

# 高频重复经颅磁刺激对大脑中动脉闭塞模型大鼠运动功能的影响及机制研究

王舒萍<sup>1,2</sup>, 朱光跃<sup>1,2</sup>, 许东升<sup>1,2\*</sup>

1 上海中医药大学康复医学研究所, 上海 201203;

2 上海中医药大学康复医学院, 上海 201203

\* 通信作者: 许东升, E-mail: dxu0927@shutem.edu.cn

收稿日期: 2025-04-25; 接受日期: 2025-09-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82472622)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2025.06008

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**摘要** **目的** 探讨不同频率高频重复经颅磁刺激(rTMS)对大脑中动脉闭塞(MCAO)模型大鼠运动功能的影响及其潜在作用机制。**方法** 选择健康雄性 Sprague Dawley 大鼠 30 只, 采用 Longa 改良线栓法建立 MCAO 模型, 按随机数字表法分为对照组、模型组、干预组 1、干预组 2、干预组 3, 每组 6 只。术后第 1 天进行干预, 对照组仅接受声音刺激; 干预组 1、干预组 2 和干预组 3 分别接受 5、15、30 Hz rTMS 干预, 刺激强度为 80% 平均静息运动阈值(RMT), 刺激时间 3 s, 间歇时间 6 s, 总刺激次数 1 260 个。每组干预 1 次/d, 连续干预 14 d。在造模术后 3、7、14 d 采用改良神经功能缺损评分(mNSS)评估大鼠的神经功能缺损程度; 采用 Grip-Strength Meter 抓力计评估大鼠的患侧上肢抓力。干预结束后, 采用 ELISA 试剂盒检测组织白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量。采用 Western blot 法测定突触后密度蛋白 95 (PSD-95)、突触蛋白 1 (Synapsin-1)、神经元核蛋白 (NeuN) 和  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 表达水平。**结果** ① mNSS: 与干预前比较, 模型组、干预组 1、干预组 2、干预组 3 干预第 3、7、14 天 mNSS 均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 对照组、干预组 1、干预组 2、干预组 3 干预第 3、7、14 天 mNSS 均明显更低 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 干预组 1、干预组 2、干预组 3 干预第 3、7、14 天 mNSS 均明显更高 ( $P < 0.05$ )。② 上肢抓力: 与干预前比较, 模型组、干预组 1、干预组 2、干预组 3 干预第 3、7、14 天上肢抓力均明显更低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 对照组、干预组 1、干预组 2、干预组 3 干预第 3、7、14 天上肢抓力均明显更高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 干预组 1、干预组 2 干预第 3、7、14 天上肢抓力均明显更低 ( $P < 0.05$ ), 干预组 3 干预第 3 天上肢抓力均明显更低 ( $P < 0.05$ )。③ 皮质组织炎症水平: 与模型组比较, 对照组、干预组 1、干预组 2、干预组 3 干预 14 d 后 IL-1 $\beta$ 、IL-6 均明显更低 ( $P < 0.05$ ), 对照组、干预组 2 TNF- $\alpha$  均明显更低 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 干预组 1、干预组 2、干预组 3 干预 14 d 后 IL-6、TNF- $\alpha$  均明显更高 ( $P < 0.05$ )。④ 突触可塑性蛋白表达水平: 与模型组比较, 对照组、干预组 2、干预组 3 干预 14 d 后 PSD-95、NeuN 均明显更高 ( $P < 0.05$ ), 对照组、干预组 3 干预 14 d 后 Synapsin-1 均明显更高 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 干预组 1、干预组 2 干预 14 d 后 PSD-95、Synapsin-1、NeuN 均明显更低 ( $P < 0.05$ ), 干预组 3 干预 14 d 后 Synapsin-1 明显更低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 高频 rTMS 可改善 MCAO 模型大鼠的神经功能缺损并促进其上肢运动功能恢复, 其机制可能与调节突触可塑性关键蛋白表达及抑制促炎因子释放有关。

**关键词** 脑卒中; 大脑中动脉阻塞; 重复经颅磁刺激; 运动功能; 神经可塑性; 炎症因子

**引用格式:** 王舒萍, 朱光跃, 许东升. 高频重复经颅磁刺激对大脑中动脉闭塞模型大鼠运动功能的影响及机制研究[J]. 康复学报, 2025, 35(6): 603-610.

WANG S P, ZHU G Y, XU D S. Effects and mechanism of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function in rats with middle cerebral artery occlusion model [J]. Rehabil Med, 2025, 35(6): 603-610.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2025.06008

