 HT-22 细胞 (一种小鼠海马神经元细胞) 接种于含胎牛血清 (FBS)、青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中, 并将细胞放置在含 5% CO_2 且湿度饱和的 37°C 细胞培养箱中进行培养。培养好的贴壁细胞被随机平均分成 3 组, 包括 Erastin+Sham 组、Erastin+L rTMS (0.5 Hz) 组和 Erastin+H rTMS (20 Hz) 组。正常细胞作为对照组。取对数生长期的 HT-22 细胞, 按 1×10^5 个/ml 细胞浓度根据实验需要接种至 96 孔板或 6 孔板中, 常规培养 24 h。吸弃上清液后, 向对照组加入等量完全培养基, Erastin+Sham 组予 20 $\mu\text{mol/L}$ Erastin 干预, Erastin+L rTMS 组予 20 $\mu\text{mol/L}$ Erastin+rTMS (0.5 Hz) 干预, Erastin+H rTMS 组予 20 $\mu\text{mol/L}$ Erastin+rTMS (20 Hz) 干

预。磁刺激参数同样采取强度为 0.3 T, 频率为 0.5 Hz 低频或 20 Hz 高频, 刺激脉冲数均为 500 个。初始刺激在细胞贴壁 8 h 后开始, 后续从随后每天早上开始, 持续 3 d。

1.7 细胞活力检测

细胞活力采用 CCK-8 试剂盒 (中国上海碧云天生物技术有限公司) 进行测定。具体步骤如下: 将 HT-22 细胞以 1×10^5 个细胞/孔的密度接种于含完全培养基的 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 分别加入不同浓度的铁死亡诱导剂 Erastin (0.1、1、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h。随后, 每孔加入 10 μl CCK-8 试剂, 于 37°C 、5% CO_2 培养箱中避光孵育 2 h, 实验操作严格遵循试剂盒说明书。最后, 使用多功能酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值 A 。筛选出 Erastin 的适宜作用浓度, 并使用该浓度开展后续干预实验。

1.8 钙离子荧光检测

Fluo-4 AM 工作液制备: 取储存液用 PBS 缓冲液稀释至终浓度 2 $\mu\text{mol/L}$ (现用现配, 避免反复冻融)。细胞处理流程: a. 吸弃原培养基, PBS 冲洗 3 次; b. 加入 100 μl Fluo-4 AM 工作液覆盖细胞层; c. 37°C 恒温培养箱中避光孵育 30 min 完成探针装载; d. PBS 洗涤 3 次后, 续孵 20 min 确保胞内酯酶充分水解乙酰氧甲基酯 (acetoxymethyl ester, AM 酯基); e. 使用多功能酶标仪 (激发波长 488 nm, 发射波长 520 nm) 检测荧光强度。数据处理: 通过测定各组 Fluo-4 AM 荧光强度 (F) 与对应样本的细胞活性吸光度值 (A), 计算比值 (F/A) 得到相对 Ca^{2+} 浓度, 消除细胞数量或活性差异带来的影响。

1.9 数据处理

通过单因素方差分析, 然后进行 Tukey 事后检验进行多重比较, 以治疗为主要因素, 对结果进行分析。多组定量数据的组间比较均通过双向方差分析 (two-way ANOVA) 处理, 当组间差异显著时 ($P<0.05$), 进一步采用 Tukey 事后检验进行多重比较以识别具体差异来源。数据分析使用 Origin 2018 和 GraphPad Prism 8.1 软件完成, 结果数据均以平均值 $\pm$ 标准差 (means $\pm$ SD) 呈现, 统计显著性阈值设定为 $P<0.05$ 。

2 结 果

2.1 rTMS对AD小鼠认知功能的影响

为了分析不同频率 rTMS 对 AD 模型小鼠识别

记忆的影响, 计算小鼠在测试 I 期和测试 II 期的新物体认知指数分析小鼠短期 (1 h) 和长期 (24 h) 识别记忆功能的变化。如图 3a 所示, 在新物体测试 I 期, AD+Sham 的认知指数显著低于对照组 ($P<0.05$) 和 AD+L rTMS 组 ($P<0.05$)。图 3b 显示, 在测试 II 期, AD+Sham 的认知指数与对照组 ($P<0.001$)、AD+LrTMS 组 ($P<0.001$) 和 AD+HrTMS 组 ($P<0.001$) 相比均明显下降。新物体识别实验数据分析结果显示, AD 模型小鼠的认知指数相较于健康对照组小鼠呈现显著下降的趋势。不论是采用高频 rTMS 还是低频 rTMS 手段, 都可以显著改善 AD 模型小鼠的短期与长期识别记忆的损伤, 且这两种不同频率的磁刺激方式在改善效果上并无显著区别。

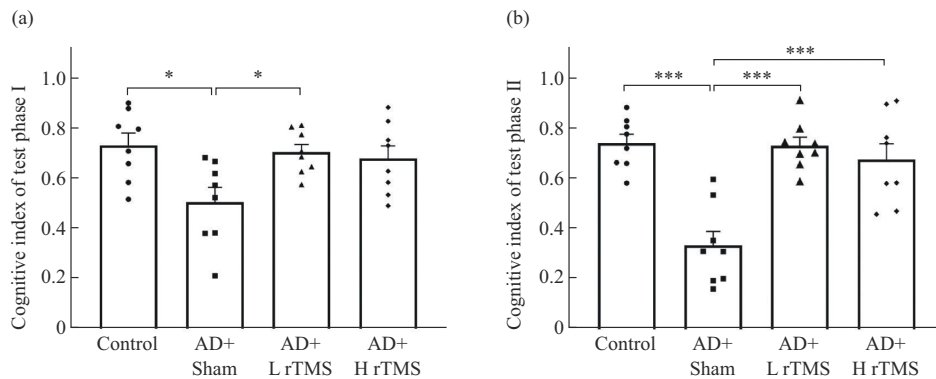


Fig. 3 Cognitive index of novel object recognition test

(a) Cognitive index of test phase I. (b) Cognitive index of test phase II. * $P<0.05$, *** $P<0.001$; $n=8$.

