



## 基于心率变异性引导的阿尔茨海默病 磁刺激干预技术研究\*

陈淑婷<sup>1)</sup> 耿读艳<sup>2,4)\*\*</sup> 范淳萌<sup>3)</sup> 郑卫然<sup>4)</sup> 徐桂芝<sup>2,4)</sup>

<sup>1)</sup> 河北工业大学生命科学与健康工程学院, 天津 300072;

<sup>2)</sup> 智能配用电装备与系统全国重点实验室 (河北工业大学), 天津 300130;

<sup>3)</sup> 首都医科大学基础医学院, 北京 100069; <sup>4)</sup> 河北工业大学电气工程学院, 天津 300072)

**摘要** 目的 无创磁刺激技术已广泛应用于阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的治疗,但缺乏便捷及时的疗效评估与反馈方法,难以有效指导磁刺激方案的调整。本研究旨在探究心率变异性 (heart rate variability, HRV) 诊断AD并引导AD磁刺激干预技术的可能性。方法 本研究采用频率40 Hz、磁感应强度10 mT的脉冲磁场对AD模型小鼠进行为期18 d的全身暴露实验,检测暴露前后的行为学和心脑电信号,并采集每天暴露后的即时心电信号。结果 利用单因素方差分析与皮尔逊相关系数分析发现:HRV部分指标可以和行为学及脑电 (electroencephalogram, EEG) 一样精确识别AD模型小鼠 ( $P<0.05$ ) 并显著区分病症程度 ( $P<0.05$ ), 其中rMSSD、pNN6、LF/HF、SD1/SD2及排列熵展现出了与行为学及脑电良好的相关性及统计学意义 ( $r>0.3$ ,  $P<0.05$ ); 磁场暴露前后这些HRV指标同行为学及脑电均得到显著调节 ( $P<0.05$ ), 且在连续的心电变化中更精确地观察到刺激效果的变化趋势。结论 HRV能精确反映病理生理变化和病症程度,快速评估磁刺激效果,具有用于引导曝磁模式的潜力,为研究脑疾病的个性化电磁神经调控技术提供了新思路。

**关键词** 阿尔茨海默病, 心率变异性, 磁刺激, 行为学实验, 脑电图

中图分类号 TM12

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0465

CSTR: 32369.14.pibb.20240465

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种起病隐匿的、进行性发展的中枢神经系统退行性疾病<sup>[1]</sup>, 是老年人中最常见的痴呆症, 约占60岁以上痴呆症患者群体的70%, 且发病率随着年龄增长而增加。AD患者在临床上主要表现为渐进性认知障碍和人格精神异常, 初期记忆力下降、日常生活能力障碍, 到后期将卧床不起、大小便失禁, 完全依赖他人照顾。中国AD患者已经超过600万人, 预计到2050年AD患病人口将超过2000万, 是世界上AD患病人口最多、增长速度最快的地区, 给患者、家庭和社会都带来沉重负担<sup>[2]</sup>。

AD患者的死亡通常由支气管肺炎、心肌梗死或心力衰竭引起, 这些疾病与自主神经系统的功能障碍密切相关<sup>[3]</sup>, 而且由于AD患者通常年龄较大且有许多共存疾病, 因此即使轻微的自主神经功能障碍也可能导致更差的结果<sup>[4]</sup>。自主神经系统是调节心脏功能的重要调节系统, 包括交感神经系统

和副交感神经系统。其中, AD病理的发展通常伴随着副交感神经活动受到抑制和交感神经异常亢奋的自主神经功能障碍<sup>[5]</sup>, 且随病症程度加深失衡现象更加严重, 表现为心率变异性 (heart rate variability, HRV) 显著降低的病理性特征<sup>[6-7]</sup>。这种现象也发生在痴呆早期<sup>[5]</sup>, 因此HRV被认为是自主神经系统 (尤其是副交感神经系统) 活动的生物标志物之一<sup>[8]</sup>。另外临床研究证实, HRV可以区分早期的AD和路易体痴呆<sup>[9]</sup>, 且一些关键HRV指标与认知表现之间存在关联<sup>[10]</sup>。因此研究自主神经功能障碍的发生模式和严重程度可能有助于区

\* 国家自然科学基金 (52277230), 国家重点研发计划 (2022YFC2402203) 和河北省省级科技计划 (24464401D) 资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 13602131861, E-mail: dygeng@hebut.edu.cn

收稿日期: 2024-11-08, 接受日期: 2025-02-20

分不同的痴呆亚型<sup>[11]</sup>, 更进一步地, 通过研究HRV与其他生物标志物的关联性以及反馈灵敏度可以为临床治疗提供帮助<sup>[12]</sup>。

近年来, 极低频(0~300 Hz)磁场(extremely low frequency magnetic fields, ELF-MF)在认知障碍疾病中的使用已显示出越来越多的神经恢复作用<sup>[13]</sup>, 因其刺激强度通常为mT级, 又被称为低强度磁场刺激。其中极低频脉冲电磁场应用最为广泛且具有有效改善甚至逆转AD患者认知障碍的潜力<sup>[14]</sup>。既往研究表明, 该刺激可以提高海马区神经元存活率, 增强小鼠的空间记忆学习能力<sup>[15]</sup>。为了更好地为临床应用提供信息, 对AD模型动物认知功能的评估也很重要。到目前为止, 认知行为评估是最客观的评估方法, 莫里斯水迷宫(Morris water maze, MWM)实验可根据啮齿类动物的海马依赖性来确定啮齿类动物模型的空间记忆以及认知学习能力<sup>[16]</sup>。另外, AD病症中认知能力与大脑神经振荡联系密切<sup>[17]</sup>, 不同频段的脑电节律可作为区分AD病理程度的潜在指标<sup>[18]</sup>, 其中患有认知障碍的大鼠的局部场电位(local field potential, LFP)信号中theta( $\theta$ )和gamma( $\gamma$ )频段的节律性震荡出现异常, 能量发生衰减<sup>[19]</sup>, 这两种节律的振荡都与空间导航、认知能力密切相关。

在AD诊断领域中, 大多数临床检查费用昂贵, 在不能满足日常监测需求的社区医疗机构中使用率较低; 治疗领域中ELF-MF的作用效果又依赖于多种因素<sup>[20-21]</sup>, 涉及曝磁模式和作用对象。因此找到一种能够准确诊断病情, 并且还能及时反映刺

激疗效并引导治疗方向的反馈标志物, 成为了一个亟待解决的关键问题, 另外, 在小鼠实验研究中, 没有一种生物标志物可以及时无创地反映刺激效果从而引导人们干预刺激模式来提高作用效果。因此, 研究HRV这一简单、低成本、快速的检测方法对于AD的诊疗发展具有重要意义。

## 1 材料与方法

本研究使用不同月龄的雄性APP/PS1双转基因AD模型小鼠<sup>[22]</sup>和与其同源的C57BL/6J野生型(WT)小鼠为研究对象, APP/PS1双转基因AD模型小鼠脑部在5月龄时即出现淀粉样变, 且主要应用于AD的特异性研究, 不存在其他痴呆亚型。通过认知运动行为测试划分模型鼠痴呆程度, 分析同病症程度小鼠海马局部场电位 $\theta$ 和 $\gamma$ 频段的时频能量, 然后筛选区分效果显著并与其他生物标志物相关联的心率变异性指标, 同时利用行为学评分、脑电节律、心率变异性3个维度的指标观察ELF-MF(40 Hz, 10 mT)的效果, 最终评估HRV作为疗效量化评估的及时性以及准确性。实验流程图如图1所示, 首先将所有小鼠饲养在符合SPF级别的动物实验室内, 环境温度(25±2)°C, 湿度(75±5)%, 昼夜各12 h, 单笼喂养且小鼠能够自由获取食物和水。适应2 d后对小鼠进行7 d的MWM训练和测试, 从第9天开始对每只小鼠进行心电采集, 心电采集过程持续到实验结束。第11天开始对AD刺激组小鼠进行磁刺激, 暴露2次/d, 持续30 min/次, 两次之间间隔4 h, 刺激持续18 d后再次对所有小鼠进行心脑电以及水迷宫的数据采集。

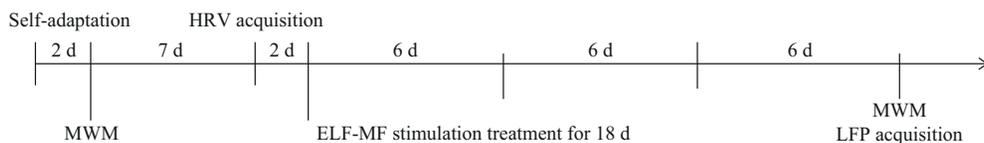


Fig. 1 Flowchart of the experiment

Two days after the mice adapted, the water maze experiment was performed. Subsequently, the electrocardiograms of all the mice were collected, and they were exposed to long-term low-intensity electromagnetic field stimulation for 18 d. After the stimulation was completed, the water maze experiment was repeated and the electroencephalogram collection experiment was conducted.