©《康复学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

脑卒中是全球范围内导致病死和致残的主要原因之一,尤其是缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)在所有脑卒中类型中占据主导地位<sup>[1]</sup>。随着人口老龄化的加剧,脑卒中康复已成为医疗领域亟待解决的重大挑战之一<sup>[2]</sup>。近年来,非侵入性神经调控技术逐渐成为神经康复领域的研究热点。其中,重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)因其安全性高、操作简便、效果显著,逐渐被广泛应用于脑卒中康复治疗<sup>[2-3]</sup>。高频rTMS(>5 Hz)直接作用于损伤皮层,可以直接兴奋皮质脊髓束<sup>[2]</sup>,增强运动传导通路的兴奋性,促进突触可塑性和抑制炎症反应,被广泛应用于脑卒中后运动功能障碍康复治疗<sup>[3]</sup>。不同频率的高频磁刺激对脑卒中恢复的影响可能存在差异<sup>[2]</sup>,不同康复方案涉及个体间的差异,康复效果也可能不同<sup>[4]</sup>。尽管高频磁刺激通常是安全的,但过高的刺激频率可能会增加癫痫发作等不良事件的风险<sup>[5]</sup>。患者在接受rTMS治疗时可能会感到局部不适或轻微疼痛,尤其是在刺激面部神经较多的头部区域<sup>[6]</sup>。有研究显示,较高的刺激频率通常具有更强的兴奋性作用,过高的刺激频率可能引发神经元过度兴奋,导致不良反应<sup>[7-8]</sup>。因此,探讨不同频率的高频磁刺激效果,对于确定最佳的康复方案和早期抗炎的参数选择都具有重要意义。本研究通过不同频率高频磁刺激干预大鼠中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠,探索其对运动功能的影响及其潜在作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

选择健康雄性Sprague Dawley大鼠30只,体重200~250 g,购自上海必凯科翼生物科技有限公司。所有实验动物在标准条件下(25 °C, 45%~65%湿度),每笼饲养6只,光照/黑暗循环12 h,在适应新环境期间,自由饮水和食物持续1周[实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2023-0009]。采用随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组、干预组1、干预组2、干预组3,每组6只。本研究方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审核批准(审批号:PZSHUTCM2311140001)。

### 1.2 实验动物模型制备

1.2.1 模型组、干预组1、干预组2、干预组3 参照

Longa改良线栓法<sup>[2,9]</sup>制备大鼠右侧MCAO模型。术前禁食禁水12 h,腹腔注射4 mg/kg 1%戊巴比妥钠。麻醉成功后,将大鼠仰卧固定于操作板上,剃除颈部细毛,医用乙醇消毒皮肤。取颈部正中切口,长度约3 cm,钝性分离皮下筋膜组织,使颈部浅层肌肉显露充分,分离右侧的胸锁乳突肌,并于肌腹处挂线向大鼠右侧牵拉,小心分离筋膜组织使颈内与颈外动脉分叉处显露,用显微镊分离颈外动脉并于分叉处结扎,暴露右侧颈总动脉鞘,钝性分离血管外筋膜游离颈总动脉,分离过程中勿损伤迷走神经,在颈总动脉近心端用动脉夹夹闭,远心端打1个活单结,颈内动脉远心端用动脉夹夹闭在紧靠颈总动脉结扎处剪1个小口,将线栓从小口处插入,松开动脉夹,缓慢地将线栓从颈总动脉推进颈内动脉,遇到阻力时停止,插入线栓的长度至分岔处约(20±2) mm(线栓黑点标记进入血管),通过远心端的活结单线固定线栓。整个手术过程15~20 min,大鼠肛温维持37 °C。栓塞90 min后拔出线栓,将颈总动脉的远心端结扎,涂撒青霉素粉后,缝合伤口。

1.2.2 对照组 对照组只分离血管,不插线栓,其他操作与MCAO模型制备相同。

大鼠MCAO术后12 h进行氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)染色,可见对照组全脑呈红色无缺血征。模型组右侧脑额、顶、颞叶皮质和皮层下结构呈苍白色,表示该部位脑组织缺血;其他呈现红色区域为未缺血区,提示MCAO模型构建成功。见图1。



