



## 复合频率刺激对后肢去负荷小鼠海马齿状回区 颗粒神经元作用的电生理研究\*

赵峻峻<sup>1,2)</sup> 朱明强<sup>1,2)</sup> 朱海军<sup>4)</sup> 付蕊<sup>1,2,3)</sup> 张泽<sup>1,2)</sup> 王佳乐<sup>1,2)</sup> 丁冲<sup>1,2,3)\*\*</sup>

<sup>(1)</sup> 河北工业大学生命科学与健康工程学院, 天津 300130; <sup>(2)</sup> 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;

<sup>(3)</sup> 省部共建电工装备可靠性与智能化国家重点实验室(河北工业大学), 天津 300130;

<sup>(4)</sup> 河北省数字医疗工程重点实验室(河北大学), 保定 071002

**摘要** 近年来,失重环境对航天员神经系统造成的负面影响受到广泛关注。重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)技术对神经、精神类疾病的治疗效果有着显著积极影响。复合频率(不同频率刺激模式组成)的rTMS对由失重环境引起的神经系统功能障碍的改善作用仍有待深入研究。探索复合频率刺激(combined frequency stimulation, CFS)对失重环境造成的多种神经系统疾病的治疗效果以及电生理机制,对于脑科学及磁刺激的临床应用具有重要意义。**方法** 本研究采用40只C57BL/6小鼠,所有小鼠随机分为5组:假刺激组、后肢去负荷(HU)组、10 Hz组、20 Hz组和CFS(10 Hz+20 Hz, CFS)组。对除sham组以外的小鼠建立维持14 d的模拟失重效应并同期进行14 d的rTMS。通过蔗糖偏好实验和水迷宫实验验证CFS对负面情绪和空间认知能力的改善效果。最后,通过膜片钳技术记录海马齿状回(dentate gyrus, DG)颗粒神经元的动作电位、静息膜电位以及离子通道的动力学特性。**结果** 行为学结果表明,CFS(10 Hz+20 Hz)显著改善了模拟失重小鼠的认知障碍和负面情绪;电生理实验结果显示,HU操作后小鼠海马DG区颗粒神经元的兴奋性降低,而CFS显著提高了神经元的兴奋性并改善了电压门控Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>通道的动力学特性。**结论** 复合频率的rTMS(10 Hz+20 Hz)能够有效地改善模拟失重小鼠的认知障碍和负面情绪,这种改善可能与CFS对神经元兴奋性以及Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>通道动力学特性的影响有关。因此,本文有望为CFS改善失重环境下所产生的空间认知和负面情绪障碍提供理论依据。

**关键词** 复合频率刺激,重复经颅磁刺激,后肢去负荷,空间认知障碍,负面情绪,神经元兴奋性,离子通道

**中图分类号** Q424, R853.22, R856.74

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0431

在航天任务过程中,微重力是航天员健康的主要威胁之一<sup>[1]</sup>。研究发现,航天员在太空飞行过程中认知功能和身体协调性都会发生变化<sup>[2]</sup>,并且还会产生紧张、抑郁、烦躁和焦虑等负面情绪<sup>[3]</sup>。在对4名航天员在太空飞行前后生理状态的记录中发现,在太空任务结束后,航天员的数字符号替换和数字识别反应速度减慢<sup>[4]</sup>。通过在国际空间站平均工作了6个月的12名宇航员在飞行前、飞行后的10 d和7个月后的随访时间点接受核磁共振扫描仪的扫描,发现长时间太空飞行导致特定的白质束的结构发生变化<sup>[5]</sup>。因此航天任务对航天员的神经系统构成了严峻的挑战。

头低位卧床(head down bed rest, HDBR)是

一种模拟人类失重的方法,其生理状态的变化与微重力环境非常相似<sup>[6]</sup>。通过一段时间的HDBR模拟方法,受试者的情绪和执行功能等神经活动会受到很大影响<sup>[7-9]</sup>。在考虑研究成本以及被试者健康等问题,多数地面模拟微重力环境的研究更依赖于动物实验,研究者广泛使用大鼠和小鼠后肢去负荷(hindlimb unloading, HU)模型<sup>[10]</sup>。通过对HU操作后的大鼠进行行为学测试,结果表明,这些动物表现出抑郁和焦虑等行为特征<sup>[11-12]</sup>。此外,多篇研

\* 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。

\*\* 通讯联系人。

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

收稿日期: 2023-11-06, 接受日期: 2024-02-04

究报道, HU操作2周及以上的大鼠在空间定向实验中显示出空间注意力受损的现象<sup>[13-14]</sup>。模拟微重力环境对人类和大鼠的神经系统具有潜在影响。然而, 具体的机制和原因尚未在神经元水平上阐明。

海马脑区是哺乳动物完成学习和记忆的重要生理结构。海马为层次状结构, 主要包括齿状回(dentate gyrus, DG), 在横断面上海马又分为CA1、CA2和CA3区, 其中DG区不仅被认为是信息进入海马的传入点, 也是完成信息处理和整合的重要部位, 在空间感知和记忆中起着重要作用。并且动物研究表明, DG区与情绪调节紧密相关, 小鼠经过HU操作处理后, DG环路的神经节律与能量代谢均发生改变, 这些变化对HU小鼠的谷氨酸能系统和情绪行为产生了显著影响<sup>[10, 15]</sup>。

重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)技术作为一种非侵入性的脑刺激技术, 在探索大脑认知功能和治疗神经疾病方面引起了广泛的关注, 具有重要的临床价值<sup>[16-17]</sup>。研究发现, 在抑郁症、焦虑症、认知障碍等精神和神经疾病的治疗中, rTMS已经取得了显著的疗效, 被世界各地的临床医生广泛应用<sup>[18]</sup>, 进一步证实了这一技术的临床有效性<sup>[19-20]</sup>。尽管rTMS在特定频率下的刺激方式已经取得了重要的成果, 但对于不同频率刺激相结合的研究还相对较少<sup>[21-23]</sup>。

在本研究中, 利用HU小鼠模型, 针对HU操作后产生的空间认知障碍及负性情绪, 通过复合频率刺激(combined frequency simulation, CFS), 即两种频率组合的形式对HU操作后的小鼠进行刺激, 探究可能产生的更为显著和全面的治疗效应。本研究旨在深入探究CFS在HU小鼠模型中的作用机制。通过结合行为学实验和电生理技术, 系统研究CFS对尾吊小鼠神经元兴奋性和离子通道动力学特性的影响。为CFS模式提供科学依据和理论支撑, 具有重要的学术价值和临床应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

实验动物为40只7周龄雄性C57BL/6品系小鼠, 购买自北京华阜康生物科技有限公司。小鼠先接受1周的适应性饲养, 饲养环境保持恒温( $(24\pm 1)^\circ\text{C}$ ), 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40只小鼠被随机分为5组: 假刺激组、HU组、10 Hz组、20 Hz组以及

CFS组, 各组按实验计划在第1~14天分别接受伪刺激、HU、HU+rTMS刺激, 在第15~18天接受蔗糖偏好测试, 在第19~24天接受水迷宫测试。在第25天开始进行电生理实验。该动物实验全部过程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), 符合实验动物使用规范。

### 1.2 后肢去负荷(HU)模型

HU模型参考先前的研究建立<sup>[24]</sup>。尾吊笼是由有机玻璃材质制作, 规格为25 cm×25 cm×30 cm。小鼠尾部被医用胶带固定, 悬挂在尾吊笼顶部的滑杆上。具体操作如下: 抓取小鼠, 引导其进入束缚装置, 保证其尾巴全部暴露在装置外, 待其适应一段时间后, 先使用棉球蘸取75%酒精擦拭小鼠尾巴, 之后使用医用胶带沿着尾巴往末端方向进行黏附, 然后使用胶带横向固定住小鼠尾巴的根部和末端, 靠近尾巴末的胶带一端与鼠笼挂链连接, 挂链通过滑轮悬挂在鼠笼顶部水平滑杆上, 抬起小鼠使其后肢悬空, 并进一步通过调节挂链长度来调节小鼠躯体与水平面的倾斜角度到30°角左右。确保被悬吊的小鼠能沿着滑杆自由来回活动, 且能容易地获取食物和饮用水(图1)。

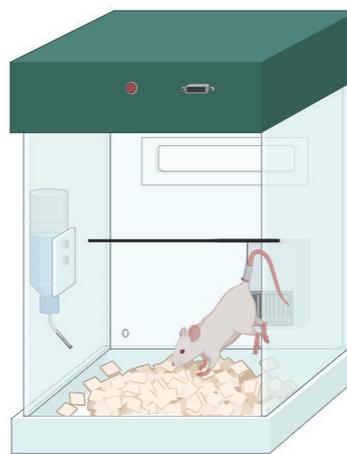


Fig. 1 Hindlimb unloading model

### 1.3 运动阈值检测

运动阈值(motor threshold, MT)的操作具体步骤与之前的研究相似<sup>[25]</sup>。rTMS仪器为武汉依瑞德科技公司生产的CCY-IA型刺激仪, 刺激线圈为标准动物圆形线圈, 尺寸为64 mm×30 mm, 线圈外径为56 mm, 内径为14 mm, 高度为23 mm, 最

大磁场输出为3.6 T。首先将小鼠放在立体定向仪上(非金属材料制成),保持小鼠能正常吸入低剂量麻醉剂的姿势(图2a),然后将刺激线圈放置在距离小鼠头部0.5 cm的位置(图2b),观察小鼠的

抽搐情况。测量结果显示,当小鼠出现明显的肢体抽搐时,刺激强度集中在12%左右,与0.43 T的磁场强度相对应。

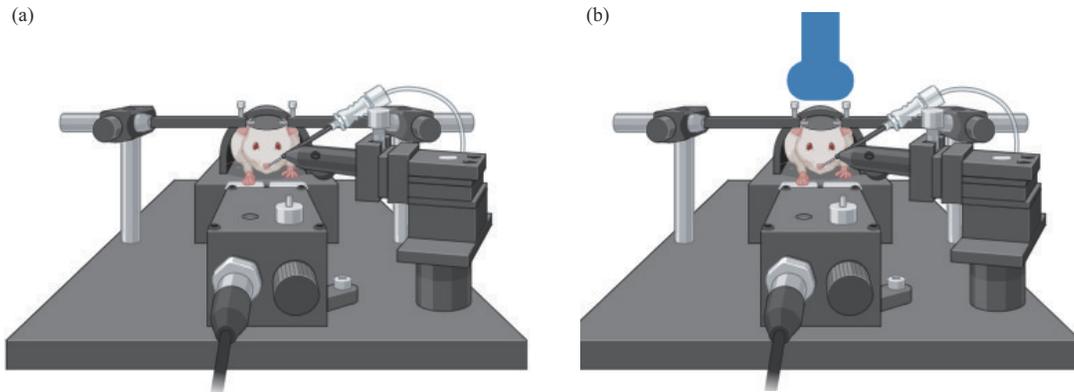


Fig. 2 Measurement of motor threshold in mice

(a) Putting mice under anesthesia. (b) MT test.