### 1.1 动物实验模型

根据实验室先前的研究成果发现, APP/PS1双转基因AD模型小鼠相对与其同源的C57BL/6J WT小鼠在5月龄出现轻度痴呆, 在7月龄出现中度痴呆, 在10~12月龄出现严重痴呆<sup>[23]</sup>, 认知能力随

着AD病程的延长而逐渐下降。因此本研究根据这一基础性研究, 选择5月、9月、12月龄的APP/PS1双转基因AD模型小鼠和与其同源的相同月龄的C57BL/6J WT小鼠为实验对象。根据MWM行为学结果将不同月龄的40只AD小鼠分成轻度、中

度以及重度3种病症程度,我们测量了水迷宫检验的平均逃避潜伏期,根据分类标准得到轻度痴呆鼠13只,中度痴呆鼠14只,重度痴呆鼠13只,并从每组中随机选取10只进行后续实验。本实验所有程序均已由河北工业大学生物医学伦理委员会审查通过(编号:HEBUTaCUC2022043)。

## 1.2 MWM实验

本研究采用MWM实验中的定位航行测试,平面图如图2所示。通过1 d的适应性训练以及6 d的定位航行实验,让小鼠对池壁周围的视觉提示进行重复学习和记忆,从而定位并找到安全平台。通过分析小鼠在寻找平台过程中的逃避潜伏期评估小鼠空间学习记忆能力及认知情况。

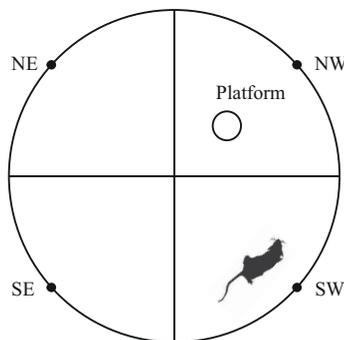


Fig. 2 Morris water maze floor plan

实验第1天让小鼠提前熟悉实验环境,进行为期1 d的适应性训练。训练时,将水池中的安全平台移除,然后将小鼠面朝池壁轻轻放入水中,自由游泳60 s后从水池中捞出,烘干后放回饲养笼中。第2天开始进行实验周期为6 d的定位航行实验,每只小鼠进行4次/d训练,限时60 s/次,每次训练结束让小鼠进行休息,间隔时间为15 min。实验的安全平台位于水池的西北(NW)象限,首次实验前将小鼠放在平台上1 min以帮助它们熟悉环境,但后续实验不再进行此步骤。小鼠从不同象限(东南(SE)、东北(NE)、西南(SW))入水,训练期间记录它们从入水到上平台的逃避潜伏期。如果小鼠能在60 s内找到平台并滞留2 s,视为寻台成功,记录成功所用时间,否则视为寻台失败,记录为60 s,并帮助它们上平台以便熟悉位置。每次训练后,都会对小鼠进行清理和照顾。实验结束后,及时清理水池以保持环境卫生。

## 1.3 在体多通道微电极植入手术

相关研究表明,海马体CA1区的神经元功能

受损是导致AD小鼠模型空间记忆障碍的关键因素<sup>[24]</sup>,因此本研究选择采集海马CA1区的局部场电位信号来反应小鼠的空间记忆功能。为了收集小鼠海马体CA1区的局部场电位信号,需要对其进行在体多通道微电极的植入手术。手术前24 h需对小鼠禁食,但保证其饮水。手术开始前使用3%~3.5%异氟烷配合1 L/min氧气流速在诱导盒中进行麻醉诱导,待小鼠翻正反射消失、呼吸平稳后,剃去头部毛发并将其固定在立体定位仪上,连接麻醉鼻锥,将异氟烷浓度调整为1%~1.5%进行麻醉维持。然后切开头皮,暴露颅骨,找到冠状缝与矢状缝的交点。以此为基准,向后移动2.5~3.0 mm,向左侧移动2.0~2.5 mm,使用颅骨钻在标记的位置开一个0.8 mm×0.8 mm的窗口,直至暴露出硬脑膜。挑除硬脑膜后,将一个16通道(2×8)微电极阵列垂直插入海马CA1区域。之后用生理盐水清洗创口,再用琼脂覆盖,待琼脂固化后,用牙科水泥固定电极阵列并消毒创口,以预防感染。手术完成后,让小鼠静养约48 h,确保其能够正常饮食,并观察其恢复情况,直到小鼠的精神状态良好。

## 1.4 数据采集

### 1.4.1 局部场电位信号采集

使用Plexon公司(美国)制作的Omniplex 128通道在体电生理信号采集系统采集静息LFP信号(海马CA1区),该系统主要由微丝电极接口、信号传输以及信号采集与分析3部分组成,其中信号采集与分析部分主要包括计算机、前置数字放大器、信号处理器以及数据采集软件Omniplex Server等。首先,将小鼠头部的电极接口接入电缆线与放大器连接;其次,通过Omniplex Server软件设置1 kHz采样率,带通滤波器设置为0.5~300 Hz,采样频率为40 kHz;最后,确保采集信号时环境安静,小鼠自由活动,待信号稳定后记录小鼠静息状态下5 min左右的LFP信号,并存储到Omniplex Server数据采集分析系统中。

### 1.4.2 心电信号采集

使用ECGenie™清醒无创心电图分析系统(ECGenie, Mouse Specifics, 美国)获取小鼠的静息心电图(electrocardiogram, ECG)。该系统包括数据采集计算机、采集平台和信号放大器。将小鼠置于采集平台上,双脚与电极接触,形成双极导联ECG。采集过程中实验动物清醒无束缚,避免了传统方法中使用药物、麻醉及操作过程引起的创伤等因素对小鼠造成的生理或心理伤害,影响心电采

集。然后, 通过生物信号放大器对 ECG 信号进行处理, 从而在计算机上显示 ECG 变化的波形。利用 LabChart8 程序记录 ECG 信号数据, 采样频率为 4 kHz。

## 1.5 数据分析

### 1.5.1 MWM实验数据

收集小鼠每天各次实验的逃避潜伏期数据, 手动清洗数据, 检查游泳路径和时间是否符合逻辑(例如, 动物是否真正在游泳而不是被其他因素影响), 进而去除异常值和不完整的数据记录。数据清洗后, 分别计算每只小鼠 6 d 定位航行测试的逃避潜伏期平均值, 即平均逃避潜伏期, 作为水迷宫测试的行为学指数, 单位为 s。

### 1.5.2 LFP数据

实验中所采集到的原始 LFP 信号背景噪声比较复杂, 主要包括工频干扰和基线漂移两种噪声, 本研究基于 Matlab 设计 50 Hz 陷波滤波器, 去除来自于实验周围的用电器等产生的电磁场环境的工频干扰, 针对基线漂移(小鼠呼吸或晃动过程中电极在颅内轻微移位造成的低频运动伪迹)频率通常小于 2 Hz, 设计 3 Hz 高通滤波器进行滤除。脑电信号在短时间内会产生快速振荡, 而在长时间则缓慢变化<sup>[25]</sup>, 因此在每段预处理过后的 LFP 信号截取 4 s, 然后采用小波变换方法实现信号的多分辨率细化<sup>[26]</sup>, 提取  $\theta$  及  $\gamma$  频段的平均能量密度, 进行时频特征分析<sup>[27]</sup>。

### 1.5.3 心电数据

使用 e-MOUSE 生理波形分析软件对采集的数据进行分析, 获得小鼠的 ECG 间期持续时间和 HRV 参数。包含过多噪声或误差波形的信号被修剪或删除。利用 LabChart8 程序手动截取相对平稳的 ECG 信号, 排除静息心率可受外伤(如出血、咬痕等)影响的小鼠数据。然后针对原始 ECG 信号, 基于 Matlab 设计了 3 Hz 高通滤波器、100 Hz 低通滤波器和 50 Hz 陷波滤波器, 以去除原始信号中的小鼠体动造成的基线漂移及实验仪器造成的工频干扰等, 经过处理后的信号更加平稳且易于后续处理。然后从预处理后的心电信号中提取所有 R 峰点并获取 RR 间期, 进行 HRV 时域、频域以及非线性分析。

### 1.5.4 相关性分析

本研究使用皮尔逊相关系数来评估变量之间的线性关系。皮尔逊相关系数  $r$  值的范围从 -1 到 1, 其中  $r=1$  表示完全正相关,  $r=-1$  表示完全负相关,