在 Morris 水迷宫测试中 (图 4a), 随着训练天数的增加, 各组的逃避潜伏期逐渐缩短, 呈现不同水平的学习和记忆能力。对逃避潜伏期的统计分析显示, 治疗因素 ($F(3, 140)=19.10$, $P<0.001$) 和时间因素 ($F(4, 140)=25.98$, $P<0.001$) 均存在显著的主因子效应。主因子之间的交互作用未发现显著性 ($F(12, 140)=1.564$, $P=0.1089$)。这一观察结果强调了治疗因素和时间因素对逃避潜伏期的独立影响。值得注意的是, AD+Sham 组逃避潜伏期缩短速率显著低于其他组别 (图 4a), 表明 AD 病理显著损害空间学习进程。图 4b 显示了各组小鼠测试期全程运动轨迹图, AD+Sham 组首次抵达平台的潜伏期显著长于对照组 ($P<0.001$)、AD+H rTMS 组 ($P<0.001$) 及 AD+L rTMS 组 ($P<0.001$) (图 4c)。空间探索阶段进一步揭示: 对照

组小鼠在目标平台区域的停留时间较 AD+Sham 组延长 ($P<0.001$, 图 4d); AD+Sham 组目标象限停留时间占比显著低于对照组 ($P<0.001$)、AD+H rTMS 组 ($P<0.001$) 及 AD+L rTMS 组 ($P<0.001$) (图 4e); 对照组与 AD+L rTMS 组小鼠穿越平台次数显著高于 AD+Sham 组 ($P<0.05$, 图 4f)。上述结果表明, AD+Sham 组呈现显著的空间记忆检索障碍, 其行为学缺陷与海马依赖性记忆损伤特征一致, 高/低频 rTMS 干预均能有效逆转 AD 小鼠的学习记忆损伤, 其中 AD+L rTMS 组在逃避潜伏期缩短速率 (图 4a) 及目标象限探索偏好 (图 4e) 等指标上表现出与对照组相当的行为模式。综合各参数, 低频 rTMS 对空间记忆的改善效应更为显著, 提示其可能通过特定神经可塑性机制发挥作用。

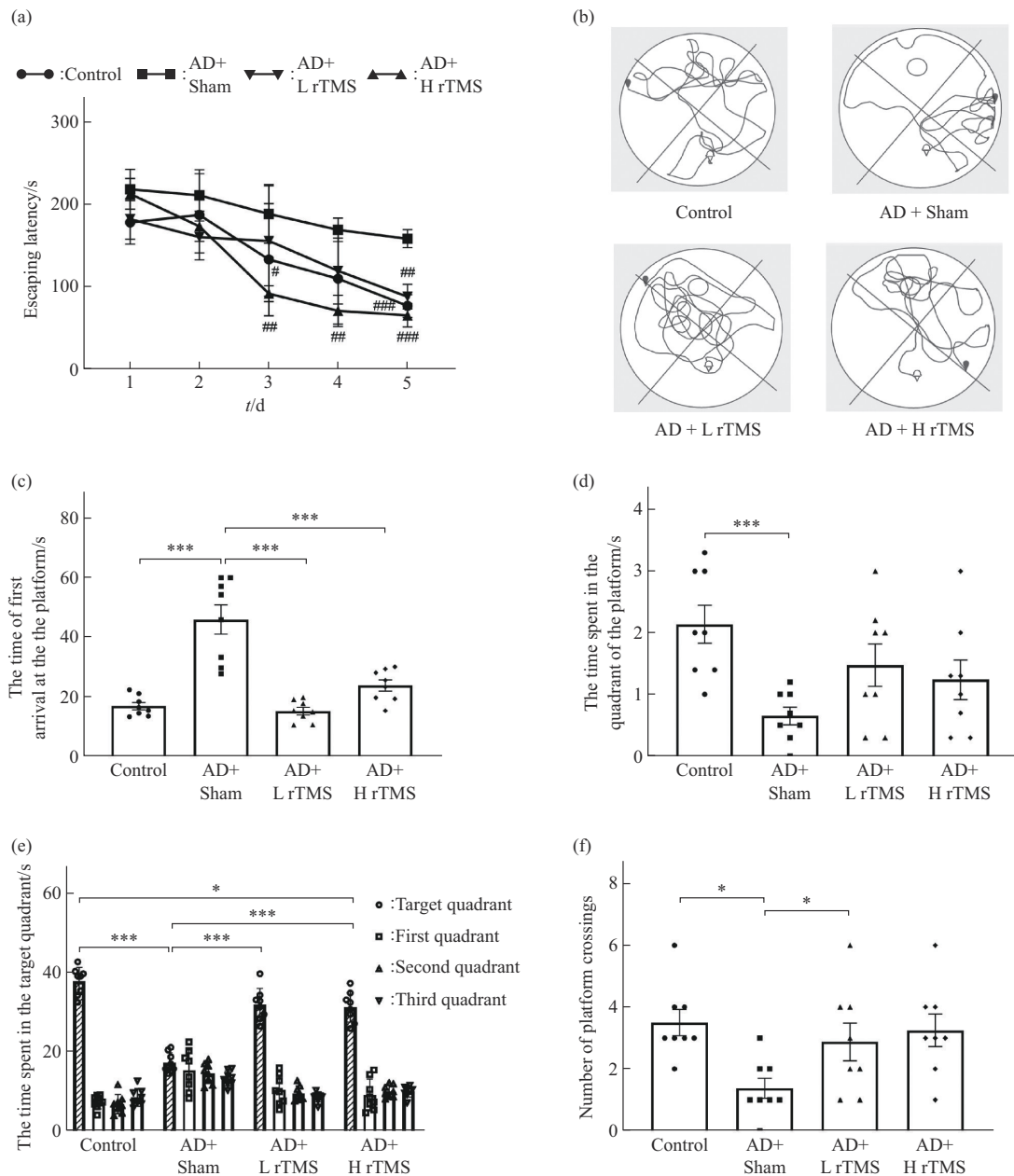


Fig. 4 Data analysis of Morris water maze test

(a) Alterations in the escaping latency of all mouse groups during the 5-day training phase. (b) Trajectory plot of the test phase. (c) The time of first arrival at the platform. (d) Time spent in the quadrant of the platform. (e) Time spent in the target quadrant. (f) Number of platform crossings. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n=8$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs AD+Sham, $n=8$.