#### 1.4 重复经颅磁刺激 (rTMS)

小鼠的MT确定后,研究使用的磁刺激强度也基于此确定,3个刺激组强度均选择为80% MT,刺激脉冲数均为1 000个。在以往改善啮齿类动物认知障碍研究中,20 Hz是一个作用效果较好的频率<sup>[26]</sup>。第二个刺激频率选择为10 Hz,同样,这是基于以往的关于rTMS改善负性情绪研究来选择使用较多且效果较好的刺激频率<sup>[27]</sup>。第3个刺激频率为10 Hz与20 Hz交替的复合频率(在下文中简称CFS),具体组合方式为:以100个脉冲为一个刺激序列,两种频率各设置5个序列,每执行完一个序列,由设备自动切换至另一频率刺激序列,依次交替直至所有刺激序列执行完毕。线圈平行于小鼠顶骨,放置于头皮表面之上2~3 mm处。3个刺激组小鼠在每天8:00~11:00期间接受刺激,刺激持续14 d。sham组和HU组接受伪刺激,线圈离小鼠头部保持较远距离,但能接收到磁刺激产生的噪声干扰。具体刺激程序设置如图3所示。

#### 1.5 蔗糖偏好实验

蔗糖偏好实验(sucrose preference test, SPT)是评估动物快感缺失症状、成瘾和抑制剂水平的有效技术手段<sup>[27-28]</sup>。蔗糖偏好实验包括适应和测试两个阶段,为期4 d。在第一阶段,每天8:00起在每只小鼠饲养笼的供水位置固定放置两个装有1%蔗糖溶液和普通水的饮水瓶,每12 h交换一次饮水

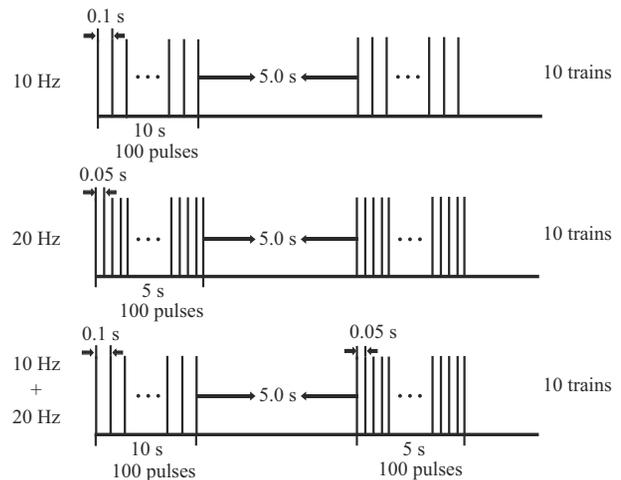


Fig. 3 Stimulation program settings

瓶的位置,连续2 d。第3天8:00,禁止饮水和进食,并清除所有水和食物。实验前称量并记录蔗糖水和普通水的质量,然后给每只小鼠饮用1%的蔗糖溶液和普通水,同时恢复食物供应,3 h后交换两种饮用水。再次称重记录此时蔗糖水和普通水质量。蔗糖偏好指数计算方式如下:

$$\text{偏好指数} = \frac{\text{糖水消耗量}}{\text{糖水消耗量} + \text{普通水消耗量}}$$

其中消耗量为测试前与测试结束后质量的差值,单位为克(g)。

## 1.6 水迷宫实验

设备主体为直径 1.2 m 的圆柱体水池。水池被划分成 4 个象限区域, 在每个区域的液面上方池壁处粘贴有特定的标记物。求生平台的台面直径 5 cm, 置于水面以下 1 cm 处。小鼠在池中的活动由正上方的摄像头识别追踪, 实验数据由配套软件记录。

在第一阶段, 从平台对侧象限开始, 将小鼠面朝池壁放入水中, 开启摄像机跟踪系统, 软件自动记录小鼠入水后的运动轨迹和找到隐藏平台的时间 (s), 这一时间记为逃避潜伏期。设置时长为 60 s 的限时, 若小鼠在此期间内没能找到隐藏平台并停留, 则由实验人员辅助其找到平台并停留 15 s 左右来熟悉记忆平台位置。然后依次在平台象限相邻象限各进行一次训练, 最后在对侧象限重复一次, 连续训练 5 d。第 6 天进行空间探索测试, 测试开始前将隐藏平台移出, 将小鼠从对侧象限面朝池壁放入水中, 开启摄像跟踪, 记录小鼠在 60 s 内的运动轨迹, 实验系统记录小鼠在原平台所在象限停留时间和穿越原平台位置次数。

## 1.7 电生理实验

### 1.7.1 脑片制备

行为学实验完成之后, 通过麻醉处死小鼠, 在 60 s 内取出完整的大脑, 并放入 4°C 的冰水混合切片溶液内 2~3 min 进行降温, 随后取出大脑, 切去大脑的前额叶和小脑尾端进行修整, 将修整后的大脑粘在振动切片机盛放槽内, 用滤纸吸干其表面水分, 并使用振动切片机 (Leica, VT1000S) 切割 300  $\mu\text{m}$  厚的冠状切片, 保留有完整海马脑区的切片, 并用吸管转移至充满标准人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 的孵育槽中进行孵育, 温度保持在 28°C, 通氧 (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) 30 min。外部和内部溶液包括 ACSF、动作电位 (action potential, AP) 电极内液 (internal solution of AP)、钠离子通道电极内液 (internal solution of  $I_{\text{Na}}$ )、钠离子通道电极外液 (external solution of  $I_{\text{Na}}$ )、钾离子通道电极内液 (internal solution of  $I_{\text{A}}$  and  $I_{\text{K}}$ )、钾离子通道电极外液 (external solution of  $I_{\text{A}}$  and  $I_{\text{K}}$ ) 及切片液 (cutting solution), 各溶液成分如表 1。

Table 1 Solution formulation

Solution	Composition ( $c/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ )	pH
ACSF	$\text{CaCl}_2$ (3), $\text{NaCl}$ (125), $\text{KCl}$ (4), $\text{MgCl}_2$ (3), $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1.635), $\text{NaHCO}_3$ (28), HEPES (5), glucose (11)	7.4 (NaOH)
Internal solution of AP	K-gluconate (126), $\text{NaCl}$ (16), $\text{MgCl}_2$ (3), $\text{CaCl}_2$ (1.5), EGTA (12), HEPES (11), Na-ATP (4), Na-GTP (0.4)	7.4 (KOH)
External solution of $I_{\text{Na}}$	$\text{KCl}$ (3), $\text{NaCl}$ (130), $\text{CaCl}_2$ (2), $\text{MgCl}_2$ (2), HEPES (10), 4-AP (3), glucose (10), TEA-Cl (25), $\text{CdCl}_2$ (0.2)	7.4 (KOH)
Internal solution of $I_{\text{Na}}$	$\text{MgCl}_2$ (2), CsCl (140), EGTA (10), HEPES (10), Mg-ATP (2)	7.4 (CsOH)
External solution of $I_{\text{A}}$ and $I_{\text{K}}$	$\text{KCl}$ (6), $\text{NaCl}$ (128), $\text{CaCl}_2$ (3), $\text{MgCl}_2$ (2), glucose (10), HEPES (11), TTX (0.001), $\text{CdCl}_2$ (0.2)	7.4 (NaOH)
Internal solution of $I_{\text{A}}$ and $I_{\text{K}}$	$\text{KCl}$ (144), $\text{MgCl}_2$ (4), EGTA (12), HEPES (12), Mg-ATP (3)	7.4 (KOH)
Cutting solution	$\text{MgCl}_2$ (7), $\text{CaCl}_2$ (2), $\text{KCl}$ (3), $\text{NaHCO}_3$ (28), $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (1.655), glucose (13), sucrose (220)	7.4 (NaOH)

### 1.7.2 电生理实验操作

脑片孵育 30 min 后, 使用吸管轻轻将脑片吸入吸管内并缓慢放入盛放脑片的培养皿内, 将盖网轻盖住脑片防止发生位置偏移。随后将脑片培养皿放置在倒置显微镜下寻找到 DG 颗粒神经元, 将电极内液注射到拉制好的玻璃电极中, 在 Patchmaster 观察玻璃电极的入液电阻值, 确保其电阻值在 5~10  $\text{M}\Omega$  之间。将电极尖端与目标细胞膜接触并处于轻压状态, 释放正压, 直至电阻值达到  $\text{G}\Omega$  以上完成高接封阻, 通过软件对电极施加快电容补偿。通过脉冲式抽吸三通, 给予电极负压, 进行细胞破膜操作, 当阻值降至 200~300  $\text{M}\Omega$  左右达到稳定, 通过软件对电极施加慢电容补偿。所用仪器为德国

HEKA 公司的 EPA-10 膜片钳信号放大器。

### 1.7.3 信号记录

动作电位记录: 采用全细胞电流钳记录模式采集细胞膜的静息膜电位和动作电位, 记录静息膜电位的幅度、动作电位的放电频率以及单个动作电位的相关指标, 如动作电位峰值、动作电位峰值时间、动作电位阈值、动作电位半波宽度、动作电位最大上升斜率和最大下降斜率。

$\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  通道电流记录: 采用电压钳模式记录电压门控的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  通道电流, 绘制  $I-V$  曲线、激活曲线、失活曲线和复活曲线。通过观察  $I-V$  曲线的电流峰值的变化, 分析激活、失活和复活过程的动力学特征变化。

### 1.7.4 离子通道电流 $I-V$ 、激活、失活及复活程序的设定

$I_K$ 的 $I-V$ 刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-50$  mV，给予细胞 $-50\sim+90$  mV脉冲刺激，步阶为 $10$  mV，刺激时长 $300$  ms，记录外向电流。