而  $r=0$  则表明没有线性关系。同时计算相应的  $P$  值以检验该相关性的统计显著性,  $P$  值是用来评估结果是否具有统计学意义的指标, 通常设定的显著性水平为 0.05。

### 1.5.5 统计学分析

本研究所得数据采用单因素方差分析与  $t$  检验法进行统计学分析, 所有实验数据均采用平均值  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SEM) 表示。以  $P$  值为参考对组间数据有无统计学意义进行判断, 当  $P \geq 0.05$  时数据无显著性差异, 当  $P < 0.05$  时数据具有显著性差异并记为 \*, 当  $P < 0.01$  时标记为 \*\*, 当  $P < 0.001$  时标记为 \*\*\*。

## 2 结 果

### 2.1 行为学分析

由图 3a, b 可见, 各组小鼠逃避潜伏期随着天数的增加明显缩短, 反映了学习记忆的有效性。实验过程中发现, 相较于 WT 组小鼠, AD 组小鼠认知能力有所下降, 对水池周围参考物的学习和记忆能力较差, 难以迅速找到避难平台。两图对比也可观察到, AD 小鼠的空间学习记忆受痴呆影响, 出现认知障碍, 且随月龄增长 AD 组逃避潜伏期更长且变化更慢, 说明随着痴呆加重, AD 组小鼠学习记忆障碍持续受损。随后以各月龄 WT 小鼠平均逃避潜伏期作为该月龄小鼠的参考成绩, AD 组小鼠平均逃避潜伏期为最终成绩, 将参考值与最终值之间差值占参考值的比例作为分类标准<sup>[28]</sup> 将 AD 组小鼠按照病症程度划分为轻度 (mild)、中度 (moderate)、重度 (severe) 组, 并从各组中随机挑选 10 只鼠进行后续实验。由图 3c 可见, 分组后不同病症程度的 AD 模型鼠的空间记忆功能显著劣于对应月龄的 WT 组。

### 2.2 海马 CA1 区局部场电位分析

首先观察预处理后的脑电图(图 4), 发现 AD 组的脑电波形相对 WT 组存在异常放电情况, 即出现更频繁的不规则波和尖波, 且振幅明显增大, 反映出神经元异常活动。经过小波能量分析发现, AD 组小鼠  $\theta$  及  $\gamma$  频段(图 5,  $n=8$ ) 的平均能量密度与相对月龄的 WT 组小鼠相比均有所下降, 且随痴呆程度加深持续下降, 能量密度缺失加重, AD 组间差异及 AD 组与 WT 组的差异均具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 2.3 心率变异性识别 AD 病症程度的显著性分析

HRV 在时域、频域、非线性 3 个层面的研究中

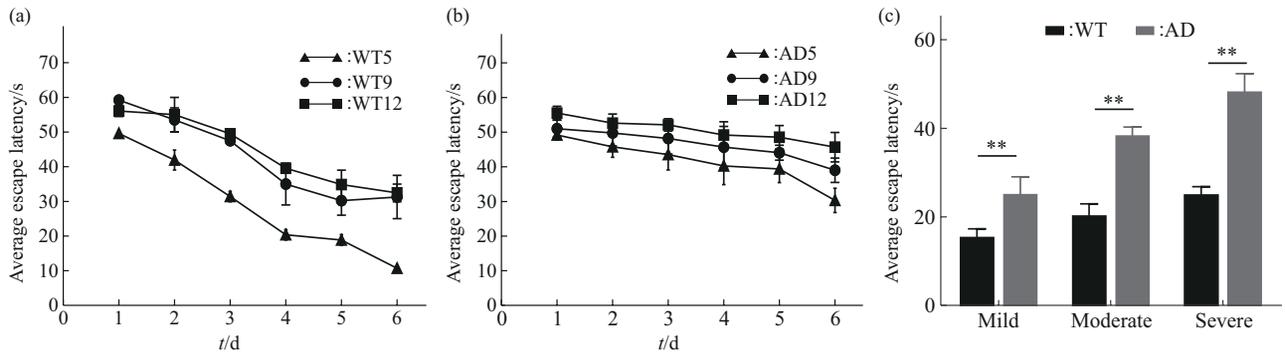


Fig. 3 Results of Morris water maze test

The results of the Morris water maze (MWM) test between the groups. (a) Average escape latency of the WT group; (b) average escape latency of the AD group; (c) average escape latency of the WT & AD group. \*\* $P < 0.01$ . WT5/9/12: 5/9/12-month old WT mice; AD5/9/12: 5/9/12-month old AD mice.

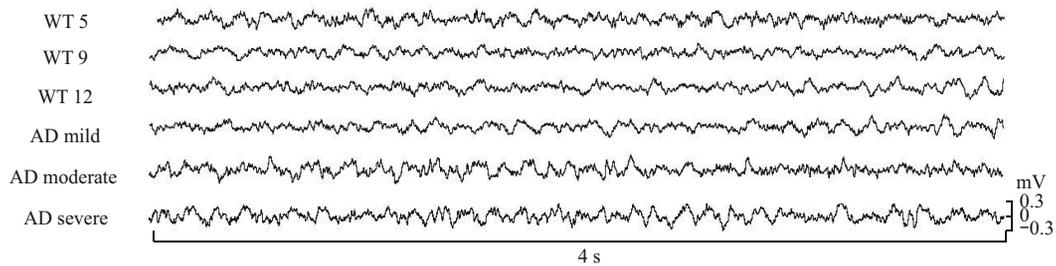


Fig. 4 Typical EEG results of WT and AD mice

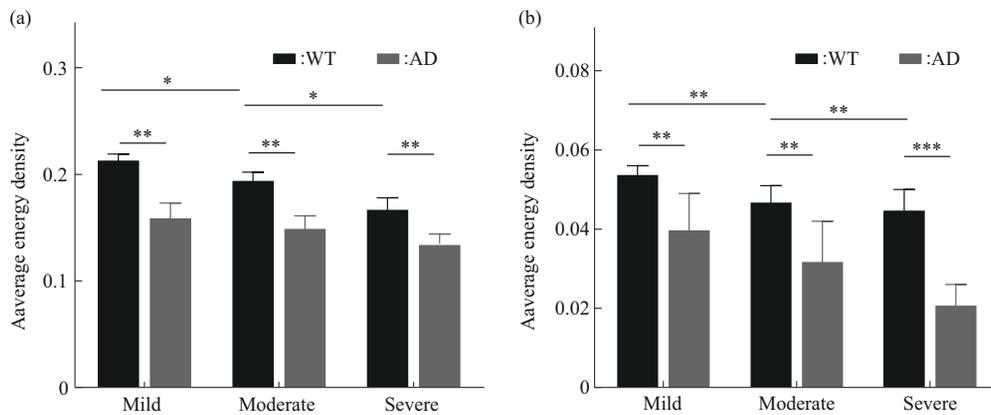


Fig. 5 Average energy density

Results of wavelet energy analysis in  $\theta$  and  $\gamma$  band. (a)  $\theta$  average energy density; (b)  $\gamma$  average energy density. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

共有 12 个指标<sup>[29]</sup>。其中，连续差均方根 (rMSSD)、pNN6 和高频功率 (high frequency, HF) 常被认为是副交感神经特异性指标，rMSSD 反映了 HRV 中的快变化成分，与迷走神经活性的变化呈正相关，PNN6 反映副交感神经活性，被认为是反映副交感神经的特异性指标，SDNN 指数值

的大小说明了心率变化的复杂程度，值越大，心率变化信号越复杂，反映的是自主神经系统的调节能力，低频功率 (low frequency, LF) 与高频功率的比值 (LF/HF) 有时被认为是交感神经-迷走神经平衡的生物标志物，有时被认为是交感神经指数<sup>[30]</sup>，SD1 是庞加莱图分量，描述了相邻 RR 间期

的瞬时心率变化情况, 是短期 HRV 的测量值, 反映了副交感神经的激活状态, SD1/SD2 用于衡量 RR 时间序列的不可预测性, 用于测量当监测周期足够长且存在交感神经激活时的自主神经平衡<sup>[31]</sup>, 排列熵 (pe) 是量化 HRV 复杂度的一个非线性指标。

本研究分别采集了 WT 组和 AD 组小鼠的 ECG (图 6), 相对 WT 组小鼠, AD 组小鼠心电波动较大, 具有明显不平稳特征, 且心跳间隔也有所增大。对心电数据进行预处理分析后, 计算 HRV 各