2.2 rTMS对海马内细胞铁死亡水平的影响

AD+Sham组的GSH含量显著低于对照组 ($P < 0.01$)、AD+L rTMS ($P < 0.05$) 和 AD+H rTMS ($P < 0.05$), 其余3组之间无显著性差异 (图5a)。AD+Sham组的MDA含量显著高于对照组 ($P < 0.001$)、AD+H rTMS组 ($P < 0.05$) 和 AD+L rTMS组 ($P < 0.01$), AD+L rTMS组和对照组之间无显著

性差异, 并且都显著低于AD+H rTMS组 ($P < 0.05$) (图5b)。AD+Sham组海马组织的SOD活性显著低于对照组 ($P < 0.001$)、AD+H rTMS组 ($P < 0.05$) 和 AD+L rTMS组 ($P < 0.05$) (图5c)。各组之间的海马组织 Fe^{2+} 含量没有显著性差异, 各组之间海马内 Fe^{3+} 含量变化趋势与总铁元素含量的变化趋势相同。即AD+Sham组的海马铁元素含量显著

高于其他3组 ($P<0.001$), 3组之间无显著性差异 (图5d)。综上所述, 不同频率磁刺激抑制了AD小

鼠海马神经元细胞铁死亡。

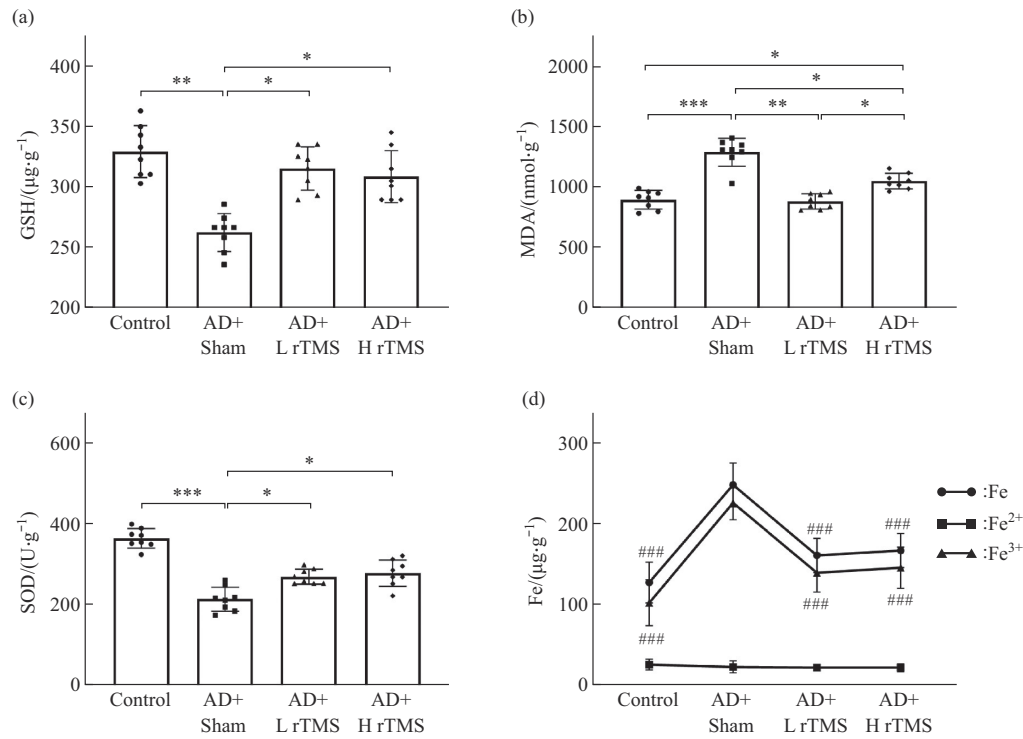


Fig. 5 rTMS treatment reduced iron levels and oxidative stress markers

(a) GSH concentration in the hippocampus tissue of mice. (b) MDA concentration in the hippocampus tissue of mice. (c) SOD concentration in the hippocampus tissue of mice. (d) Iron concentration in mouse hippocampal tissue. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; ### $P<0.001$ vs AD+Sham; $n=3$.

2.3 rTMS对HT-22细胞铁死亡的影响

如图6a所示, 分析加入不同浓度 Erastin 诱导剂后, HT-22细胞活性在72 h内的变化趋势。各组细胞活性在24 h后, 开始大幅度增长, 与细胞的快速增殖有着密切联系。加入含0.1、1和10 $\mu\text{mol/L}$ Erastin铁死亡诱导剂培养基的细胞, 与正常细胞的细胞活性变化曲线紧密贴合, 不能看出明显的差异性。20 $\mu\text{mol/L}$ ($P<0.001$) 和30 $\mu\text{mol/L}$ 组 ($P<0.001$) 和正常细胞活性的差异明显, 但30 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞活性过于低, 几乎在72 h内没有发生改变, 也不满足整体实验需求。相比之下, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞活性曲线, 更适合实验需求。因此, 最终确定在培养基中加入20 $\mu\text{mol/L}$ Erastin铁死亡诱导剂进行下面实验。

基于实验数据的分析表明 (图6b), 在干预24 h后, 低频 (L rTMS) 和低频 (H rTMS) 刺激均显示出对正常 HT-22细胞增殖活性的显著促进作用 ($P<0.001$), 其中低频刺激组较高频刺激组表现

出更显著的促增殖效应 ($P<0.001$)。值得注意的是, 在持续干预至48 h阶段, 各组细胞活性已达到顶峰。铁死亡诱导联合干预组的数据显示 (图6c): 在24 h和48 h时间点, 正常对照组 ($P<0.001$) 和Erastin+L rTMS组 ($P<0.001$) 的细胞活性均显著高于Erastin+Sham对照组。Erastin+L rTMS组细胞活性在48 h时显著高于Erastin+H rTMS组 ($P<0.001$) 和Control组 ($P<0.01$)。综合实验结果表明, 不同频率的rTMS干预均能有效改善铁死亡相关的细胞活性抑制, 其中低频刺激展现出更优的时间效应关系和干预效果。

2.4 rTMS对HT-22细胞钙离子浓度的影响

如图7a所示, Control+L rTMS组 ($P<0.001$) 和Control+H rTMS组 ($P<0.001$) 的胞内 Ca^{2+} 含量显著低于Control组, 提示磁刺激可以显著影响正常 HT-22细胞内 Ca^{2+} 水平。该效应与文献报道的rTMS通过电压门控钙通道 (VGCCs) 调控基础钙水平机制相符^[30]。在铁死亡诱导模型中