$I_A$ 的 $I-V$ 刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-100$  mV，给予细胞 $-50\sim+90$  mV脉冲刺激，步阶为 $10$  mV，刺激时长 $200$  ms，记录外向电流。

$I_K$ 的激活刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-50$  mV，给予细胞 $-110$  mV的条件脉冲，时长 $400$  ms，之后给予 $-50\sim+90$  mV的测试脉冲，步阶为 $10$  mV，时长刺激时长 $150$  ms，记录 $I_K$ 的稳态激活过程。

$I_A$ 的激活刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-100$  mV，给予细胞 $-110$  mV的条件脉冲，时长 $400$  ms，之后给予 $-60\sim+70$  mV的测试脉冲，步阶为 $10$  mV，时长刺激时长 $150$  ms，记录 $I_A$ 的稳态激活过程。

$I_A$ 的失活刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-100$  mV，给予细胞 $-110\sim+10$  mV的条件脉冲，刺激时长 $80$  ms，之后给予 $+50$  mV的测试脉冲，时长刺激时长 $80$  ms，记录 $I_A$ 的稳态激活过程。

$I_A$ 的复活刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-100$  mV，给予细胞 $+50$  mV的条件脉冲，刺激时长 $80$  ms，间隔 $1\sim 256$  ms，之后给予 $+50$  mV的测试脉冲，刺激时长 $80$  ms，记录 $I_A$ 失活后再恢复的过程。

$I_{Na}$ 的 $I-V$ 刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-70$  mV，给予细胞 $-80\sim+70$  mV脉冲刺激，步阶为 $10$  mV，刺激时长 $20$  ms，记录内向电流。

$I_{Na}$ 的激活刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-70$  mV，给予细胞 $-120$  mV条件脉冲刺激，刺激时长 $60$  ms，然后给予 $-90\sim+10$  mV的测试脉冲，步阶为 $10$  mV，刺激时长 $20$  ms，记录 $I_{Na}$ 稳态激活过程。

$I_{Na}$ 的失活刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-70$  mV，给予细胞 $-120\sim+10$  mV条件脉冲刺激，步阶为 $10$  mV，刺激时长 $100$  ms，然后给予 $-30$  mV的测试脉冲，刺激时长 $20$  ms，记录 $I_{Na}$ 稳态失活过程。

$I_{Na}$ 的复活刺激参数：全细胞记录模式下，钳制电压为 $-70$  mV，给予细胞 $-30$  mV条件脉冲刺激，刺激时长 $25$  ms，然后钳制在 $-70$  mV，钳制时间为 $2\sim 26$  ms，时间增幅为 $2$  ms，然后给予与条件

脉冲参数相同的测试脉冲，记录 $I_{Na}$ 稳态复活过程。

### 1.8 统计分析

水迷宫实验数据从实验系统配套软件 ANY-maze 导出。糖水偏好实验数据通过计算测试前后两种饮用液质量变化量得出。数据分析采用单因素方差 (one-way ANOVA) 分析方法，rTMS 频率作为主因素。事后分析采用 Bonferroni 检验修正的成对  $t$  检验分析方法。统计分析软件使用 GraphPad Prism8.0，统计结果以  $mean\pm SEM$  的方式呈现，检验标准为 $0.05$ 。

膜片钳实验所有信号数据均由德国 HEKA 公司的 Patch Master 软件采集记录。Origin 软件和 GraphPad Prism8.0 软件对信号进一步处理和统计分析，采用单因素方差分析方法统计比较各组之间的差异，事后分析 (即组间的多重比较) 使用由 Bonferroni 检验修正的配对  $t$  检验进行。统计结果以  $mean\pm SEM$  表示，检验标准为 $0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 复合频率刺激对HU小鼠负性情绪的影响

图4为小鼠蔗糖消耗百分比数据。与正常对照组相比，HU组的小鼠，没有展现出对糖水的偏好。这一结果明显偏离了正常小鼠对蔗糖水的典型行为，揭示了尾吊处理引发了小鼠快感的缺失，产生了明显的负性情绪。接受磁刺激的3组小鼠在糖水消耗百分比方面均表现出明显的偏好，均高于 $50\%$ 。值得注意的是，这些数据明显高于受到尾吊处理影响的HU组，并且接受CFS的小鼠相较于HU组，表现出了较为显著的提升。

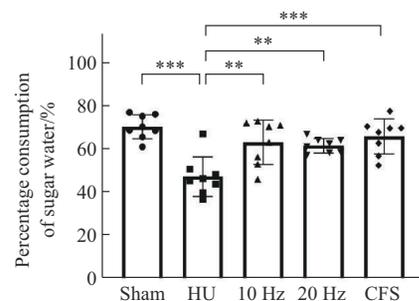


Fig. 4 Percentage of sucrose preference index (\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ,  $n=8$ )

### 2.2 CFS对HU小鼠空间认知的影响

水迷宫实验是一种用于评估实验动物空间学习和记忆能力的标准化行为测试。本研究采用逃避潜

伏期 (escape latency)、象限停留时间占比百分数 (quadrants stay time percentage) 和跨越平台次数 (number of platform crossings) 3个指标来分析各组小鼠的空间认知表现。实验结果一致显示, HU操作后引起了正常小鼠的空间认知损伤, 这在训练期和空间探索期的结果中都得到了体现。然而, 不同频率的rTMS均能显著改善小鼠的空间认知表现。

如图5所示, 从轨迹图中可以观察到, 在航行训练后期, HU组的活动轨迹异常杂乱, 主要集中于入水象限和目标象限。相反, 除了HU组外, 其

余4组小鼠在短时间内就能找到平台, 其中sham组的活动轨迹最短, 能够迅速找到平台。在3个rTMS刺激组中, 20 Hz组和CFS组的轨迹较短, 表现出较好的定位能力, 而10 Hz组的轨迹相对较长且较为杂乱。在空间探索测试阶段, 随着隐藏平台的移除, 各组小鼠的轨迹明显增多。sham组的活动轨迹最为集中, 主要集中于平台所在象限。相较之下, HU组的轨迹主要集中在平台相邻象限。而在3个rTMS刺激组中, 活动轨迹主要集中于入水象限和平台所在象限。

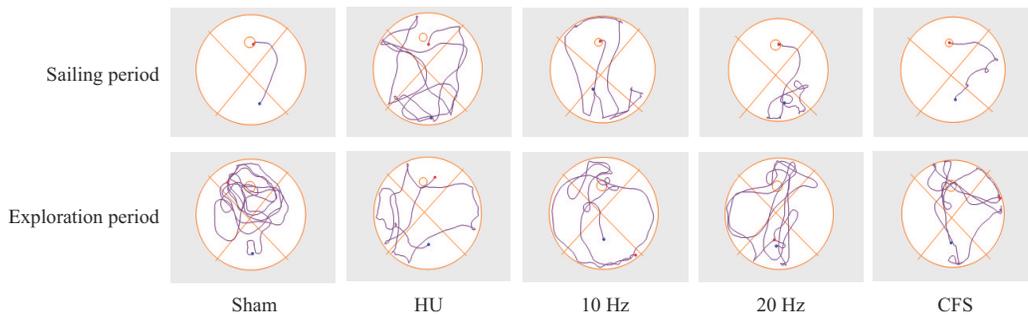


Fig. 5 Typical activity trajectories of mice at different stages

图6a为各组小鼠在航行期的逃避潜伏期数据。结果表明, 随着训练天数增加, 所有组逃避潜伏期均逐步缩短, 具体来说, sham组的逃避潜伏期减小速度最快, 最终在训练的最后一天接近10 s。相比之下, HU组的逃避潜伏期缩短速度最慢, 最终定格在30 s左右。而在3个rTMS刺激组中, 逃避潜伏期的缩短速度明显快于HU组, 最终逃避潜伏期均稳定在10 s左右, 这一结果接近于sham组。

为了更准确地比较各组小鼠认知功能表现, 在航行期结束后第二天进行了空间探索测试, 测试所记录的第一个指标是小鼠在平台所在象限停留的时间占测试总时间比重百分数, HU组百分数显著小

于sham组 ( $*P<0.05$ ), 小鼠在尾吊处理后接受磁刺激, 百分数均相对于HU组明显提高 ( $**P<0.01$ ) (图6b)。

如图6c所示, HU组小鼠穿越平台所在位置次数显著低于sham组 ( $**P<0.01$ ), 20 Hz磁刺激组的穿越次数明显更高 ( $*P<0.05$ ), CFS组显著高于HU组 ( $***P<0.001$ )。

以上结果突显了rTMS对改善尾吊小鼠认知功能的积极影响。特别是20 Hz和CFS组表现出的效果更显著, 这可能与这两种刺激方式在神经系统中引发的特定生物学响应有关。

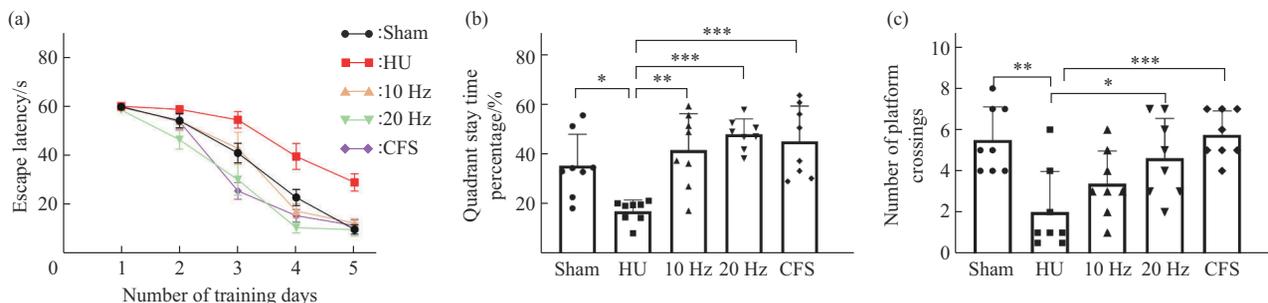


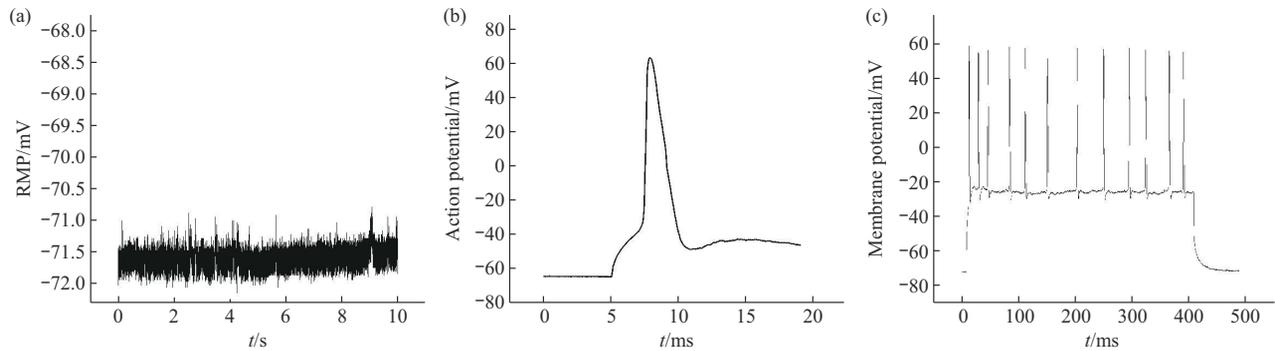
Fig. 6 Results of water maze experiment

(a) Escape latency. (b) Quadrant stay time percentage. (c) Number of platform crossings.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  vs HU,  $n=8$ .