指标参数, 并采用单因素方差分析法进行分析比较, 结果用平均值±标准差的形式体现。分别比较了 AD 组和 WT 组的所有 HRV 指标后, 观察到 rMSSD、pNN6、SDNN、HF、LF/HF、SD1、SD1/SD2、排列熵 (在图中均以 pe 显示) 的显著差异 (图 7), 其中除 LF/HF 指标随着病症程度加深出现显著性升高 ( $P<0.01$ ), 且不同病症程度的 AD 组 LF/HF 分别显著高于对应月龄 WT 组 ( $P<0.001$ ) 之外, 其余 7 个指标均呈现不同程度的下降。

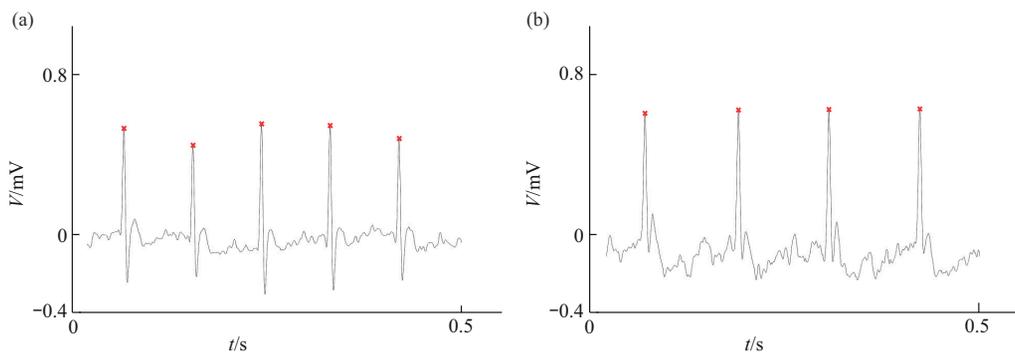


Fig. 6 Typical ECG results of WT and AD mice

The original ECG waveform of a mouse. (a) WT group; (b) AD group.

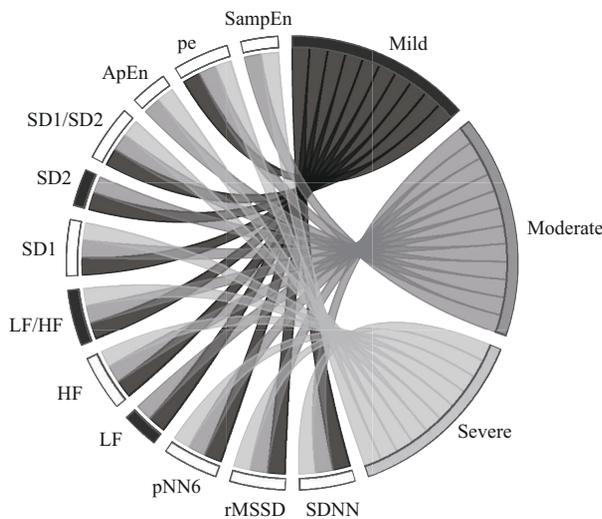


Fig. 7 E-chord chart of HRV difference significance among mild, moderate, and severe AD groups

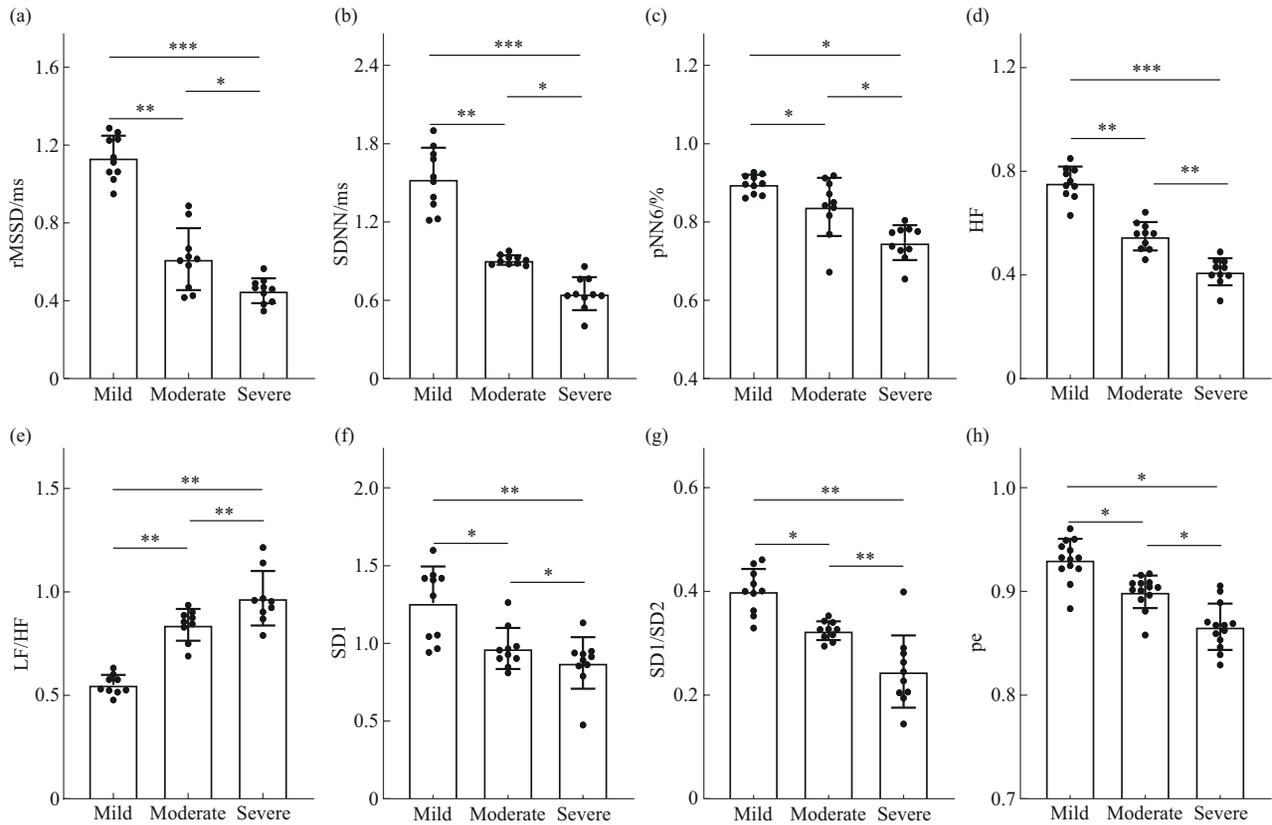
The color corresponding to the circle border indicates that the HRV parameter value of the AD group becomes larger (black) or smaller (white) relative to the WT group. When the index corresponded to the three severity levels of the disease, it indicated that the index could significantly distinguish between the three severity levels of the disease ( $P<0.05$ ).

筛选的要求不仅是 AD 组与 WT 组存在显著差异, 还需要 AD 组间差异显著以确保 HRV 可以识别不同病症程度, 经统计发现, rMSSD、pNN6、SDNN、HF、LF/HF、SD1、SD1/SD2、排列熵这 8 个指标不仅能识别出 AD 病症, 还在区分病症程度时展现出较高的显著性 (图 8,  $n=10$ ), 具有评估 AD 自主神经功能的潜力。

#### 2.4 HRV 与行为测试和局部场电位之间的相关性

在确定了 rMSSD、pNN6、SDNN、HF、LF/HF、SD1、SD1/SD2、排列熵作为识别 AD 病症程度的生物标志物后, 本研究还检查了这些生物标志物是否与 MWM 行为学测试评分和局部场电位信号震荡节律变化有关。

首先将这些 HRV 生物标志物与 AD 组行为学分数和脑电信号相关联, 计算出它们的皮尔逊相关系数。组内相关性没有达到统计学意义, 这与预期结果一致, 因为组内表现分数的范围有限。另一方面, 当将所有病症程度的 AD 组小鼠和对应月龄的 WT 组小鼠放在一起进行统计时, 发现 HRV 生物标



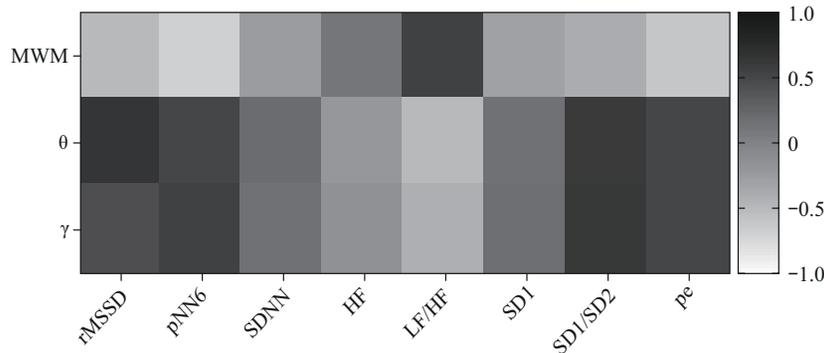
**Fig. 8 AD inter-group HRV analysis**

Comparison of HRV indicators between AD groups. (a) rMSSD; (b) SDNN; (c) pNN6; (d) HF; (e) LF/HF; (f) SD1; (g) SD1/SD2; (h) pe. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