图1 MCAO造模后TTC染色比较

Figure 1 Comparison of TTC staining after MCAO model establishment

以上各组术后 12 h 采用 TTC 观察脑梗死病变情况。MCAO 作为模拟人类缺血性脑卒中的金标准模型,其病死率与临床重症脑卒中患者相近。为降低病死率,尽量减少手术时长,并在术后 48 h 提供营养饲料及葡萄糖盐水。模型组总病死率 8%~10%,因其未能完成预设观察终点,死亡动物数据未被纳入最终统计学分析。

### 1.3 干预方法

术后第 1 天进行 rTMS 干预。使用 MagTD 磁场刺激仪(中国依瑞德公司),使用依瑞德 3 号圆形动物线圈,线圈中点放于大鼠双侧内眦连线中点旁开 0.5 cm 处。大鼠在清醒状态下接受磁刺激,保持周围环境相对安静,1 次/d,连续干预 14 d。见图 2。

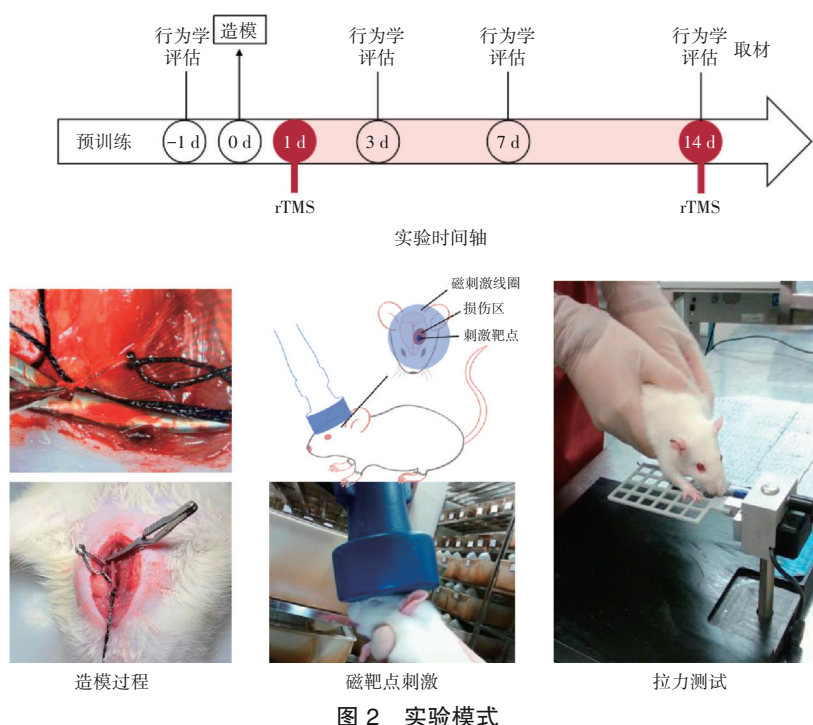


Figure 2 Experimental mode diagram

**1.3.1 干预组 1** 刺激频率 5 Hz, 刺激强度为 80% 平均静息运动阈值(resting motor threshold, RMT)<sup>[10]</sup>, 刺激时间 3 s, 间歇时间 6 s, 总刺激次数 1 260 个。

**1.3.2 干预组 2** 刺激频率 15 Hz, 刺激强度为 80% 平均 RMT<sup>[10]</sup>, 刺激时间 3 s, 间歇时间 6 s, 总刺激次数 1 260 个。

**1.3.3 干预组 3** 刺激频率 30 Hz, 刺激强度为 80% 平均 RMT<sup>[10]</sup>, 刺激时间 3 s, 间歇时间 6 s, 总刺激次数 1 260 个。

**1.3.4 对照组** 大鼠刺激线圈与刺激点垂直, 仅接受声音刺激。

### 1.4 观察指标

**1.4.1 神经功能** 在造模术后 3、7、14 d 采用改良神经功能缺损评分(Modified Neurological Severity Score, mNSS)<sup>[11]</sup> 评估大鼠的神经功能缺损程度。mNSS 包括运动测试、感觉测试、反射测试和平衡测试 4 个方面, 总分最高为 18 分, 最低分为 0 分, 分数

越高表示神经功能缺损越严重。1~6 分表示轻度缺陷; 7~12 分表示中度缺陷; 13~18 分表示严重缺陷。

**1.4.2 上肢抓力** 采用 Grip-Strength Meter 抓力计(意大利 Ugo 公司, 型号: 47200) 评估大鼠的患侧上肢抓力。在造模术后 3、7、14 d 将大鼠患侧上肢置于抓力计的网格上, 健侧上肢用胶带固定, 轻轻拉动大鼠尾部, 使其患肢紧握网格并尽力抵抗拉力, 记录大鼠的最大抓力值, 测定其患侧上肢肌肉力量<sup>[12]</sup>。连续重复 5 次, 取每次峰值力的平均值。