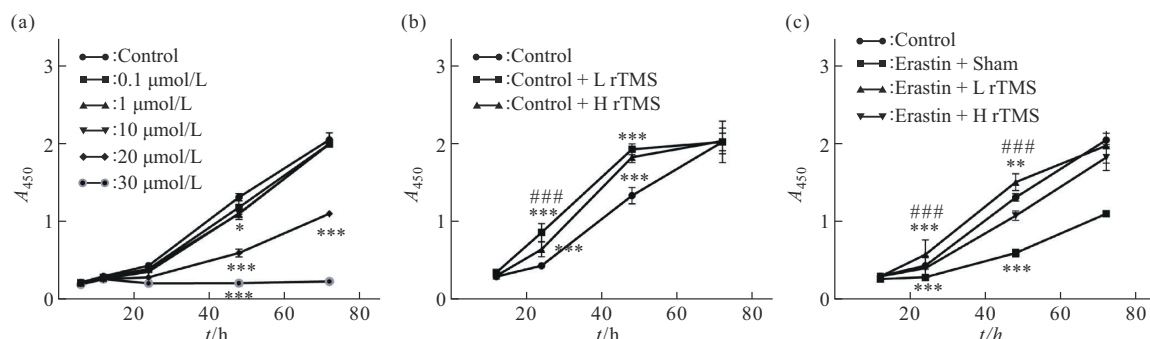


Fig. 6 Effect of rTMS on cell activity

(a) Pre-experiment to determine the concentration of erastin. (b) Effect of rTMS on normal cell viability. (c) Effect of rTMS on ferroptosis cell activity. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control; ### $P < 0.001$ Control+L rTMS vs Control+H rTMS (b) and Erastin+L rTMS vs Erastin+H rTMS (c).

(图7b), Erastin+L rTMS组 ($P < 0.001$) 和 Erastin+H rTMS组 ($P < 0.001$) 在12 h时胞内 Ca^{2+} 浓度显著低于Erastin+Sham组和对照组。Erastin+L rTMS组 ($P < 0.001$)、Erastin+H rTMS组 ($P < 0.001$) 和对照

组 ($P < 0.001$) 在24 h时胞内 Ca^{2+} 浓度显著低于Erastin+Sham组。综上所述,不同频率的rTMS均可降低铁死亡诱导模型细胞的 Ca^{2+} 浓度异常升高。

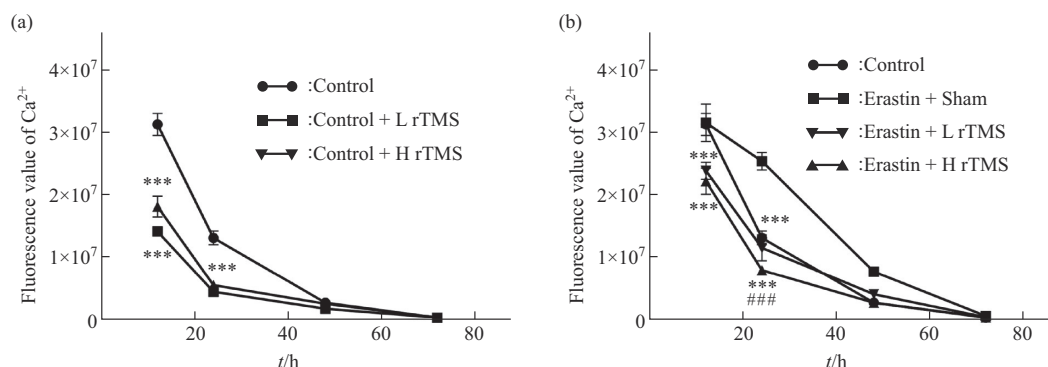


Fig. 7 Effect of rTMS on intracellular Ca^{2+} content

(a) Effect of magnetic stimulation on Ca^{2+} content in normal cells. (b) Effect of magnetic stimulation on Ca^{2+} content in ferroptosis cells. *** $P < 0.001$ vs Control; ### $P < 0.001$ vs Erastin+H rTMS; $n = 8$.

2.5 铁代谢指标与认知功能的关系

铁的代谢是铁死亡过程中一个重要的调节点,铁死亡在AD过程中发挥着重要的作用。图8分析了小鼠脑内海马区铁代谢相关指标与认知功能之间的关系。图8a~d显示,小鼠海马组织MDA含量与小鼠认知功能改变显著相关 ($P < 0.05$)。其中MDA含量与新物体测试中认知指数与水迷宫测试中目标平台区域停留时间呈现负相关,而与水迷宫测试期第一次到达目标平台所用的时间呈现正相关。图8e~h显示,小鼠海马区SOD含量与小鼠认知功能改变显著相关 ($P < 0.05$)。其中,SOD含量与新物体测试中认知指数与水迷宫测试中平台象限停留时

间呈现正相关,而与水迷宫测试期第一次到达目标平台所用的时间呈现负相关。图8i~l显示,小鼠海马区GSH含量与小鼠认知功能改变显著相关 ($P < 0.05$)。其中,GSH含量与新物体测试中认知指数与水迷宫测试中平台象限停留时间呈现正相关,而与水迷宫测试期第一次到达目标平台所用的时间呈现负相关。图8m~p分析了小鼠海马区 Fe^{2+} 含量与认知功能的相关性,结果显示 Fe^{2+} 含量与水迷宫测试中平台象限停留时间呈现显著正相关 ($P < 0.05$),与其他指标无显著相关性。综上所述,AD小鼠脑内海马区铁代谢失调与认知障碍显著相关,后续可以通过调节铁代谢来改善AD认知功能障碍。