志物与行为测试 (MWM中的平均逃避潜伏期) 和脑电节律 (LFP中的 $\theta$ 和 $\gamma$ 频段的平均能量密度) 之间存在显著相关性 (图9)。通过进一步筛选, 确定rMSSD、pNN6、LF/HF、SD1/SD2、排列熵在各层面均展示出了良好的相关性, 以进行后续研究 (相关系数和P值报告见图10)。

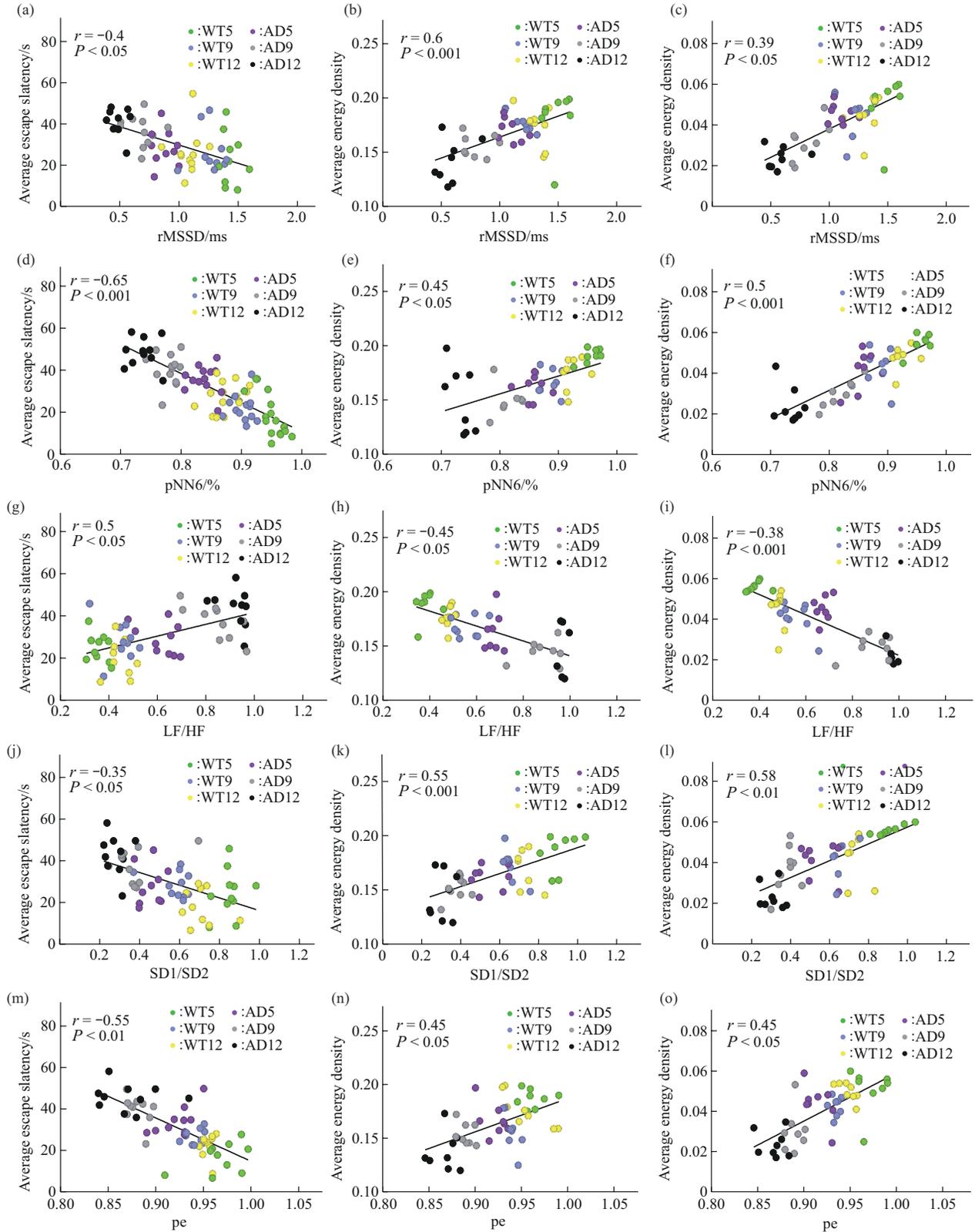
HRV生物标志物与其他生物标志物的相关性

再次证明了自主神经系统调节在AD中的重要性。AD鼠海马体病变导致的空间记忆能力和认知功能下降与海马 $\theta$ 和 $\gamma$ 节律异变均与自主神经功能紊乱相关, 此外发现, 归一化低频功率与高频比 (LF/HF) 与记忆功能测试的相关性与以往的研究一致 [32]。



**Fig. 9 Correlation analysis between HRV and MWM, theta and gamma**

White indicates a negative correlation, black indicates a positive correlation. The darker the color, the higher the correlation.



**Fig. 10** Scatter plots of correlation between HRV and MWM results and EEG energy density values in WT and AD groups (a) rMSSD&MWM; (b) rMSSD& $\theta$ ; (c) rMSSD& $\gamma$ ; (d) pNN6&MWM; (e) pNN6& $\theta$ ; (f) pNN6& $\gamma$ ; (g) LF/HF&MWM; (h) LF/HF& $\theta$ ; (i) LF/HF& $\gamma$ ; (j) SD1/SD2&MWM; (k) SD1/SD2& $\theta$ ; (l) SD1/SD2& $\gamma$ ; (m) pe&MWM; (n) pe& $\theta$ ; (o) pe& $\gamma$ .

### 2.5 HRV监测ELF-MF刺激的疗效变化

本研究将AD组小鼠分为刺激组和非刺激组，采用低强度脉冲磁场刺激仪中的40 Hz连续脉冲刺激模式治疗刺激组小鼠，刺激强度为10 mT，脉宽为6 ms，脉冲间距25 ms，2次/d，0.5 min/次。非刺激组不接受刺激。在18 d的低强度电磁刺激后分析小鼠行为学测试和海马节律的变化。结果与预期一致，电磁刺激显著改善了AD组小鼠的空间记忆功能，轻、中、重度AD组小鼠的MWM测试的平均逃避潜伏期结果均出现显著性缩短（图11， $P<0.01$ ），电磁刺激也上调了 $\theta$ 和 $\gamma$ （ $P<0.05$ ）频段的平均能量密度（图12）。但是这些检测疗效的方法都存在一定的局限性，其中MWM实验需要7 d的综合评价才能得到更具说服力的结果，且实验过程干扰因素过多，而脑电的检测是侵入性的，容易

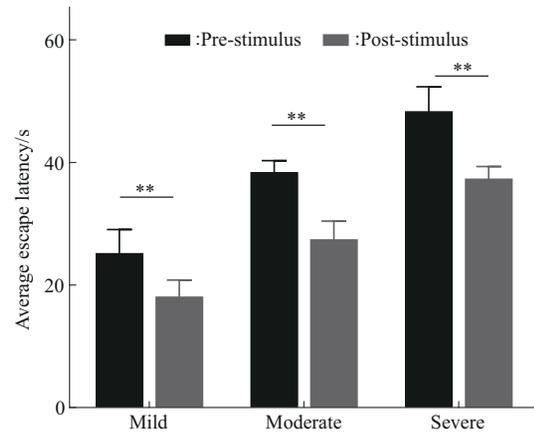


Fig. 11 Average escape latency before and after stimulation  
\*\* $P<0.01$ .