**1.4.3 皮质组织炎症水平** 干预结束后, 将大鼠麻醉后断头取脑, 冰上分离梗死侧运动皮层。采用 ELISA 试剂盒检测组织白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 含量。按照试剂盒说明书进行操作, 将样品加入微孔板中, 加入相应的检测试剂, 孵育后洗涤微孔板, 加

入底物溶液显色,最后测定吸光度值,根据标准曲线计算细胞因子含量。

**1.4.4 突触可塑性蛋白表达水平** 干预结束后,将大鼠麻醉后断头取脑,冰上分离梗死侧运动皮层。将组织匀浆后提取总蛋白,采用BCA法测定突触后密度蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)、突触蛋白1(Synapsin-1)、神经元核蛋白(neuronal nuclei, NeuN)和β-肌动蛋白(Beta-actin, β-actin)浓度。将蛋白样品与上样缓冲液混合后煮沸变性,使用SDS-PAGE凝胶电泳分离并转膜,室温下用封闭液封闭15 min。根据抗体说明书分别加入以封闭液稀释的一抗(PSD-95、Synapsin-1、NeuN、β-actin),4℃孵育过夜。用TBST洗涤聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜3次,10 min/次。二抗用Tris缓冲盐溶液-吐温20(Tris-buffered saline with Tween 20, TBST)进行稀释并在摇床上室温孵育1 h,再次用TBST洗涤PVDF膜3次,10 min/次。在暗室内使用ECL化学发光法进行信号采集和灰度分析。

**1.5 统计学方法**

采用SPSS 22.0统计软件进行数据分析。计量资料服从正态分布以( $\bar{x}\pm s$ )表示,多组比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*和Turkey检验。*P*<0.05为差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 5组干预不同时间点mNSS比较**

与干预前比较,模型组、干预组1、干预组2、干预组3干预第3、7、14天mNSS均明显升高(*P*<0.05)。与模型组同一时间点比较,对照组、干预组1、干预组2、干预组3干预第3、7、14天mNSS均明显更低(*P*<0.05)。与对照组同一时间点比较,干预组1、干预组2、干预组3干预第3、7、14天mNSS均明显更高(*P*<0.05)。与干预组1同一时间点比较,干预组2、干预组3干预第3、7天mNSS均明显更低(*P*<0.05),干预组3干预第14天mNSS明显更低(*P*<0.05)。与干预组2同一时间点比较,干预组3干预第14天mNSS明显更低(*P*<0.05)。见表1。

表1 5组干预不同时间点mNSS比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	<i>n</i>	干预前	干预第3天	干预第7天	干预第14天
模型组	6	0.50±0.55	11.00±0.89 <sup>1)</sup>	8.83±0.75 <sup>1)</sup>	6.83±0.75 <sup>1)</sup>
对照组	6	0.67±0.52	0.83±0.41 <sup>2)</sup>	0.83±0.41 <sup>2)</sup>	0.83±0.41 <sup>2)</sup>
干预组1	6	0.50±0.55	9.50±1.05 <sup>1)2)3)</sup>	7.33±1.03 <sup>1)2)3)</sup>	6.17±0.75 <sup>1)2)3)</sup>
干预组2	6	0.33±0.52	7.83±0.75 <sup>1)2)3)4)</sup>	6.17±0.75 <sup>1)2)3)4)</sup>	5.33±0.52 <sup>1)2)3)</sup>
干预组3	6	0.33±0.52	7.33±0.52 <sup>1)2)3)4)</sup>	5.67±0.82 <sup>1)2)3)4)</sup>	3.50±0.55 <sup>1)2)3)4)5)</sup>

注:与干预前比较,1) *P*<0.05;与模型组比较,2) *P*<0.05;与对照组比较,3) *P*<0.05;与干预组1比较,4) *P*<0.05;与干预组2比较,5) *P*<0.05。

Note: compared with that before intervention, 1) *P*<0.05; compared with the model group, 2) *P*<0.05; compared with the control group, 3) *P*<0.05; compared with the intervention group 1, 4) *P*<0.05; compared with the intervention group 2, 5) *P*<0.05.