### 2.3 CFS对小鼠海马DG区神经元兴奋性的影响

在结束行为学实验后进行电生理实验。静息电

位、动作电位及长时程诱发动作电位示意图如图7所示。



**Fig. 7 Representative schematic diagrams of resting membrane potential, action potential, and long-term evoked action potential**

(a) Resting membrane potential (RMP). (b) Action potential. (c) Long-term evoked action potential.

研究5组小鼠的静息电位 (resting membrane potential, RMP) 数据 (图8a)。HU组的RMP低于sham组 (\* $P < 0.05$ ), 10 Hz组、20 Hz组和CFS组的RMP显著高于HU组 (\* $P < 0.05$ )。一般来说, 神经元细胞的静息膜电位通常维持在-70mV左右, 即处于极化状态, 而神经元动作电位的产生是一个去极化的过程。结果显示, HU操作加深了膜电位极化状态, 而HU操作的同时接受rTMS的小鼠则没有明显的变化。这一结果可能意味着rTMS似乎能够保持神经元的正常极化状态。

对放电频数的分析显示, sham组的放电频数最高, 并且显著高于HU组 (\* $P < 0.05$ ), 20 Hz组与复合频率组显著高于HU组 (\* $P < 0.05$ ) (图8b)。对AP峰值的分析显示, 各组间无显著差异 (图8c)。5组小鼠的达峰时间存在显著差异, HU组达峰时间最高, 且显著高于sham组和CFS组 (\*\* $P < 0.01$ ), 10 Hz组, 20 Hz组达峰时间也均显著低于HU组 (\* $P < 0.05$ ) (图8d)。分析5组小鼠AP的阈值显示, HU组阈值显著高于sham组、10 Hz组和20 Hz组 (\* $P < 0.05$ ), 与CFS组差异更大 (\*\* $P < 0.01$ ) (图8e)。分析5组小鼠AP的半波宽显示, HU组显著高于sham组 (\*\* $P < 0.01$ )。10 Hz组和20 Hz组的AP半波宽与HU组相比, HU组显著高于10 Hz组和20 Hz组 (\*\* $P < 0.001$ )。对比HU组和CFS组, HU组显著高于CFS组 (\*\* $P < 0.01$ ) (图8f)。分析5组小鼠动作电位最大上升斜率显

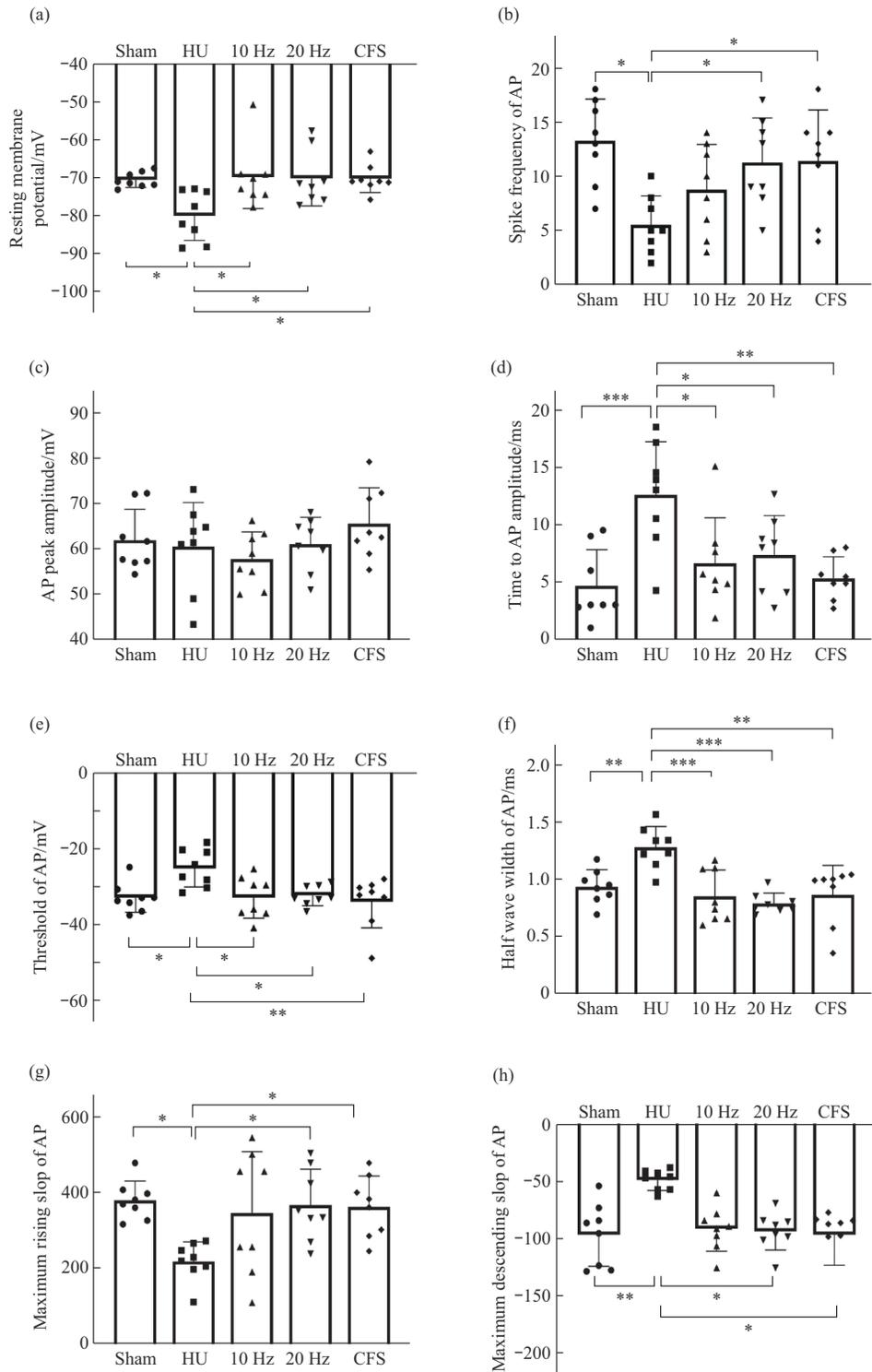
示, HU组动作电位的最大上升斜率显著低于sham组、20 Hz组和CFS组最大上升斜率 (\* $P < 0.05$ ) (图8g)。分析5组小鼠AP下降支最大下降斜率显示, CFS组和20 Hz组均大于HU组 (\* $P < 0.05$ ), HU组与sham组差异更大 (\*\* $P < 0.01$ ) (图8h)。

### 2.4 复合频率刺激对海马DG区电压门控钾钠离子通道的影响

通过对行为学及动作电位各项指标进行分析, CFS可同时改善负性情绪及认知障碍, 为探究其作用机制, 进一步研究CFS对海马DG区电压门控钾钠离子通道的影响。

#### 2.4.1 CFS对 $I_K$ 和 $I_A$ 的 $I-V$ 曲线的影响

在记录 $I_K$ 时, 外液中加入终浓度为4 mmol/L的4-AP阻断 $I_A$ 来记录 $I_K$ 。 $I_K$ 的 $I-V$ 变化曲线如图9a所示。从图中可以看出, 磁刺激对 $K^+$ 通道电流的影响与特定的刺激电压有关, 不同的刺激电压导致记录到的通道电流峰值不同。 $I_K$ 的 $I-V$ 变化曲线显示, 当刺激电压小于0 mV时, 3组间无显著差异, 从0 mV开始, HU组与sham组的峰值电流差异有统计学意义, 且随着刺激电压的增加, 差异逐渐显著。从20 mV开始, HU组和CFS组开始出现统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 并且随着刺激电压的增加, 差异的显著性逐渐增大。根据 $I_K$ 的 $I-V$ 变化曲线图, 通过比较相同刺激电压下的峰值电流, 发现HU组的 $I_K$ 电流明显大于sham组, CFS组的电流大于sham组, 但仍明显低于HU组。



**Fig. 8 Resting membrane potential and index of action potential**

(a) Resting membrane potential. (b) Spike frequency of AP. (c) AP peak amplitude. (d) Time to AP amplitude. (e) Threshold of AP. (f) Half wave width of AP. (g) Maximum rising slope of AP. (h) Maximum descending slope of AP. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n = 8$ .