对小鼠身体造成负担，因此HRV的监测显得更加必要。

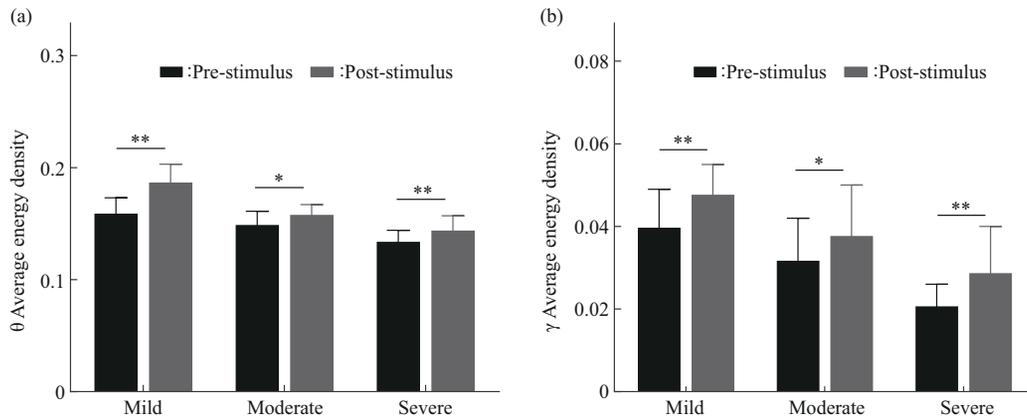


Fig. 12 Average energy density before and after stimulation

The change of energy density in  $\theta$  and  $\gamma$  bands before and after stimulation. (a)  $\theta$ ; (b)  $\gamma$ . \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

本研究在18 d的刺激过程中每天采集刺激结束后的心电信号。通过长期心电信号监测分析发现，刺激前后得到了和先前分析相似的结果，即低强度电磁刺激增强了AD小鼠模型的副交感神经活动，

抑制了异常亢奋的交感神经活动，其中rMSSD、pNN6、LF/HF、SD1/SD2、排列熵的异变均得到了显著改善（表1）。

但是进一步的研究发现，在心肌功能随着每天

Table 1 HRV before and after stimulation

	Mild		Moderate		Severe	
	Pre-stimulus	Post-stimulus	Pre-stimulus	Post-stimulus	Pre-stimulus	Post-stimulus
rMSSD/ms	1.10±0.137	1.30±0.273**	0.60±0.368	0.91±0.28**	0.45±0.168	0.79±0.268**
PNN6/%	0.89±0.014	0.94±0.024*	0.83±0.037	0.90±0.03**	0.74±0.063	0.87±0.027**
LF/HF	0.53±0.157	0.46±0.126*	0.84±0.156	0.62±0.11**	0.96±0.240	0.80±0.152**
SD1/SD2	0.39±0.14	0.59±0.37***	0.33±0.25	0.47±0.26**	0.24±0.17	0.22±0.42
pe	0.93±0.021	0.99±0.109*	0.89±0.004	0.95±0.11*	0.86±0.146	0.93±0.031**

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

的电磁刺激稳步改善的同时, 自主神经功能的调节障碍在第13天左右出现改善迟缓甚至反弹的反作用效果 (图13), 尤其重度病症反弹曲线明显。另

外从结果中可以初步判断, 该刺激模式的实际有效干预时间在1~14 d, 这种细节是无法在任何行为学测试和侵入性脑电测试中及时发现的。

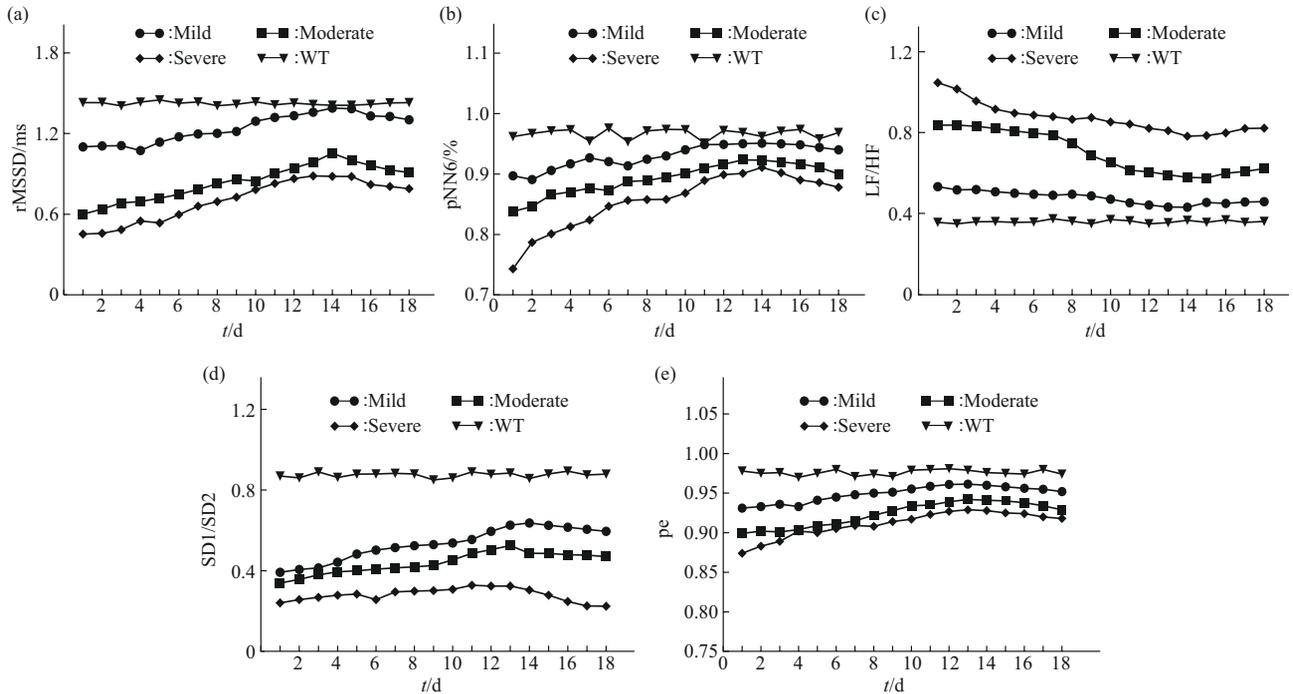


Fig. 13 The change of 18-day HRV index in the AD stimulation group compared with that in the WT group

(a) rMSSD; (b) pNN6; (c) LF/HF; (d) SD1/SD2; (e) pe.

### 3 讨 论

本研究基于单因素方差分析对HRV的时域、频域以及非线性指标进行筛选, 基于皮尔逊相关系数针对有效HRV指标进行与其他可靠生物标志物的相关性分析, 通过对比HRV长时间(18 d)的监测与其他生物标志物对ELF-MF干预效果的反映情况, 讨论HRV作为新的生物标志物引导AD磁刺激研究技术的可靠性。

行为学结果表明, AD模型鼠普遍要比相同月龄的WT鼠花费更多的时间才能找到平台位置, 且随着月龄的增大, 学习能力也越来越差, 这证明了AD模型小鼠的认知功能出现障碍<sup>[33]</sup>。小鼠在水迷宫中定位航行的探索能力及找到平台的时间快慢反映了空间记忆能力, 而6 d的逃避潜伏期变化快慢又反应了小鼠的学习能力<sup>[34]</sup>, 从刺激后的行为学结果可以看出, AD小鼠的6 d平均逃避潜伏期显著缩短, 这也进一步证明本研究使用的刺激模式针对AD小鼠有着显著的治疗效果, 先前有研究表

明, ELF-MF这种刺激明显提高海马区神经元存活率, 增强小鼠的空间记忆学习能力<sup>[16]</sup>, 与本研究结果具有一致性。

脑电小波变换时频分析从神经振荡的角度探究ELF-MF刺激前后AD小鼠海马CA1区LFP信号节律震荡的变化情况, 这种节律振荡活动与依赖于海马的空间记忆与学习能力密切相关。其中本研究得到的结果表明, AD小鼠 $\theta$ 和 $\gamma$ 频段的节律性震荡出现异常, 平均能量密度发生相对于WT组小鼠发生显著衰减, 经过ELM-MF刺激后, AD小鼠 $\theta$ 和 $\gamma$ 频段的平均能量密度显著提高, 这表明ELF-MF增强了AD小鼠海马神经组织区域中神经元聚合电活动<sup>[35]</sup>。

心电的大面积分析得到了有效的HRV区分指标, 本研究发现AD小鼠的心电发生异常, 自主神经功能失调。也有研究表明, 心电信号中HRV与认知能力下降和痴呆的风险增加有关<sup>[36]</sup>, 其时频域指标在与认知相关的疾病检测中得到广泛应用<sup>[37-38]</sup>。本研究使用单因素方差分析, 对大量的心