**2.2 5组干预不同时间点上肢抓力比较**

与干预前比较,模型组、干预组1、干预组2、干预组3干预第3、7、14天上肢抓力均明显更低(*P*<0.05)。与模型组同一时间点比较,对照组、干预组1、干预组2、干预组3干预第3、7、14天上肢抓力均明显更高(*P*<0.05)。与对照组同一时间点比较,干预组1、干预组2干预第3、7、14天上肢抓力均明显更低(*P*<0.05),干预组3干预第3天上肢抓力明显更低(*P*<0.05)。与干预组1同一时间点比较,干预组2、干预组3干预第3、7、14天上肢抓力均明显更高(*P*<0.05)。与干预组2同一时间点比较,干预

组3干预第14天上肢抓力明显更高(*P*<0.05)。见表2。

**2.3 5组干预14 d后皮层组织炎症水平比较**

与模型组比较,对照组、干预组1、干预组2、干预组3干预14 d后IL-1β、IL-6均明显更低(*P*<0.05),对照组、干预组2 TNF-α均明显更低(*P*<0.05)。与对照组比较,干预组1、干预组2、干预组3干预14 d后IL-6、TNF-α均明显更高(*P*<0.05)。与干预组1比较,干预组3干预14 d后IL-1β、IL-6均明显更低(*P*<0.05)。与干预组2比较,干预组3干预14 d后IL-6明显更低(*P*<0.05)。见表3。

表2 5组干预不同时间点上肢抓力比较( $\bar{x}\pm s$ )

克力

Figure 2 Comparison of forelimb grip strength in five groups at different times after intervention ( $\bar{x}\pm s$ )

gf

组别	n	干预前	干预第3天	干预第7天	干预第14天
模型组	6	121.93±4.74	45.76±6.94 <sup>1)</sup>	52.18±2.42 <sup>1)</sup>	53.21±4.10 <sup>1)</sup>
对照组	6	123.17±2.43	121.08±5.20 <sup>2)</sup>	112.52±7.22 <sup>2)</sup>	116.51±8.27 <sup>2)</sup>
干预组1	6	120.38±2.43	61.96±9.42 <sup>1)2)3)</sup>	65.77±13.59 <sup>1)2)3)</sup>	84.93±5.38 <sup>1)2)3)</sup>
干预组2	6	122.27±1.73	81.63±5.81 <sup>1)2)3)4)</sup>	92.05±6.99 <sup>1)2)3)4)</sup>	91.20±6.42 <sup>1)2)3)</sup>
干预组3	6	122.58±3.63	84.20±5.56 <sup>1)2)3)4)</sup>	101.88±7.87 <sup>1)2)4)</sup>	105.98±4.81 <sup>1)2)4)5)</sup>

注:与干预前比较,1)  $P<0.05$ ;与模型组比较,2)  $P<0.05$ ;与对照组比较,3)  $P<0.05$ ;与干预组1比较,4)  $P<0.05$ ;与干预组2比较,5)  $P<0.05$ 。

Note: compared with that before intervention, 1)  $P<0.05$ ; compared with the model group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the control group, 3)  $P<0.05$ ; compared with the intervention group 1, 4)  $P<0.05$ ; compared with the intervention group 2, 5)  $P<0.05$ .

表3 5组干预14 d后IL-1 $\beta$ 、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

pg/mL

Figure 3 Comparison of levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in five groups after intervention for 14 days ( $\bar{x}\pm s$ )

pg/mL

组别	n	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
模型组	6	76.93±9.94	101.63±6.18	491.46±19.28
对照组	6	28.90±0.26 <sup>1)</sup>	24.25±1.56 <sup>1)</sup>	196.57±24.39 <sup>1)</sup>
干预组1	6	57.90±3.56 <sup>1)2)</sup>	77.90±8.38 <sup>1)2)</sup>	464.33±73.44 <sup>2)</sup>
干预组2	6	45.06±2.64 <sup>1)2)</sup>	69.30±7.28 <sup>1)2)</sup>	373.18±52.10 <sup>1)2)</sup>
干预组3	6	33.77±1.05 <sup>1)3)</sup>	50.02±2.27 <sup>1)2)3)4)</sup>	378.15±4.46 <sup>2)</sup>

注:与模型组比较,1)  $P<0.05$ ;与对照组比较,2)  $P<0.05$ ;与干预组1比较,3)  $P<0.05$ ;与干预组2比较,4)  $P<0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the control group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the intervention group 1, 3)  $P<0.05$ ; compared with the intervention group 2, 4)  $P<0.05$ .