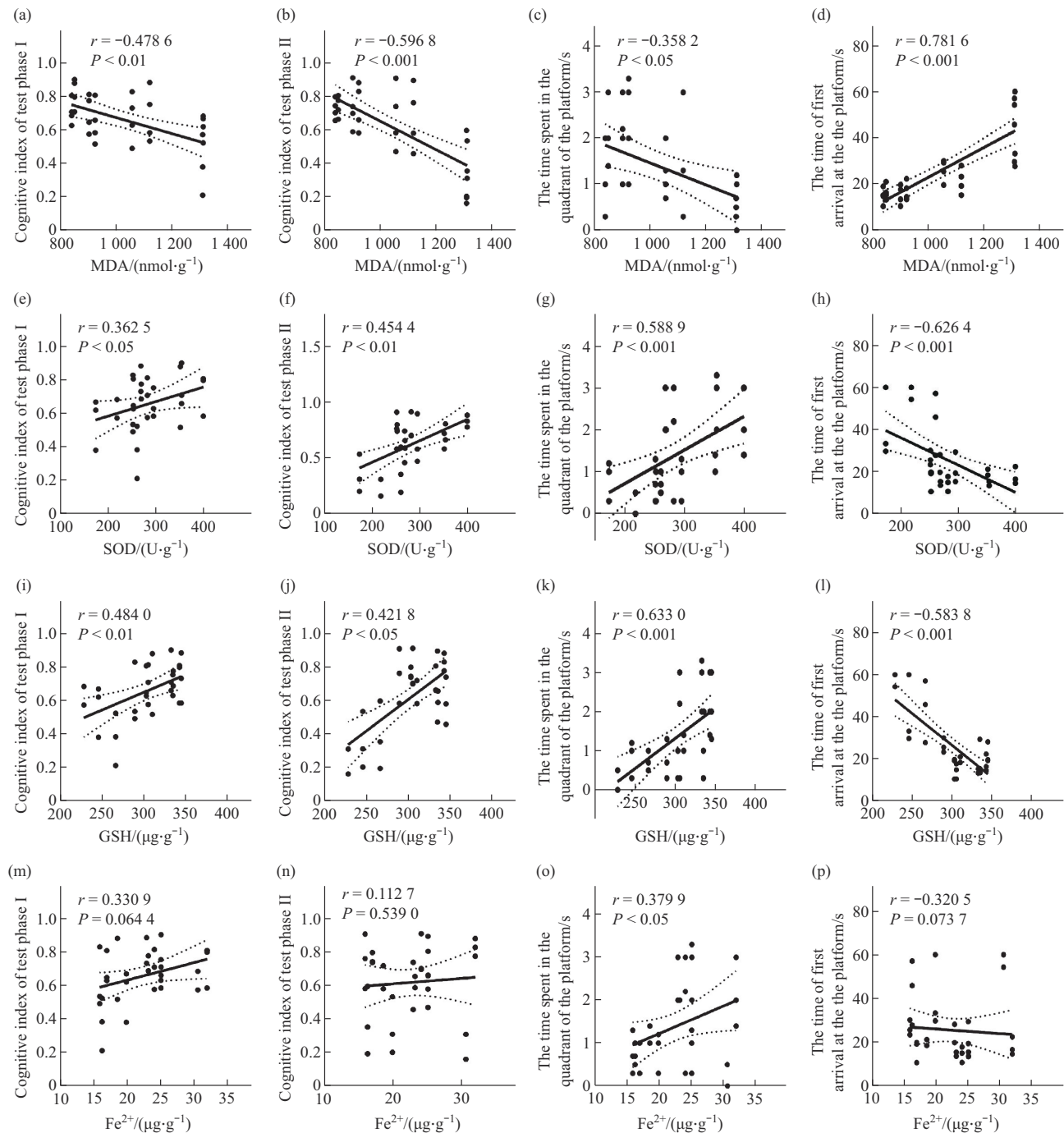


Fig. 8 Correlation analysis between iron metabolism indices and cognitive functions

Correlations were assessed between the cognitive indices of the new object test phase I (a, e, i, m), the cognitive indices of the test phase II (b, f, j, n), the duration of stay in the platform quadrant during the water maze test phase (c, g, k, o), the time taken to reach the platform for the first time during the water maze test phase (d, h, l, p), and the levels of MDA in the hippocampal region, SOD activity, GSH content, and divalent iron ions in the brains of the mice. The normality of the data was evaluated using the Shapiro-Wilk test. If the data failed to meet the normality assumption, logarithmic transformation was applied or nonparametric tests were directly employed. Depending on the distribution characteristics after transformation, either Pearson (for normally distributed data) or Spearman (for non-normally distributed data) correlation analysis was ultimately selected to assess the correlations between variables. *P* values are correlation analyses and *r* values are correlation coefficients.

3 讨 论

本研究旨在确定 rTMS 对 AD 小鼠认知功能障碍的改善作用所涉及的相关机制。研究结果表明, 高频和低频 rTMS 均可改善 AD 模型小鼠的认知功能障碍和空间记忆水平。通过铁死亡水平检测发现, rTMS 治疗挽救了 AD 小鼠海马内神经元铁死亡并且还可降低因细胞铁死亡导致异常升高的胞内 Ca^{2+} 浓度。这些发现表明, 高频和低频 rTMS 均可改善 AD 认知功能障碍, 其作用机制涉及抑制细胞铁死亡和 Ca^{2+} 失衡。

AD 是一种常见的神经退行性疾病, 会对患者的认知功能造成严重影响, 如何缓解 AD 造成的损伤是一个重要课题。rTMS 作为非侵入性脑刺激 (non-invasive brain stimulation, NIBS) 技术的重要范式, 近年来在神经调控领域备受关注。鉴于传统药物治疗方案对 AD 患者在神经可塑性调节和认知功能改善方面存在显著局限性, 基于 NIBS 的神经调控技术已逐渐发展为具有转化医学价值的新型治疗策略。在 rTMS 中, 超过 1 Hz 的刺激被归类为高频, 而低于 1 Hz 的刺激被认为是低频^[31]。高频治疗被认为是兴奋性的, 通常用于认知障碍研究。治疗涉及 5~20 Hz 的刺激频率, 持续 1~4 周^[32]。然而一些动物实验发现, 在行为测试中, 低频和高频 rTMS 都在不同程度上改善了 AD 小鼠的认知障碍, 但对于低频和高频的作用差异结论不一^[22, 24, 33]。因此, 本研究分别采用 20 Hz 高频和 0.5 Hz 低频 rTMS 治疗 APP/PS1 小鼠, 其中新物体实验结果显示, 高、低频 rTMS 治疗都能显著改善 AD 小鼠的短期和长期识别记忆水平, 且这两种不同频率的磁刺激方式在改善效果上并无显著区别。而 Morris 水迷宫实验结果显示 rTMS 治疗都能显著改善 AD 小鼠的空间认知功能, 其中低频 rTMS 显示出更好的治疗效果。

铁死亡, 早在 2012 年就有报道, 其机制特征是铁依赖性 GSH 耗竭和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 失活, 以及随后细胞中脂质过氧化积累^[2]。越来越多的研究证明海马内铁的升高和脂质过氧化的增强在 AD 中起关键作用^[34]。神经退行性疾病研究的最新证据表明, APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠呈现铁死亡特征性病理改变, 且通过药理学抑制铁死亡通路可显著改善该模型动物的空间记忆缺陷及新物体识别障碍^[35-36], 这些发现提示, APP/PS1 转基因模型可作