$I_K$  的激活曲线如图 9b 所示。同时, CFS 组的激活曲线相对于 sham 组有明显的左移。相应地, 计算了各组的半激活电压  $V_{1/2}$ , sham 组为  $(12.34 \pm 1.93)$  mV, HU 组为  $(-8.619 \pm 0.88)$  mV, CFS 组

为  $(-1.79 \pm 1.42)$  mV, HU 组的斜率因子  $k$  为  $29.58 \pm 1.79$ 。CFS 组的斜率因子  $k$  为  $16.68 \pm 0.93$ , 明显高于 HU 组。 $I_K$  激活的动力学参数详见表 2。

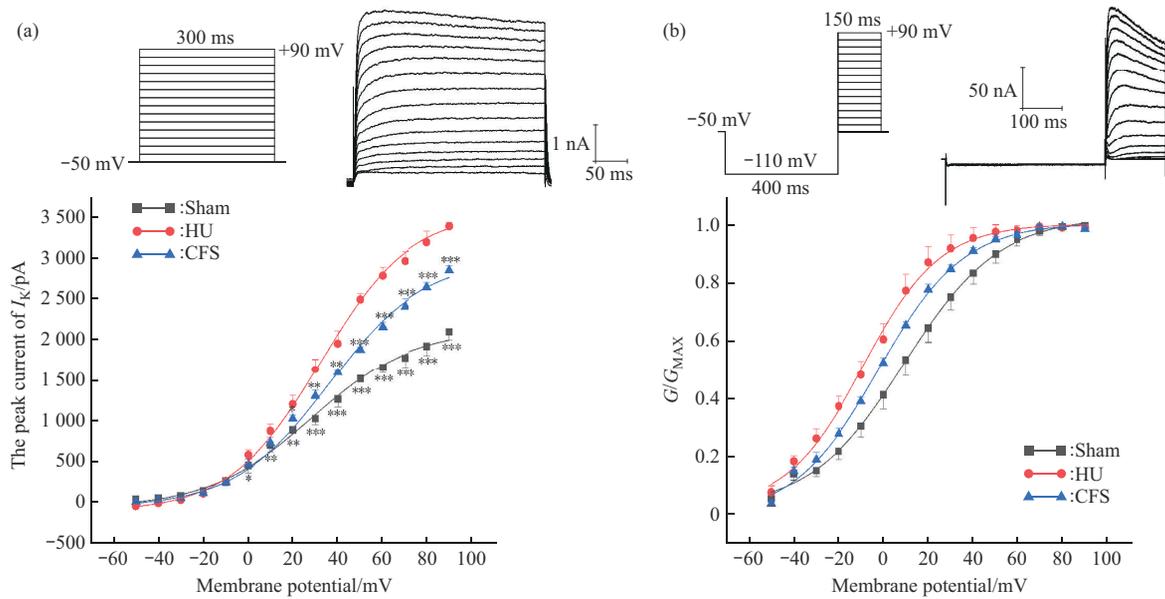


Fig. 9 Results of CFS on  $I_K$

(a)  $I$ - $V$  curves of  $I_K$ . (b) Activation curve of  $I_K$ . \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs HU,  $n$ =8.

Table 2 The activation parameters of  $I_K$

Groups	$I_K$ activation curve parameters ( $n$ =8)	
	$V_{1/2}$ /mV	$k$
Sham	12.34±1.997***	16.81±1.06**
HU	-8.62±0.90	29.58±1.79
CFS	-1.79±1.4*	16.68±0.93*

\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs HU,  $n$ =8.

在记录  $I_A$  时，外液中加入终浓度为 25 mmol/L 的 TEA 阻断  $I_K$  来记录  $I_A$ 。  $I_A$  的  $I$ - $V$  曲线如图 10a 所示。对相同刺激电压下的峰值电流分析表明，HU 组和 sham 组的峰值电流从刺激电压为 -20 mV 开始不同，与 CFS 组的峰值电流从 30 mV 开始不同。HU 组小鼠的峰值电流明显高于 sham 组，CFS 组小鼠的峰值电流明显低于 HU 组，但仍高于 sham 组。

$I_A$  的激活曲线见图 10b。与 HU 组相比，sham 组和 CFS 组的激活曲线明显右移，而与 CFS 组相比，sham 组的激活曲线明显右移。半激活电压  $V_{1/2}$  在各组间存在显著差异，sham 组为 (-1.53±0.38) mV，HU 组为 (-16.04±2.07) mV，CFS 组为 (-6.24±2.61) mV。sham 组的斜率因子明显高于 HU 组。 $I_A$  激活曲线参数详见表 3。

$I_A$  的失活曲线如图 10c 所示。相对于 HU 组，sham 组和 CFS 组的曲线均明显左移，而 sham 组相对于 CFS 组则左移。组间半失活电压有显著差异，HU 组为 (-16.04±2.07) mV，sham 组为 (-1.53±

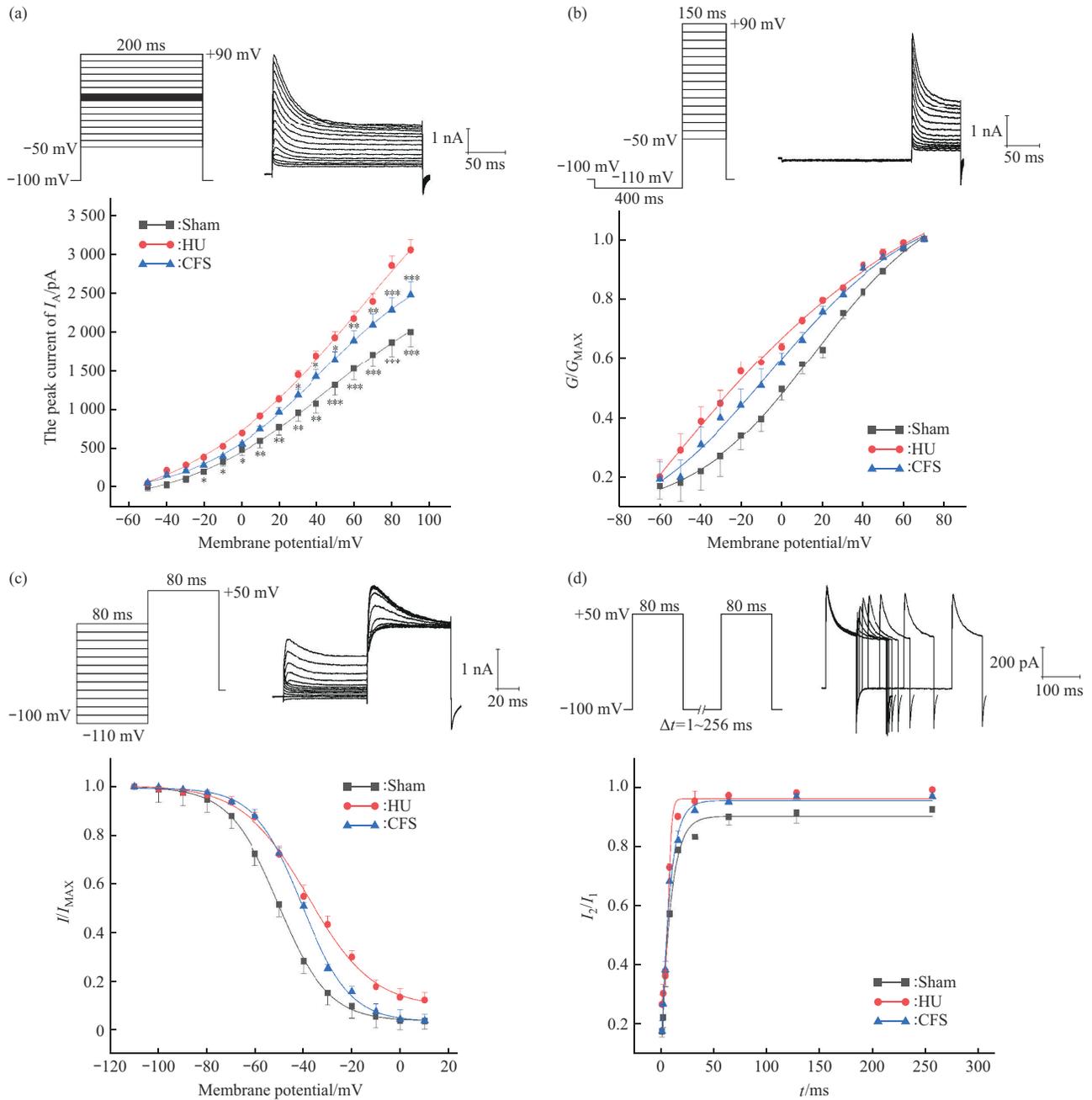
0.38) mV。

$I_A$  的复活曲线见图 10d。从复活曲线可以看出，HU 组恢复的更快、更短、更高。sham 组和 CFS 组的恢复过程较长，不能完全复活。与 HU 组相比，sham 组的复活曲线明显右移。与 HU 组相比，CFS 组的右移不明显。时间常数显示，sham 组和 CFS 组失活后的复活时间明显长于 HU 组，且 sham 组的时间常数大于 CFS 组。 $I_A$  的复活曲线参数见表 4，从中可以得出结论：HU 组的时间常数为 (4.04±1.14) ms。sham 组和 CFS 组的复活时间常数分别为 (10.45±0.58) ms 和 (8.47±0.57) ms，明显高于 HU 组。

#### 2.4.2 复合频率刺激对海马 DG 区电压门控 $Na^+$ 通道的影响

$Na^+$  通道的电流如图 11a 所示。通过分析相同刺激电压下的峰值电流，发现在刺激电压为 -60 mV 时，HU 组与 CFS 组的峰值电流开始出现显著差异 ( $P$ <0.01)。在刺激电压为 -50 mV 时，HU 组与 sham 组的峰值电流开始出现显著差异 ( $P$ <0.001)，最大的统计差异出现在刺激电压为 -30 mV 时。HU 组的  $I_{Na}$  电流明显大于 sham 组，而 CFS 组的电流大于 sham 组，但仍低于 HU 组。这表明，CFS 可以降低 HU 小鼠神经元的  $I_{Na}$  电流峰值，但仍无法使其恢复到正常小鼠的水平。

$I_{Na}$  的激活曲线如图 11b 所示。与 HU 相比，



**Fig. 10 Results of CFS on  $I_A$**

(a)  $I$ - $V$  curves of  $I_A$ . (b) Activation curve of  $I_A$ . (c) Inactivation curve of  $I_A$ . (d) Recovery curve of  $I_A$ . \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs HU,  $n$ =8.

**Table 3 The activation parameters of  $I_A$**

Groups	$I_A$ activation curve parameters ( $n$ =8)	
	$V_{1/2}$ /mV	$k$
Sham	-1.53±0.38**	23.33±2.71**
HU	-16.04±2.07	13.15±1.21
CFS	-6.24±2.61*	16.49±2.14

\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 vs HU,  $n$ =8.