电结果进行统计分析,发现 rMSSD、pNN6、SDNN、HF、LF/HF、SD1、SD1/SD2、排列熵相对于其他指标具有更敏感的区别效果,可以区分 AD 和 WT 的同时,划分出病症程度。得到可以初步诊断 AD 小鼠病症的指标之后,更进一步地,本研究使用皮尔逊相关性分析发现, rMSSD、pNN6、LF/HF、SD1/SD2、排列熵在与行为学和脑电结果的相关性分析中均展示出了良好的相关性。相关性分析可以展示出各种病理特征的内在联系,先前的研究表明,HRV 与总体认知功能表现呈负相关<sup>[39]</sup>,而本研究不仅证实了 HRV 与行为变化之间的相关性,还发现了 HRV 与海马节律振荡变化的相关性联系,这与心脑在 AD 中的协同作用有关。接下来对 18 d 刺激过程的监测结果进行分析发现,刺激效果存在“反弹阈”,大致在 13、14 d 时 ELF-MF 不再有效甚至出现反作用效果,这在行为学和脑电结果中都是不易发现的,因此更证明了本实验研究结果的有效性,HRV 具有引导 AD 刺激干预技术的潜力。

AD 逐渐被认为是一种全身性疾病,关联到大脑的所有部位,包括控制 HRV 的神经解剖结构,并解释了自主神经功能下降与认知功能下降之间已建立的关系<sup>[40]</sup>,HRV 由心脏自主神经系统与心脏、大脑相互作用共同产生,受交感神经和副交感神经的双重神经支配,其发生机制十分复杂<sup>[41-42]</sup>。心脑之间的相互作用不断影响着疾病的发展<sup>[43]</sup>,纵向 HRV 测量正在成为监测疾病进展和治疗反应的一种有用方法<sup>[44]</sup>。除了公认的细胞外  $\beta$  淀粉样蛋白 ( $A\beta$ ) 沉淀和细胞内 tau 蛋白积累是标志性病理表现,与海马相关的空间记忆障碍也是 AD 患者的早期临床症状之一,先前关于心脑轴的研究都涉及皮质和皮质下前脑<sup>[45]</sup>,而忽略了海马神经元的研究,在 AD 患者大脑的海马体和心脏中都存在  $A\beta$  病变<sup>[46]</sup>,该病变导致海马体神经元损伤,使神经传递受损,从而影响震荡节律产生变化<sup>[47]</sup>。本研究根据实验结果猜测,心脏中存在相似的致病机制,导致心率变异性和脑电发生相关性变化,这为人们探索海马神经元放电在心脑轴中的作用提供了研究基础。本研究的缺陷在于实验仅限于对 APP/PS1 型 AD 模型鼠的病症程度划分,缺乏临床支持,未能对其他临床类型的 AD 进行精确区分,但是我们从多生理角度与 HRV 建立了相关性联系,为 HRV 临床上区分不同痴呆亚型提供了研究基础,同时心率变异性作为生物反馈标志物的研究也为治

疗 AD 提供了新的途径。

## 4 结 论

本文旨在探究 HRV 生物标志物诊断和引导 AD 磁刺激干预技术的可能性。本研究的独特之处在于纵向数据涵盖了刺激干预从头到尾的整个过程,并首次从行为-脑-心 3 个维度综合评估 AD 疾病和刺激效果。在这项研究中,利用 MWM 实验数据将 AD 模型鼠划分为轻度、中度、重度痴呆,进行大量数据分析工作后确定 rMSSD、pNN6、HF、LF/HF、SD1/SD2、排列熵作为识别 AD 病症程度的心率变异性生物标志物,并通过 HRV 与行为测试和海马体局部场电位的相关性研究证实了自主神经功能紊乱在 AD 中的重要协调作用,挖掘出 HRV 作为生物电生理标志物日常监测低强度电磁刺激疗效的可能性,发现心电比其他生物标志物能更快速、便捷、敏感且无创地量化疗效评估,从而为更进一步的引导干预提供研究基础。

## 参 考 文 献

- [1] Feng Y S, Tan Z X, Wu L Y, *et al.* The involvement of NL-RP3 inflammasome in the treatment of Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 2020, **64**: 101192
- [2] Zhang Y, Li Y, Ma L. Recent advances in research on Alzheimer's disease in China. *J Clin Neurosci*, 2020, **81**: 43-46
- [3] Tulbă D, Cozma L, Popescu B O, *et al.* Dysautonomia in Alzheimer's disease. *Medicina (Kaunas)*, 2020, **56**(7): 337
- [4] De Vilhena Toledo M A, Junqueira L F. Cardiac sympathovagal modulation evaluated by short-term heart interval variability is subtly impaired in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int*, 2008, **8**(2): 109-118
- [5] Cheng Y C, Huang Y C, Huang W L. Heart rate variability in patients with dementia or neurocognitive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Aust N Z J Psychiatry*, 2022, **56**(1): 16-27
- [6] 陈尔冬,周菁. 心率变异性的研究及应用进展. *心血管病学进展*, 2014, **35**(4): 435-439  
Chen E D, Zhou J. *Adv Cardiovasc Dis*, 2014, **35**(4): 435-439
- [7] Geng D, Liu X, Wang Y, *et al.* The effect of transcutaneous auricular vagus nerve stimulation on HRV in healthy young people. *PLoS One*, 2022, **17**(2): e0263833
- [8] Alvares G A, Quintana D S, Hickie I B, *et al.* Autonomic nervous system dysfunction in psychiatric disorders and the impact of psychotropic medications: a systematic review and meta-analysis. *J Psychiatry Neurosci*, 2016, **41**(2): 89-104
- [9] Kim M S, Yoon J H, Hong J M. Early differentiation of dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease: heart rate variability at mild cognitive impairment stage. *Clin Neurophysiol*, 2018,

- 129(8): 1570-1578
- [10] Imbimbo C, Spallazzi M, Ferrari-Pellegrini F, *et al.* Heart rate variability and cognitive performance in adults with cardiovascular risk. *Cereb Circ Cogn Behav*, 2022, **3**: 100136
- [11] Nair S S, Govindankutty M M, Balakrishnan M, *et al.* Investigation of autonomic dysfunction in Alzheimer's disease—a computational model-based approach. *Brain Sci*, 2023, **13**(9): 1322
- [12] Min J, Rouanet J, Martini A C, *et al.* Modulating heart rate oscillation affects plasma amyloid beta and tau levels in younger and older adults. *Sci Rep*, 2023, **13**(1): 3967
- [13] Cuccurazzu B, Leone L, Podda M V, *et al.* Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice. *Exp Neurol*, 2010, **226**(1): 173-182
- [14] Akbarnejad Z, Esmailpour K, Shabani M, *et al.* Spatial memory recovery in Alzheimer's rat model by electromagnetic field exposure. *Int J Neurosci*, 2018, **128**(8): 691-696
- [15] Podda M V, Leone L, Barbati S A, *et al.* Extremely low-frequency electromagnetic fields enhance the survival of newborn neurons in the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci*, 2014, **39**(6): 893-903
- [16] Bromley-Brits K, Deng Y, Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp*, 2011(53): 2920
- [17] Inostroza M, Binder S, Born J. Sleep-dependency of episodic-like memory consolidation in rats. *Behav Brain Res*, 2013, **237**: 15-22
- [18] 张力新, 王发颀, 王玲, 等. 认知功能研究中神经振荡交叉节律耦合应用研究进展. *生理学报*, 2017, **69**(6): 805-816  
Zhang L X, Wang F Q, Wang L, *et al.* *Acta Physiol Sin*, 2017, **69**(6): 805-816
- [19] Fernández A, Noce G, Del Percio C, *et al.* Resting state electroencephalographic rhythms are affected by immediately preceding memory demands in cognitively unimpaired elderly and patients with mild cognitive impairment. *Front Aging Neurosci*, 2022, **14**: 907130
- [20] Liu T, Bai W, Wang J, *et al.* An aberrant link between gamma oscillation and functional connectivity in A $\beta$ 1-42-mediated memory deficits in rats. *Behav Brain Res*, 2016, **297**: 51-58
- [21] Menardi A, Rossi S, Koch G, *et al.* Toward noninvasive brain stimulation 2.0 in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 2022, **75**: 101555
- [22] van Rooij S J H, Arulpragasam A R, McDonald W M, *et al.* Accelerated TMS - moving quickly into the future of depression treatment. *Neuropsychopharmacology*, 2024, **49**(1): 128-137
- [23] Geng D, Wang Y, Gao Z, *et al.* Effects of Alzheimer's disease of varying severity on cardiac and autonomic function. *Braz J Med Biol Res*, 2022, **55**: e11504
- [24] Yiu A P, Rashid A J, Josselyn S A. Increasing CREB function in the CA1 region of dorsal hippocampus rescues the spatial memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, 2011, **36**(11): 2169-2186
- [25] 贾亚泉, 宋军营, 曾华辉, 等. 阿尔茨海默病动物模型研究进展. *中国实验动物学报*, 2021, **29**(3): 381-386  
Jia Y Q, Song J Y, Zeng H H, *et al.* *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2021, **29**(3): 381-386
- [26] 陈泽龙, 谢康宁. 基于脑电 EEG 信号的分析分类方法. *中国医学装备*, 2019, **16**(12): 151-158  
Chen Z L, Xie K N. *China Med Equip*, 2019, **16**(12): 151-158
- [27] Komorowski D, Pietraszek S. The use of continuous wavelet transform based on the fast Fourier transform in the analysis of multi-channel electrogastrography recordings. *J Med Syst*, 2016, **40**(1): 10
- [28] 赵宪林, 方秀斌, 李东培. 大鼠血管性痴呆模型制作. *中国医科大学学报*, 2002, **31**(3): 166-167, 176  
Zhao X L, Fang X B, Li D P. *J China Med Univ*, 2002, **31**(3): 166-167, 176
- [29] Shaffer F, Ginsberg J P. An overview of heart rate variability metrics and norms. *Front Public Health*, 2017, **5**: 258
- [30] Toledo M A, Junqueira L F. Cardiac autonomic modulation and cognitive status in Alzheimer's disease. *Clin Auton Res*, 2010, **20**(1): 11-17
- [31] Electrophysiology Task Force of the European Society of Cardiology the North A. Heart rate variability. *Circulation*, 1996, **93**(5): 1043-1065
- [32] Nicolini P, Mari D, Abbate C, *et al.* Autonomic function in amnesic and non-amnesic mild cognitive impairment: spectral heart rate variability analysis provides evidence for a brain-heart axis. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 11661
- [33] Qing H, He G, Ly P T T, *et al.* Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med*, 2008, **205**(12): 2781-2789
- [34] Morris R G M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv*, 1981, **12**(2): 239-260
- [35] Mondragón-Rodríguez S, Gu N, Fasano C, *et al.* Functional connectivity between hippocampus and lateral septum is affected in very young Alzheimer's transgenic mouse model. *Neuroscience*, 2019, **401**: 96-105
- [36] Turdi S, Guo R, Huff A F, *et al.* Cardiomyocyte contractile dysfunction in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 2009, **4**(6): e6033
- [37] Lin F, Ren P, Wang X, *et al.* Cortical thickness is associated with altered autonomic function in cognitively impaired and non-impaired older adults. *J Physiol*, 2017, **595**(22): 6969-6978
- [38] da Silva V P, Ramalho Oliveira B R, Tavares Mello R G, *et al.* Heart rate variability indexes in dementia: a systematic review with a quantitative analysis. *Curr Alzheimer Res*, 2018, **15**(1): 80-88
- [39] Zeki A I Hazzouri A, Haan M N, Deng Y, *et al.* Reduced heart rate variability is associated with worse cognitive performance in elderly Mexican Americans. *Hypertension*, 2014, **63**(1): 181-187