为研究 AD 病理进程中铁死亡机制的有效载体。本研究通过 ELISA 技术检测到淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) /PS1 小鼠海马组织铁死亡特征性生物标志物水平显著升高, 进一步佐证了该模型中铁死亡通路的激活状态。前期研究证实, rTMS 干预可显著调控脑缺血/再灌注损伤模型大鼠铁死亡关键调控节点的转录组与蛋白质组表达谱^[37]。最新分子机制研究进一步揭示, rTMS 可通过调控 tau/APP-铁代谢-GPX4/系统 Xc^- -核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号轴, 改善衰老认知功能损伤^[38]。值得关注的是, 本研究发现, 高频与低频 rTMS 干预均可显著逆转 AD 模型小鼠海马区异常升高的铁死亡水平, 表明 rTMS 可能是通过抑制铁死亡进程进而改善 AD 相关认知功能障碍。该发现不仅深化了对 rTMS 神经保护机制的理解, 同时为开发基于铁死亡调控的 AD 治疗新策略提供了理论依据。

本研究选择 4~5 月龄 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠, 旨在探究 rTMS 对 AD 早期病理进程中铁死亡的调控作用。已有研究表明, APP/PS1 小鼠在 4~5 月龄时虽未出现显著神经元凋亡, 但海马区已存在 $\text{A}\beta$ 寡聚体积累、突触可塑性下降以及铁代谢相关蛋白的异常表达^[39]。这一阶段可能标志着铁死亡通路的早期激活。在此时间节点进行 rTMS 干预, 有助于揭示其对病理级联反应的预防性调控机制。相较于传统研究的氧化应激/凋亡通路, 铁死亡作为一种铁依赖的新型细胞死亡方式, 其分子标记 (如脂质过氧化产物 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxy-2-nonenal, 4-HNE) 积累、长链酰基辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 上调等) 可能更早出现于 $\text{A}\beta$ 毒性微环境中^[40]。我们通过检测 4~5 月龄这一过渡期, 可更精准捕捉铁死亡动态过程, 规避晚期阶段多通路交互作用造成的机制混杂效应。然而, 本研究模型系统仍存在以下局限特征: 其一, tau 蛋白病理缺失, 未重现 AD 患者特征性神经原纤维缠结 (由过度磷酸化 tau 蛋白聚集形成), 导致无法评估 rTMS 对 tau 介导的轴突运输障碍及微管稳定性的调节作用; 其二, 单一转基因背景限制了对散发性 AD 复杂遗传网络的模拟效度。因此, 未来研究需整合多重转基因模型或类器官系统, 以构建更完善的 AD 病理全景研究体系。另外, 需要特别说明的是, 尽管本研究通过试剂盒检测发现铁死亡可能参与神经元损伤

过程,但由于未进行Fer-1等铁死亡抑制剂干预实验,目前结果尚不能直接证实铁死亡是神经元死亡的主要原因。这一机制需在后续研究中通过高龄动物模型的多维度验证加以完善。

此外,神经元钙稳态与铁死亡关联紧密。有研究发现,在氯化铜诱导的神经元死亡期间,胞质钙的激增影响了溶酶体的自噬通量^[41]。Enniatins A1和B1两种霉菌毒素通过消耗细胞内储存库来改变神经元细胞的钙稳态,导致细胞凋亡死亡^[42]。这些研究发现证实了钙在细胞死亡中扮演的重要角色,钙的激增同样发生在细胞铁死亡中。铁刺激氧化还原敏感的兰尼碱受体(ryanodine receptor, RyR)介导的Ca²⁺释放引起显著的神经元线粒体碎裂,这可能有助于铁积累产生的神经元功能受损^[10]。升高细胞内游离Ca²⁺可加快铁的初始摄取速率并增加细胞吸收铁的整体能力。细胞内Ca²⁺的耗竭或细胞外Ca²⁺的完全螯合导致细胞中铁摄取的完全抑制^[43]。研究发现,降低细胞内Ca²⁺水平会引起脂质重塑,从而保护细胞免受铁死亡的影响^[44]。与这些研究结果一致,本研究结果显示,rTMS不仅可以降低正常HT-22海马神经元细胞胞质Ca²⁺水平,还可以抑制因Erastin诱导的细胞铁死亡导致的胞内Ca²⁺激增,说明rTMS改善细胞铁死亡的过程可能是通过影响细胞内Ca²⁺水平实现的。

最后,本研究还评估了小鼠脑内海马区铁代谢相关指标与认知功能之间的关系,结果发现,AD小鼠认知功能与小鼠海马脑内铁死亡水平呈现显著相关性,进一步说明高频和低频rTMS是通过靶向铁死亡改善AD模型小鼠认知功能障碍。

4 结 论

本研究表明,高频和低频rTMS都可以显著改善AD小鼠认知功能障碍,其作用机理可能是磁刺激通过影响海马区神经元细胞铁死亡水平和细胞内Ca²⁺浓度来改善AD小鼠的认知缺陷。