**Table 4 The inactivation and recovery parameters of  $I_A$**

Groups	$I_A$ inactivation curve parameters ( $n$ =8)		$I_A$ recovery curve parameters ( $n$ =8)
	$V_{1/2}$ /mV	$k$	$\tau$ /ms
Sham	-49.05±1.41***	15.71±1.43*	10.45±0.58**
HU	-39.90±1.57	7.54±1.96	4.04±1.14
CFS	-47.03±1.15**	14.59±1.32*	8.47±0.57*

\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 vs HU,  $n$ =8.

sham组和CFS组的激活曲线明显左移。据此计算出各组的半激活电压  $V_{1/2}$ , sham组为  $(-39.37 \pm 3.48)$  mV, HU组为  $(-26.15 \pm 1.82)$  mV, CFS组为  $(-33.34 \pm 2.47)$  mV, 明显大于HU组。sham组的斜率因子  $k$  明显大于HU组。  $I_{Na}$  激活曲线参数详见表5。

$I_{Na}$  失活曲线见图11c。与HU相比, sham组和CFS组的复活曲线明显右移。相应地, 计算各组的半失活电压  $V_{1/2}$ , sham组为  $(-38.88 \pm 1.82)$  mV,

HU组为  $(-52.52 \pm 2.95)$  mV, CFS组为  $(-41.89 \pm 1.27)$  mV, sham组和CFS组明显高于HU组,  $I_{Na}$  失活曲线参数详见表6。

$I_{Na}$  的复活曲线见图11d。3组在不同时间间隔的归一化电流峰值无明显差异。与HU相比, sham组和CFS组的复活曲线明显左移, CFS组相对于sham组明显右移。计算出各组的恢复时间常数, sham组和CFS组明显小于HU组,  $I_{Na}$  复活曲线参数详见表6。

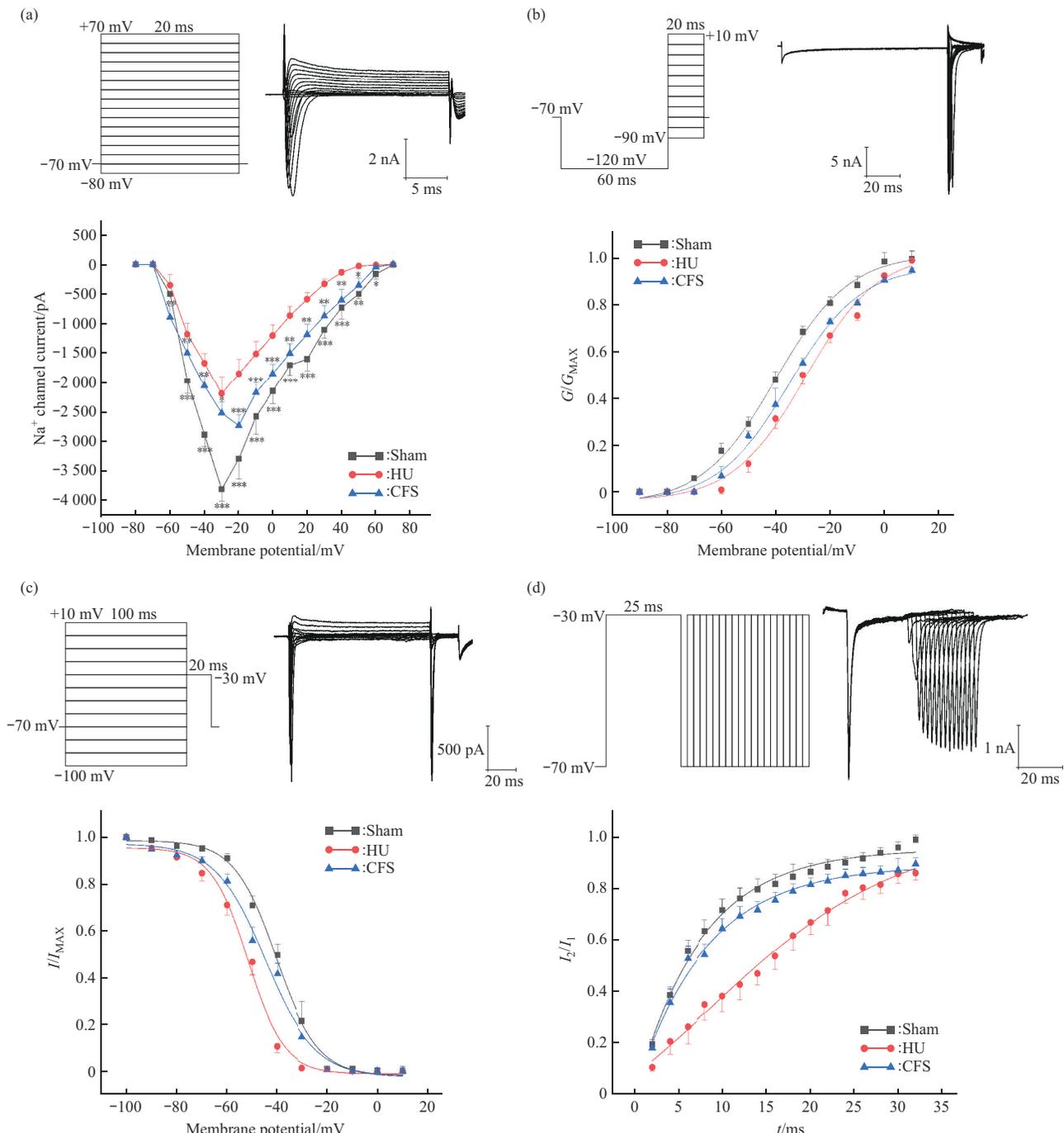


Fig. 11 Characterization of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel dynamics

(a)  $I$ - $V$  curves of  $I_{Na}$ . (b) Activation curves of  $I_{Na}$ . (c) Inactivation curves of  $I_{Na}$ . (d) Recovery curves of  $I_{Na}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs HU,  $n = 8$ .

**Table 5** The activation parameters of  $I_{Na}$ 

Groups	$I_{Na}$ activation curve parameters ( $n=8$ )	
	$V_{1/2}/mV$	$k$
Sham	$-39.37 \pm 3.48^{**}$	$12.08 \pm 3.06^*$
HU	$-26.15 \pm 1.82$	$17.34 \pm 1.78$
CFS	$-33.34 \pm 2.47$	$15.75 \pm 1.53$

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs HU,  $n=8$ .

**Table 6** The inactivation and recovery parameters of  $I_{Na}$ 

Groups	$I_{Na}$ inactivation curve parameters ( $n=8$ )		$I_{Na}$ recovery curve parameters ( $n=8$ )
	$V_{1/2}/mV$	$k$	$\tau/ms$
Sham	$-38.88 \pm 1.82^{***}$	$8.11 \pm 0.83$	$8.10 \pm 1.57^{**}$
HU	$-52.52 \pm 2.95$	$6.18 \pm 0.67$	$27.10 \pm 3.93$
CFS	$-41.89 \pm 1.27^{**}$	$7.13 \pm 1.38$	$10.26 \pm 1.51^{**}$

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs HU,  $n=8$ .

### 3 讨 论

本研究建立了HU模型。通过蔗糖偏好实验和水迷宫实验验证了HU操作处理后的小鼠的行为指标明显低于sham组。通过行为学实验结合电生理实验,验证了CFS对HU模型小鼠的治疗效果。结果表明,CFS可同时显著改善HU小鼠的空间学习能力和负性情绪,其潜在的作用机制可能是通过改善电压门控离子通道的动力学特性从而增强神经元的兴奋性。

在水迷宫实验中的研究表明,HU组小鼠的学习和记忆能力受到损伤,这些观察结果与以往的研究相符,表明了重力缺失可能引起认知功能的损害。10 Hz、20 Hz和CFS组都能显著提高HU小鼠的空间学习能力。其中,20 Hz和CFS的改善效果更为明显。这可能是因为20 Hz和CFS刺激在神经系统中引发了特定的生物学响应,促使小鼠恢复了部分认知功能。在蔗糖偏好实验中,在尾吊处理后,小鼠对蔗糖水的消耗没有明显的偏好,与正常对照组相比,表现出快感的缺失和负面情绪体验。这种行为改变可能是由尾吊操作引起的身体不适感和压力所致。这与以往的研究结果一致,表明尾吊操作可能导致小鼠的压力水平增加,影响了它们的快感体验和正常的行为反应<sup>[29]</sup>。这种行为变化也可能与水迷宫实验中观察到的认知障碍相互作用,形成了一个恶性循环。所有接受刺激的组别显示出了对蔗糖水的明显偏好,这种改变表明磁刺激有助于减轻尾吊操作引起的压力和负面情绪,恢复了小

鼠的正常快感体验,尤其是接受CFS的小鼠,其对蔗糖水的偏好最为显著,说明了CFS对缓解小鼠情绪压力 and 提升愉悦感方面具有更好的效果。在本研究中,CFS对小鼠的空间学习能力和负性情绪可同时起到改善作用,其潜在的作用机制可能是磁刺激增加了神经元的兴奋性。

神经元的兴奋性是指神经元受刺激后产生AP的能力<sup>[30]</sup>。因此,提高DG颗粒细胞的神经元兴奋性可能是改善认知障碍的潜在研究靶点。它是神经元在去极化和静息态之间切换的基本且重要的动力学机制<sup>[31]</sup>。本研究采用离体脑片膜片钳技术采集各组小鼠海马DG神经元的动作电位。对静息膜电位、动作电位、发放频率、阈值、达到峰值的时间以及上升和下降斜率的分析表明,HU操作引发小鼠神经元动作电位的发放频率减少,动作电位峰值降低,且去极化和复极化过程减慢,这表明,HU降低了正常小鼠神经元的兴奋性,而接受HU操作同时接受磁刺激的小鼠均有改善效果。3个刺激组的数据显示,HU小鼠的神经元兴奋性有显著改善,其中,20 Hz和CFS组的改善效果更好。值得注意的是,尽管改善的趋势向着正常小鼠组发展,但神经元兴奋性并不能恢复到正常小鼠的水平。潜在原因可能是HU对小鼠神经元造成了结构性损伤,由于长期的HU可能导致细胞内电生理特性的改变,包括离子通道活性的变化、电位稳定性的下降等,这些改变将对神经元的稳定性和健康造成一定程度上的影响<sup>[32]</sup>。此外,还有一些研究证实了HU操作可能引发细胞外基质的变化,如氧化应激反应的增加<sup>[33]</sup>、细胞内外炎症介质的释放<sup>[34-35]</sup>以及神经元凋亡<sup>[36]</sup>等。这也为在未来的研究中提供新的设计思路。