- [40] Allan L M. Diagnosis and management of autonomic dysfunction in dementia syndromes. *Curr Treat Options Neurol*, 2019, **21**(8): 38
- [41] Tiwari R, Kumar R, Malik S, *et al.* Analysis of heart rate variability and implication of different factors on heart rate variability. *Curr Cardiol Rev*, 2021, **17**(5): e160721189770
- [42] Malhotra V, Thakare AE, Hulke S M, *et al.* Effect of head down tilt on heart rate variability. *J Family Med Prim Care*, 2021, **10**(1): 439-442
- [43] Ottaviani C. Brain-heart interaction in perseverative cognition. *Psychophysiology*, 2018, **55**(7): e13082
- [44] Attreed A, Morand L R, Pond D C, *et al.* The clinical role of heart rate variability assessment in cognitively impaired patients and its applicability in community care settings: a systematic review of the literature. *Cureus*, 2024, **16**(6): e61703
- [45] Catrambone V, Valenza G. Microstates of the cortical brain-heart axis. *Hum Brain Mapp*, 2023, **44**(17): 5846-5857
- [46] Bo W, Cai M, Ma Y, *et al.* Manipulation of glutamatergic neuronal activity in the primary motor cortex regulates cardiac function in normal and myocardial infarction mice. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, **11**(20): e2305581
- [47] Troncone L, Luciani M, Coggins M, *et al.* A $\beta$  amyloid pathology affects the hearts of patients with Alzheimer's disease: mind the heart. *J Am Coll Cardiol*, 2016, **68**(22): 2395-2407

## Research on Magnetic Stimulation Intervention Technology for Alzheimer's Disease Guided by Heart Rate Variability\*

CHEN Shu-Ting<sup>1)</sup>, GENG Du-Yan<sup>2,4)\*\*</sup>, FAN Chun-Meng<sup>3)</sup>, ZHENG Wei-Ran<sup>4)</sup>, XU Gui-Zhi<sup>2,4)</sup>

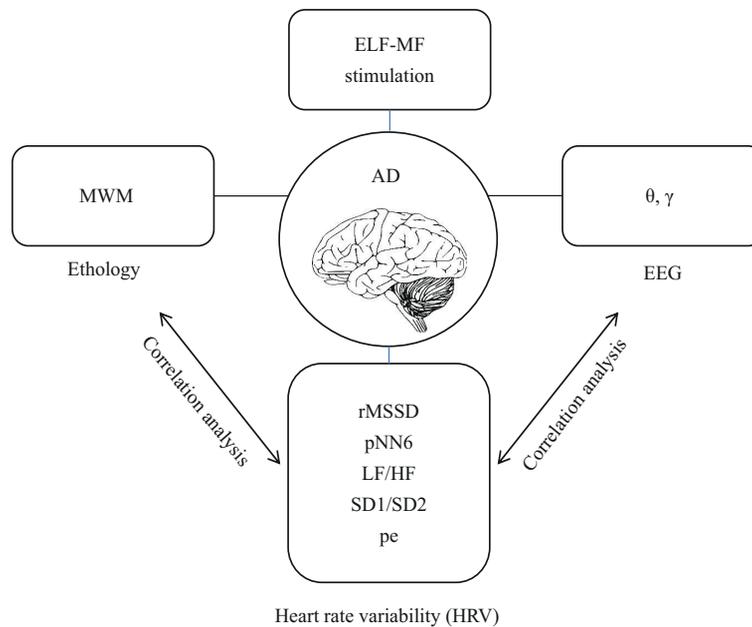
<sup>1)</sup>School of Life Science and Health Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300072, China;

<sup>2)</sup>State Key Laboratory of Intelligent Power Distribution Equipment and System, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

<sup>3)</sup>School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

<sup>4)</sup>School of Electrical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300072, China)

### Graphical abstract



Diagnosis of AD, division of disease course and quantification of magnetic stimulation intervention effect

**Abstract Objective** Non-invasive magnetic stimulation technology has been widely used in the treatment of Alzheimer's disease (AD), but there is a lack of convenient and timely methods for evaluating and providing feedback on the effectiveness of the stimulation, which can be used to guide the adjustment of the stimulation protocol. This study aims to explore the possibility of heart rate variability (HRV) in diagnosing AD and guiding

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (52277230), National Key R&D Program of China (2022YFC2402203), and S&T Program of Hebei (24464401D).

\*\* Corresponding author.

Tel: 86-13602131861, E-mail: dygeng@hebut.edu.cn

Received: November 8, 2024 Accepted: February 20, 2025

AD magnetic stimulation intervention techniques. **Methods** In this study, we used a 40 Hz, 10 mT pulsed magnetic field to expose AD mouse models to whole-body exposure for 18 d, and detected the behavioral and electroencephalographic signals before and after exposure, as well as the instant electrocardiographic signals after exposure every day. **Results** Using one-way ANOVA and Pearson correlation coefficient analysis, we found that some HRV indicators could identify AD mouse models as accurately as behavioral and electroencephalogram (EEG) changes ( $P<0.05$ ) and significantly distinguish the severity of the disease ( $P<0.05$ ), including rMSSD, pNN6, LF/HF, SD1/SD2, and entropy arrangement. These HRV indicators showed good correlation and statistical significance with behavioral and EEG changes ( $r>0.3$ ,  $P<0.05$ ); HRV indicators were significantly modulated by the magnetic field exposure before and after the exposure, both of which were observed in the continuous changes of electrocardiogram (ECG) ( $P<0.05$ ), and the trend of the stimulation effect was more accurately observed in the continuous changes of ECG. **Conclusion** HRV can accurately reflect the pathophysiological changes and disease degree, quickly evaluate the effect of magnetic stimulation, and has the potential to guide the pattern of magnetic exposure, providing a new idea for the study of personalized electromagnetic neuroregulation technology for brain diseases.

**Key words** Alzheimer's disease, heart rate variability, magnetic stimulation, behavioral experiments, EEG

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0465

**CSTR:** 32369.14.pibb.20240465