参 考 文 献

- [1] Goetzl E J. Current developments in Alzheimer's disease. *Am J Med*, 2025, **138**(1): 15-20
- [2] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012, **149**(5): 1060-1072
- [3] Costa I, Barbosa D J, Benfeito S, *et al.* Molecular mechanisms of ferroptosis and their involvement in brain diseases. *Pharmacol Ther*, 2023, **244**: 108373
- [4] Reichert C O, de Freitas F A, Sampaio-Silva J, *et al.* Ferroptosis mechanisms involved in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci*, 2020, **21**(22): 8765
- [5] Farr A C, Xiong M P. Challenges and opportunities of deferoxamine delivery for treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and intracerebral hemorrhage. *Mol Pharm*, 2021, **18**(2): 593-609
- [6] Wang C, Chen S, Guo H, *et al.* Forsythoside a mitigates Alzheimer's-like pathology by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation via Nrf2/GPX4 axis activation. *Int J Biol Sci*, 2022, **18**(5): 2075-2090
- [7] Colgan L A, Hu M, Misler J A, *et al.* PKC α integrates spatiotemporally distinct Ca²⁺ and autocrine BDNF signaling to facilitate synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 2018, **21**(8): 1027-1037
- [8] Wojda U, Salinska E, Kuznicki J. Calcium ions in neuronal degeneration. *IUBMB Life*, 2008, **60**(9): 575-590
- [9] Saito K, Elce J S, Hamos J E, *et al.* Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(7): 2628-2632
- [10] Sanmartín C D, Paula-Lima A C, García A, *et al.* Ryanodine receptor-mediated Ca(2+) release underlies iron-induced mitochondrial fission and stimulates mitochondrial Ca(2+) uptake in primary hippocampal neurons. *Front Mol Neurosci*, 2014, **7**: 13
- [11] Nakamura T, Ogawa M, Kojima K, *et al.* The mitochondrial Ca²⁺ uptake regulator, MICU1, is involved in cold stress-induced ferroptosis. *EMBO Rep*, 2021, **22**(5): e51532
- [12] Maher P, van Leyen K, Dey P N, *et al.* The role of Ca²⁺ in cell death caused by oxidative glutamate toxicity and ferroptosis. *Cell Calcium*, 2018, **70**: 47-55
- [13] Pedrera L, Espiritu R A, Ros U, *et al.* Ferroptotic pores induce Ca²⁺ fluxes and ESCRT-III activation to modulate cell death kinetics. *Cell Death Differ*, 2021, **28**(5): 1644-1657
- [14] Bonotis K, Anargyros K, Liaskopoulos N, *et al.* Evaluation of memory performance in patients with brain disorders following rTMS treatment. A systematic review. *Clin Neurophysiol*, 2022, **135**: 126-153
- [15] Rossi S, Antal A, Bestmann S, *et al.* Safety and recommendations for TMS use in healthy subjects and patient populations, with updates on training, ethical and regulatory issues: expert guidelines. *Clin Neurophysiol*, 2021, **132**(1): 269-306
- [16] Huang Z, Tan T, Du Y, *et al.* Low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorates cognitive function and synaptic plasticity in APP23/PS45 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 2017, **9**: 292
- [17] Zong X, Gu J, Geng D, *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) for multiple neurological conditions in rodent animal models: a systematic review. *Neurochem Int*, 2022, **157**: 105356
- [18] Baek A, Kim J H, Pyo S, *et al.* The differential effects of repetitive magnetic stimulation in an *in vitro* neuronal model of ischemia/reperfusion injury. *Front Neurol*, 2018, **9**: 50

- [19] Chen X, Dong G Y, Wang L X. High-frequency transcranial magnetic stimulation protects APP/PS1 mice against Alzheimer's disease progress by reducing APOE and enhancing autophagy. *Brain Behav*, 2020, **10**(8): e01740
- [20] Brihmat N, Allexandre D, Saleh S, *et al.* Stimulation parameters used during repetitive transcranial magnetic stimulation for motor recovery and corticospinal excitability modulation in SCI: a scoping review. *Front Hum Neurosci*, 2022, **16**: 800349
- [21] Tan T, Xie J, Liu T, *et al.* Low-frequency (1 Hz) repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) reverses A β (1-42) - mediated memory deficits in rats. *Exp Gerontol*, 2013, **48**(8): 786-794
- [22] Zhang Z, Ding C, Fu R, *et al.* Low-frequency rTMS modulated the excitability and high-frequency firing in hippocampal neurons of the Alzheimer's disease mouse model. *Brain Res*, 2024, **1831**: 148822
- [23] Chen X, Chen S, Liang W, *et al.* Administration of repetitive transcranial magnetic stimulation attenuates A β ₁₋₄₂-induced Alzheimer's disease in mice by activating β -catenin signaling. *Biomed Res Int*, 2019, **2019**: 1431760
- [24] Choung J S, Kim J M, Ko M H, *et al.* Therapeutic efficacy of repetitive transcranial magnetic stimulation in an animal model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 437
- [25] Shepherd A, May C, Churilov L, *et al.* Evaluation of attention in APP/PS1 mice shows impulsive and compulsive behaviours. *Genes Brain Behav*, 2021, **20**(1): e12594
- [26] Mifflin M A, Winslow W, Surendra L, *et al.* Sex differences in the IntelliCage and the Morris water maze in the APP/PS1 mouse model of amyloidosis. *Neurobiol Aging*, 2021, **101**: 130-140
- [27] Zhao Y B, Hou X F, Li X, *et al.* Early memory impairment is accompanied by changes in GluA1/p-GluA1 in APP/PS1 mice. *Curr Alzheimer Res*, 2022, **19**(9): 667-673
- [28] Sierra C, De Toma I, Cascio L L, *et al.* Social factors influence behavior in the novel object recognition task in a mouse model of down syndrome. *Front Behav Neurosci*, 2021, **15**: 772734
- [29] Lang B, Kahnau P, Hohlbaum K, *et al.* Challenges and advanced concepts for the assessment of learning and memory function in mice. *Front Behav Neurosci*, 2023, **17**: 1230082
- [30] Wankerl K, Weise D, Gentner R, *et al.* L-type voltage-gated Ca²⁺ channels: a single molecular switch for long-term potentiation/long-term depression-like plasticity and activity-dependent metaplasticity in humans. *J Neurosci*, 2010, **30**(18): 6197-6204
- [31] Hao Z, Wang D, Zeng Y, *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation for improving function after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013, **2013**(5): CD008862
- [32] Lefaucheur J P, Aleman A, Baeken C, *et al.* Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): an update (2014-2018). *Clin Neurophysiol*, 2020, **131**(2): 474-528
- [33] Huang H, Zhu Y, Liao L, *et al.* The long-term effects of intermittent theta burst stimulation on Alzheimer's disease-type pathologies in APP/PS1 mice. *Brain Res Bull*, 2023, **202**: 110735
- [34] Butterfield D A, Bader Lange M L, Sultana R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1801**(8): 924-929
- [35] Fan Y G, Ge R L, Ren H, *et al.* Astrocyte-derived lactoferrin inhibits neuronal ferroptosis by reducing iron content and GPX4 degradation in APP/PS1 transgenic mice. *Pharmacol Res*, 2024, **209**: 107404
- [36] Li L, Li W J, Zheng X R, *et al.* Eriodictyol ameliorates cognitive dysfunction in APP/PS1 mice by inhibiting ferroptosis *via* vitamin D receptor-mediated Nrf2 activation. *Mol Med*, 2022, **28**(1): 11
- [37] Zhou G J, Liu D N, Huang X R, *et al.* High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats: involving the mitigation of ferroptosis and inflammation. *Brain Behav*, 2023, **13**(5): e2988
- [38] Xu Y, Xu M, Zhou C, *et al.* Ferroptosis and its implications in treating cognitive impairment caused by aging: a study on the mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation. *Exp Gerontol*, 2024, **192**: 112443
- [39] Wang X, Zhou R, Sun X, *et al.* Preferential regulation of Γ -secretase-mediated cleavage of APP by ganglioside GM1 reveals a potential therapeutic target for Alzheimer's disease. *Adv Sci (Weinh)*, 2023, **10**(32): e2303411
- [40] Yan C, Yang S, Shao S, *et al.* Exploring the anti-ferroptosis mechanism of Kai-Xin-San against Alzheimer's disease through integrating network pharmacology, bioinformatics, and experimental validation strategy *in vivo* and *in vitro*. *J Ethnopharmacol*, 2024, **326**: 117915
- [41] Kim Y, Lee Y, Choo M, *et al.* A surge of cytosolic calcium dysregulates lysosomal function and impairs autophagy flux during cupric chloride-induced neuronal death. *J Biol Chem*, 2024, **300**(1): 105479
- [42] Pérez-Fuentes N, Alvaríño R, Alfonso A, *et al.* Enniatins A1 and B1 alter calcium homeostasis of neuronal cells leading to apoptotic death. *Food Chem Toxicol*, 2022, **168**: 113361
- [43] Ci W, Li W, Ke Y, *et al.* Intracellular Ca(2+) regulates the cellular iron uptake in K562 cells. *Cell Calcium*, 2003, **33**(4): 257-266
- [44] Xin S, Mueller C, Pfeiffer S, *et al.* MS4A15 drives ferroptosis resistance through calcium-restricted lipid remodeling. *Cell Death Differ*, 2022, **29**(3): 670-686