诸多证据表明,钠离子通道介导AP的去极化相位与神经元兴奋性相关<sup>[37]</sup>,钾离子通道与设置静息膜电位及调控细胞兴奋性相关<sup>[38]</sup>。因此,本研究继续深入探究了CFS对HU小鼠神经元钠钾离子通道动力学特征分析。对钾离子通道动力学的分析表明,CFS组的 $I_A$ 和 $I_K$ 的半数激活电压 $V_{1/2}$ 与HU组相比,复合频率组瞬时外向钾通道和延迟整流钾通道的半数激活电压变大,激活曲线明显右移,这表明钾通道的激活需要更高的刺激电压。对于 $I_A$ ,复合频率组的半数失活电压 $V_{1/2}$ 比HU组小,失活曲线明显左移,向着膜电位极化方向移动,激活过程会更快完成。CFS组 $I_A$ 的复活曲线明显右移,表明恢复过程更长。以上表明CFS抑制了 $I_A$ 和 $I_K$ 。对

钠离子通道的分析发现,相比于HU组,CFS组激活曲线明显左移,半数激活电压 $V_{1/2}$ 变小,即激活发生在膜电位更低处,更容易被激活。在CFS刺激下半数失活电压 $V_{1/2}$ 变大,失活曲线明显右移,向着去极化的方向移动,使激活过程完成需要更长时间。复合频率组恢复曲线相对于HU组明显左移,恢复时间更短。以上表明CFS加速了 $\text{Na}^+$ 内流,从而激活 $I_{\text{Na}}$ 。动作电位是神经元兴奋的基本特征<sup>[39]</sup>,它遵循了钠离子和钾离子通道的开放与关闭。在离子通道的研究中,CFS促进了 $\text{Na}^+$ 内流并激活了 $I_{\text{Na}}$ ,而 $\text{Na}^+$ 大量内流是动作电位上升支的重要生理基础<sup>[40]</sup>,最大上升斜率增大,使兴奋性增强,这与在动作电位中的分析结果一致;CFS阻碍了 $\text{K}^+$ 外流,从而抑制 $I_{\text{A}}$ 和 $I_{\text{K}}$ , $\text{K}^+$ 是动作电位下降支过程即设置静息电位的重要离子, $\text{K}^+$ 外流过程受阻,从而提高了胞内的电位水平,使细胞的兴奋性维持在较高的状态<sup>[41]</sup>,这与动作电位分析结果中最大下降斜率减小的趋势一致。此外,CFS可能影响突触前神经元的神经递质释放<sup>[42-43]</sup>,这一改变在以往的研究中被认为是调节突触前神经元的膜电位和电导率<sup>[44]</sup>,从而影响 $\text{Ca}^{2+}$ 进入突触前终端,进而影响神经递质的释放,最终改变神经元兴奋性。此外还有研究表明,磁刺激可能通过调节神经元膜上的离子通道受体<sup>[45]</sup>,如N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)、 $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid, AMPA)受体等,导致受体的敏感性发生变化,从而影响神经元兴奋性。进一步研究是通过胞内信号通路进行解释的,例如cAMP(cyclic adenosine monophosphate)<sup>[46]</sup>、cGMP(cyclic guanosine monophosphate)<sup>[47]</sup>、 $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[48]</sup>等第二信使分子,通过调节胞内的多种第二信使,使其影响离子通道的打开或关闭,磁刺激作为外部干预条件,可能通过激活或抑制这些信号通路<sup>[49]</sup>,直接或间接地影响离子通道的状态。

rTMS通过调节神经元兴奋性改善空间认知功能障碍和负面情绪<sup>[50-51]</sup>。神经元内在的兴奋性、可塑性促进了学习和记忆<sup>[52]</sup>。钠离子和钾离子通道的动力学特性结合动作电位分析表明,神经元兴奋性的变化与离子通道的开闭密切相关。这可能是磁刺激改善认知功能和负面情绪的潜在机制之一<sup>[53-55]</sup>。在本研究中,CFS可同时显著改善由HU操作引起的不同的神经系统功能障碍。

## 4 结 论

本研究中,由两种频率组成的CFS对认知障碍和负性情绪均有较明显的改善作用,且神经元动作电位和离子通道指标的差异与行为学表现的差异基本一致。这表明,CFS对HU小鼠的认知障碍和负性情绪均有显著改善作用,其作用机理可能是磁刺激通过影响电压门控离子通道的动力学特性,提高神经元的兴奋性。因此,CFS在同时调节认知障碍和负性情绪以及改善神经元兴奋性方面具有广阔的研究和临床应用前景。本研究为CFS的临床应用提供了相关的实验基础和理论依据,但尾吊小鼠样本与实际航天员所处环境存在一定差异,因此关于CFS模式下的rTMS改善太空失重环境导致的神经系统功能障碍仍需要进一步的探索。

## 参 考 文 献

- [1] Van Ombergen A, Laureys S, Sunaert S, *et al.* Spaceflight-induced neuroplasticity in humans as measured by MRI: what do we know so far?. *NPJ Microgravity*, 2017, **3**(1): 2
- [2] Liu Q, Zhou R L, Zhao X, *et al.* Acclimation during space flight: effects on human emotion. *Military Med Res*, 2016, **3**: 1-5
- [3] Kelly T H, Hienz R D, Zarcone T J, *et al.* Crewmember performance before, during, and after spaceflight. *J Exp Anal Behav*, 2005, **84**(2): 227-241
- [4] Pavy-Le Traon A, Heer M, Narici M V, *et al.* From space to earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006). *Eur J Appl Physiol*, 2007, **101**: 143-194
- [5] Doroshin A, Jillings S, Jeurissen B, *et al.* Brain connectometry changes in space travelers after long-duration spaceflight. *Front Neural Circuit*, 2022, **16**: 6
- [6] Basner M, Stahn A C, Nasrini J, *et al.* Effects of head-down tilt bed rest plus elevated  $\text{CO}_2$  on cognitive performance. *J Appl Physiol*, 2021, **130**(4): 1235-1246
- [7] Liu Q, Zhou R, Chen S, *et al.* Effects of head-down bed rest on the executive functions and emotional response. *PLoS One*, 2012, **7**(12): e52160
- [8] Qian Y, Jiang S, Jing X, *et al.* Effects of 15-day head-down bed rest on emotional time perception. *Front Psychol*, 2021, **12**: 732362
- [9] Morey-Holton E R, Globus R K. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects. *J Appl Physiol*, 2002, **92**(4): 1367-1377
- [10] Shang X, Xu B, Li Q, *et al.* Neural oscillations as a bridge between glutamatergic system and emotional behaviors in simulated microgravity-induced mice. *Behav Brain Res*, 2017, **317**: 286-291
- [11] Lu Z, Wang J, Qu L, *et al.* Reactive mesoporous silica nanoparticles loaded with limonene for improving physical and mental health of mice at simulated microgravity condition. *Bioact Mater*, 2020, **5**(4): 1127-1137
- [12] Wang Q, Zhang Y L, Li Y H, *et al.* The memory enhancement effect