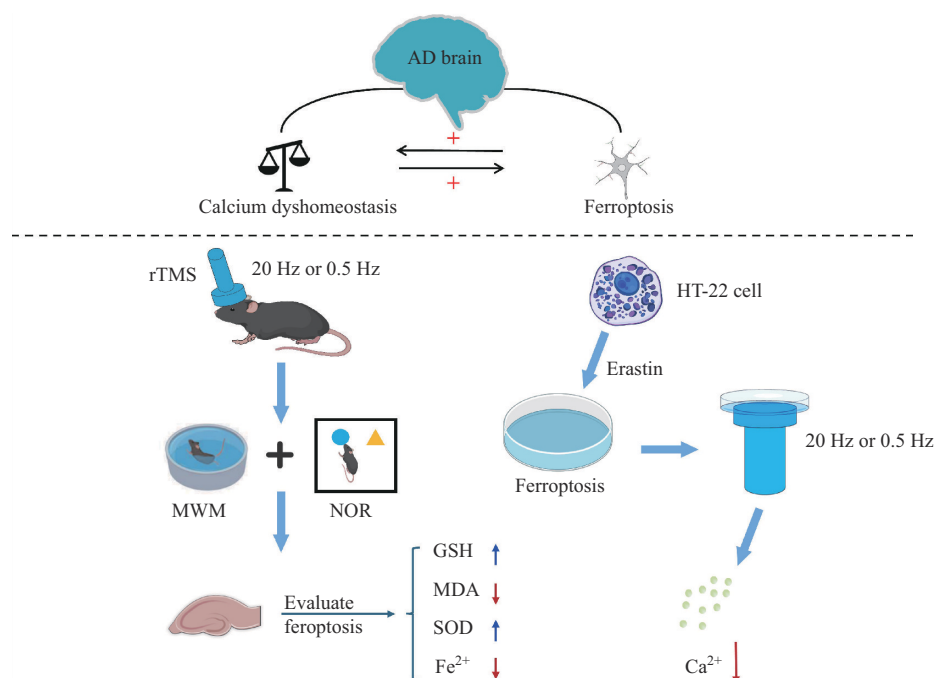
Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Ameliorates Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease Mice by Inhibiting Ferroptosis and Maintaining Cytoplasmic Calcium Homeostasis*

ZHANG Meng^{1,2)**}, ZHANG Ze^{1,2)**}, FU Rui^{1,2)}, REN Zi-Hao^{1,2)}, DING Chong^{1,2)***}

⁽¹⁾College of Health Sciences & Biomedical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

⁽²⁾Key Laboratory of Bioelectromagnetics and Neural Engineering of Hebei Province, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS), a non-invasive brain stimulation technique, offers a non-pharmacological therapeutic option for the management of Alzheimer's disease (AD). Studies have demonstrated that ferroptosis plays a pivotal role in the pathological onset and progression of AD, and the inhibition of neuronal ferroptosis can significantly ameliorate cognitive impairments associated with AD. The imbalance of calcium ion (Ca^{2+}) homeostasis is intimately associated with the pathology of AD and serves as a catalyst for the induction of ferroptosis through various pathways. This study is designed to investigate whether

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (52077057, 52207251) and Hebei Natural Science Foundation (F2022202023).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-14722020113, E-mail: dingchong@hebut.edu.cn

Received: January 15, 2025 Accepted: April 27, 2025

rTMS can ameliorate AD by inhibiting neuronal ferroptosis or maintaining calcium homeostasis, ultimately establishing a theoretical and experimental framework for the utilization of rTMS in AD treatment.

Methods APP/PS1 AD mice were subjected to both 0.5 Hz low-frequency and 20 Hz high-frequency rTMS treatments, and the efficacy of these treatments was evaluated using novel object recognition and Morris water maze tests. ELISA was employed to quantify the levels of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), Fe^{2+} within the hippocampi of mice from each group. HT-22 cells were induced to undergo ferroptosis *via* Erastin treatment, and subsequent to high- and low-frequency magnetic stimulation, cell viability was assessed using CCK-8 assay, while intracellular calcium ion concentration fluctuations were monitored using Fluo-4 AM. **Results** The findings revealed that, when compared to normal mice, AD mice displayed a notable decline in cognitive function, accompanied by a substantial increase in ferroptosis levels and intracellular calcium ion concentrations. Both high-frequency and low-frequency applications of rTMS were found to significantly ameliorate cognitive impairments in AD mice, while also effectively mitigating the abnormal augmentation of neuronal ferroptosis and intracellular calcium ion levels. **Conclusion** The present study underscores that both high-frequency and low-frequency rTMS exhibit efficacy in alleviating cognitive dysfunction in AD mice, potentially through the modulation of ferroptosis and intracellular calcium ion homeostasis.

Key words Alzheimer's disease, repetitive transcranial magnetic stimulation, ferroptosis, calcium homeostasis, cognitive function

DOI: 10.16476/j.pibb.2025.0023

CSTR: 32369.14.pibb.20250023