- of Kai Xin San on cognitive deficit induced by simulated weightlessness in rats. *J Ethnopharmacol*, 2016, **187**: 9-16
- [13] Shang Y, Wang X, Shang X, *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation effectively facilitates spatial cognition and synaptic plasticity associated with increasing the levels of BDNF and synaptic proteins in Wistar rats. *Neurobiol Learn Mem*, 2016, **134**: 369-378
- [14] Fitzgerald PB, Hoy KE, Anderson RJ, *et al.* A study of the pattern of response to rTMS treatment in depression. *Depress Anxiety*, 2016, **33**(8): 746-753
- [15] Frigeri A, Iacobas DA, Iacobas S, *et al.* Effect of microgravity on gene expression in mouse brain. *Exp Brain Res*, 2008, **191**: 289-300
- [16] Choi G S, Kwak S G, Lee H D, *et al.* Effect of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on chronic central pain after mild traumatic brain injury: a pilot study. *J Rehabil Med*, 2018, **50**(3): 246-252
- [17] Mioni G, Grondin S, Bardi L, *et al.* Understanding time perception through non-invasive brain stimulation techniques: a review of studies. *Behav Brain Res*, 2020, **377**: 112232
- [18] George MS. Whither TMS: A one-trick pony or the beginning of a neuroscientific revolution?. *Am J Psychiat*, 2019, **176**(11): 904-910
- [19] Ahmed MA, Darwish E S, Khedr E M, *et al.* Effects of low versus high frequencies of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive function and cortical excitability in Alzheimer's dementia. *J Neurol*, 2012, **259**: 83-92
- [20] Lisanby S H. Noninvasive brain stimulation for depression - the devil is in the dosing. *N Engl J Med*, 2017, **376**(26): 2593-2594
- [21] Xu X, Xiang S, Zhang Q, *et al.* rTMS alleviates cognitive and neural oscillatory deficits induced by hindlimb unloading in mice *via* maintaining balance between glutamatergic and GABAergic systems. *Brain Res Bull*, 2021, **172**: 98-107
- [22] Zhai B, Fu J, Xiang S, *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorates recognition memory impairment induced by hindlimb unloading in mice associated with BDNF/TrkB signaling. *Neurosci Res*, 2020, **153**: 40-47
- [23] Globus R K, Morey-Holton E. Hindlimb unloading: rodent analog for microgravity. *J Appl Physiol*, 2016, **120**(10): 1196-1206
- [24] 林煜, 刘宗琳, 骞爱荣, 等. 一种模拟失重性骨丢失小鼠尾悬吊模型的建立. *航天医学与医学工程*, 2012, **25**(4): 239-242  
Lin Y, Liu Z L, Qian A R, *et al.* Space Medicine & Medical Engineering, 2012, **25**(4): 239-242
- [25] Zhu H, Yin X, Yang H, *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances the neuronal excitability of mice by regulating dynamic characteristics of Granule cells' ion channels. *Cogn Neurodyn*, 2023, **17**(2): 431-443
- [26] 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
- [27] 王玲, 杨佳佳, 王发顺, 等. 经颅磁刺激对抑郁模型动物的作用研究进展. *中国生物医学工程学报*, 2018, **37**(4): 498-507  
Wang L, Yang J J, Wang F Q, *et al.* Chinese Journal of Biomedical Engineering, 2018, **37**(4): 498-507
- [28] Zhai B, Shang X, Fu J, *et al.* Rapamycin relieves anxious emotion and synaptic plasticity deficits induced by hindlimb unloading in mice. *Neurosci Lett*, 2018, **677**: 44-48
- [29] Zhang Q, Li X, Liu X, *et al.* The effect of non-invasive brain stimulation on the downregulation of negative emotions: a meta-analysis. *Brain Sci*, 2022, **12**(6): 786
- [30] Tan T, Xie J, Tong Z, *et al.* Repetitive transcranial magnetic stimulation increases excitability of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Res*, 2013, **1520**: 23-35
- [31] Zhao Z, Gu H. Transitions between classes of neuronal excitability and bifurcations induced by autapse. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 6760
- [32] Hou W, Fu R, Zhu M, *et al.* Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on neuronal excitability and ion channels in hindlimb unloading mice. *J Biomed Eng*, 2023, **40**(1): 8-19
- [33] Powers S K, Radak Z, Ji L L. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol*, 2016, **594**(18): 5081-5092
- [34] Grenon S M, Jeanne M, Aguado-Zuniga J, *et al.* Effects of gravitational mechanical unloading in endothelial cells: association between caveolins, inflammation and adhesion molecules. *Sci Rep*, 2013, **3**(1): 1494
- [35] Reidy P T, Smith A D, Jevnikar B E, *et al.* Muscle disuse as hindlimb unloading in early postnatal mice negatively impacts grip strength in adult mice: a pilot study. *J Appl Physiol*, 2023, **134**(4): 787-798
- [36] Nagano K, Hori H. Promotion of apoptosis and cytochrome c depletion by a low-temperature environment in hindlimb-unloading rats. *J Musculoskel Neuron*, 2014, **14**(4): 464-472
- [37] Fleidervish IA, Libman L, Katz E, *et al.* Endogenous polyamines regulate cortical neuronal excitability by blocking voltage-gated Na<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(48): 18994-18999
- [38] Parsons R L, Barstow K L, Scornik F S. Spontaneous miniature hyperpolarizations affect threshold for action potential generation in mudpuppy cardiac neurons. *J Neurophysiol*, 2002, **88**(3): 1119-1127
- [39] Huxley H E, Kendrew J C. Extractability of the Lotmar-Picken material from dried muscle. *Nature*, 1952, **170**(4334): 882
- [40] Ekberg J, Craik D J, Adams D J. Conotoxin modulation of voltage-gated sodium channels. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, **40**(11): 2363-2368
- [41] Shah N H, Aizenman E. Voltage-gated potassium channels at the crossroads of neuronal function, ischemic tolerance, and neurodegeneration. *Transl Stroke Res*, 2014, **5**(1): 38-58
- [42] Lanza G, Cantone M, Aricò D, *et al.* Clinical and electrophysiological impact of repetitive low-frequency transcranial magnetic stimulation on the sensory-motor network in patients with restless legs syndrome. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018, **11**: 1756286418759973
- [43] Kuroda Y, Motohashi N, Ito H, *et al.* Effects of repetitive

- transcranial magnetic stimulation on [<sup>11</sup>C]raclopride binding and cognitive function in patients with depression. *J Affect Disorders*, 2006, **95**(1-3): 35-42
- [44] Pell G S, Roth Y, Zangen A. Modulation of cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation: influence of timing and geometrical parameters and underlying mechanisms. *Prog Neurobiol*, 2011, **93**(1): 59-98
- [45] Huang Y Z, Rothwell J C, Edwards M J, *et al.* Effect of physiological activity on an NMDA-dependent form of cortical plasticity in human. *Cereb Cortex*, 2008, **18**(3): 563-570
- [46] Li W Y, Li X Y, Tian Y H, *et al.* Pulsed electromagnetic fields prevented the decrease of bone formation in hindlimb-suspended rats by activating sAC/cAMP/PKA/CREB signaling pathway. *Bioelectromagnetics*, 2018, **39**(8): 569-584
- [47] Carcenac C, Herbute S, Masseguin C, *et al.* Hindlimb-suspension and spaceflight both alter cGMP levels in rat choroid plexus. *J Gravit Physiol*, 1999, **6**(2): 17-24
- [48] Morel J L, Dabertrand F, Porte Y, *et al.* Up-regulation of ryanodine receptor expression increases the calcium-induced calcium release and spontaneous calcium signals in cerebral arteries from hindlimb unloaded rats. *Pflügers Arch*, 2014, **466**: 1517-1528
- [49] Adair D, Truong D, Esmailpour Z, *et al.* Electrical stimulation of cranial nerves in cognition and disease. *Brain Stimul*, 2020, **13**(3): 717-750
- [50] Sun P, Wang F, Wang L, *et al.* Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study. *J Neurosci*, 2011, **31**(45): 16464-16472
- [51] Zhu H, Xu G, Fu L, *et al.* The effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on the cognition and neuronal excitability of mice. *Electromagn Biol Med*, 2020, **39**(1): 9-19
- [52] Dunn A R, Kaczorowski C C. Regulation of intrinsic excitability: roles for learning and memory, aging and Alzheimer's disease, and genetic diversity. *Neurobiol Learn Mem*, 2019, **164**: 107069
- [53] Wang H L, Xian X H, Wang Y Y, *et al.* Chronic high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves age-related cognitive impairment in parallel with alterations in neuronal excitability and the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> current in female mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2015, **118**: 1-7
- [54] Dong Z, Han H, Li H, *et al.* Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *J Clin Invest*, 2015, **125**(1): 234-247
- [55] Coetzee W A, Amarillo Y, Chiu J, *et al.* Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann Ny Acad Sci*, 1999, **868**(1): 233-255

## Effect of Combined Frequency Stimulation on The Electrophysiology of Granule Neurons in The Hippocampal Dentate Gyrus Area of Hindlimb Unloading Mice\*

ZHAO Jun-Qiao<sup>1,2)</sup>, ZHU Ming-Qiang<sup>1,2)</sup>, ZHU Hai-Jun<sup>4)</sup>, FU Rui<sup>1,2,3)</sup>, ZHANG Ze<sup>1,2)</sup>,  
WANG Jia-Le<sup>1,2)</sup>, DING Chong<sup>1,2,3)\*\*</sup>

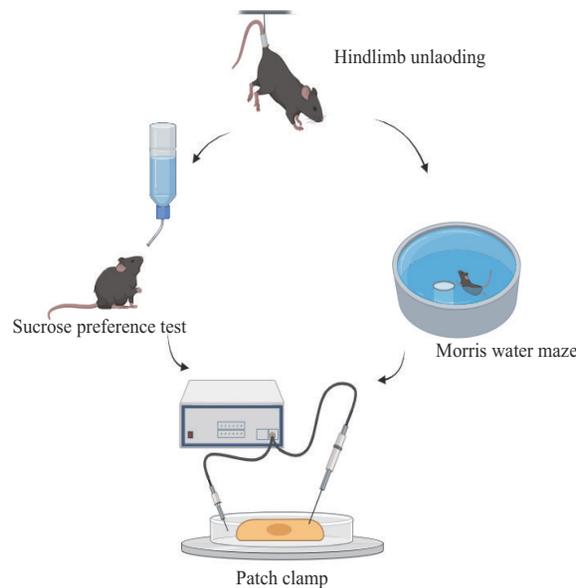
<sup>1)</sup>School of Health Sciences & Biomedical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

<sup>2)</sup>Key Laboratory of Bioelectromagnetics and Neural Engineering of Hebei Province, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

<sup>3)</sup>State Key Laboratory of Reliability and Intelligence of Electrical Equipment, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China;

<sup>4)</sup>Key Laboratory of Digital Medical Engineering of Hebei Province, Hebei University, Baoding 071002, China)

### Graphical abstract



**Abstract Objective** In recent years, the negative impact of microgravity on astronauts' nervous systems has received widespread attention. The repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) technology has shown significant positive effects in the treatment of neurological and psychiatric disorders. The potential benefits of combined frequency stimulation (CFS) which combines different frequency stimulation patterns in ameliorating neurological dysfunctions induced by the microgravity environment, still require in-depth investigation. Exploring the therapeutic effects and electrophysiological mechanisms of CFS in improving various neurological disorders caused by microgravity holds significant importance for neuroscience and the clinical application of magnetic

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

\*\* Corresponding author.

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

Received: November 6, 2023 Accepted: February 4, 2024

stimulation. **Methods** This study employed 40 C57BL/6 mice, randomly divided into 5 groups: sham group, hindlimb unloading (HU) group, 10 Hz group, 20 Hz group, and combined frequency stimulation (10 Hz+20 Hz, CFS) group. Mice in all groups except the sham group received 14 d of simulated microgravity conditions along with 14 d of repetitive transcranial magnetic stimulation. The effects of CFS on negative emotions and spatial cognitive abilities were assessed through sucrose preference tests and water maze experiments. Finally, patch-clamp techniques were used to record action potentials, resting membrane potentials, and ion channel dynamics of granule neurons in the hippocampal dentate gyrus (DG) region. **Results** Compared to the single-frequency stimulation group, behavioral results indicated that the combined frequency stimulation (10 Hz+20 Hz) significantly improved cognitive impairments and negative emotions in simulated microgravity mice. Electrophysiological experiments revealed a decrease in excitability of granule neurons in the hippocampal DG region after HU manipulation, whereas the combined frequency stimulation notably enhanced neuronal excitability and improved the dynamic characteristics of voltage-gated Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels. **Conclusion** The repetitive transcranial magnetic stimulation with combined frequencies (10 Hz+20 Hz) effectively ameliorates cognitive impairments and negative emotions in simulated microgravity mice. This improvement is likely attributed to the influence of combined frequency stimulation on neuronal excitability and the dynamic characteristics of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> channels. Consequently, this study holds the promise to provide a theoretical basis for alleviating cognitive and emotional disorders induced by microgravity environments.

**Key words** combined frequency stimulation, repetitive transcranial magnetic stimulation, hindlimb unloading, spatial cognitive impairment, negative emotion, neuronal excitability, ion channels

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0431