2.4 5组干预14 d后突触可塑性蛋白表达水平比较  
与模型组比较,对照组、干预组2、干预组3干预14 d后PSD-95、NeuN均明显更高( $P<0.05$ ),对照组、干预组3干预14 d后Synapsin-1均明显更高( $P<0.05$ )。与对照组比较,干预组1、干预组2干预14 d

后PSD-95、Synapsin-1、NeuN均明显更低( $P<0.05$ ),干预组3干预14 d后Synapsin-1明显更低( $P<0.05$ )。与干预组1、干预组2比较,干预组3干预14 d NeuN均明显更高( $P<0.05$ )。见表4、图3。

表4 5组干预14 d后PSD-95、Synapsin-1、NeuN蛋白表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ )

Figure 4 Comparison of expression levels of Synapsin-1, PSD-95 and NeuN proteins in five groups after intervention for 14 days ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	n	PSD-95	Synapsin-1	NeuN
模型组	6	0.13±0.02	0.10±0.01	0.64±0.01
对照组	6	0.26±0.04 <sup>1)</sup>	0.35±0.06 <sup>1)</sup>	0.87±0.02 <sup>1)</sup>
干预组1	6	0.14±0.01 <sup>2)</sup>	0.13±0.02 <sup>2)</sup>	0.67±0.03 <sup>2)</sup>
干预组2	6	0.18±0.02 <sup>1)2)</sup>	0.14±0.02 <sup>2)</sup>	0.70±0.03 <sup>1)2)</sup>
干预组3	6	0.24±0.05 <sup>1)</sup>	0.18±0.04 <sup>1)2)</sup>	0.86±0.02 <sup>1)3)4)</sup>

注:与模型组比较,1)  $P<0.05$ ;与对照组比较,2)  $P<0.05$ ;与干预组1比较,3)  $P<0.05$ ;与干预组2比较,4)  $P<0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P<0.05$ ; compared with the control group, 2)  $P<0.05$ ; compared with the intervention group 1, 3)  $P<0.05$ ; compared with the intervention group 2, 4)  $P<0.05$ .

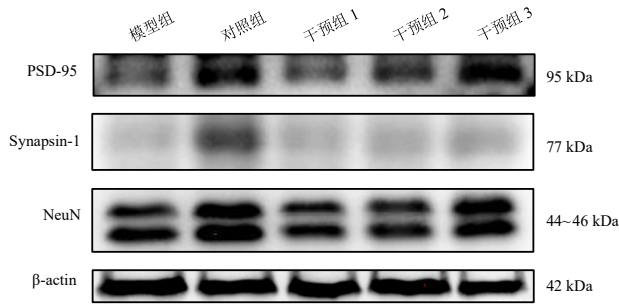


图3 5组 PSD 95、Synapsin-1 和 NeuN 蛋白条带图

Figure 3 Protein band figure of PSD 95, Synapsin-1 and NeuN in five groups

### 3 讨论

#### 3.1 高频 rTMS 可改善 MCAO 模型大鼠神经功能与上肢抓力

本研究结果显示,与模型组比较,干预组 1、干预组 2 和干预组 3 干预第 3、7、14 天 mNSS 均明显更低,上肢抓力均明显更高;与干预组 1 同一时间点比较,干预组 2、干预组 3 干预第 3、7 天 mNSS 均明显更低,上肢抓力均明显更高,干预组 3 干预第 14 天 mNSS 明显更低,上肢抓力明显更高,这提示高频 rTMS 可改善 MCAO 模型大鼠神经功能和上肢抓力。这可能与以下因素有关:① 高频 rTMS 可提升皮层兴奋性。神经功能增强是运动行为改善的前提。高频 rTMS 可能通过提升皮层兴奋性、优化神经信号传递<sup>[13]</sup>,加强从初级运动皮层到脊髓前角运动神经元的指令输出效率<sup>[14]</sup>,从而提高 MCAO 模型大鼠抓握肌群力量。这与 ZHU 等<sup>[15]</sup>研究结果一致。② 高频 rTMS 可增强神经元兴奋性。高频 rTMS 对 MCAO 模型大鼠大脑皮层产生易化作用,提高受刺激区域神经元的自发放电频率和同步化活动,增强神经元兴奋性。MCAO 模型大鼠脑缺血半暗区存在大量功能受抑制但尚未死亡的神经元<sup>[16]</sup>,高频 rTMS 可能通过兴奋这些神经元,为神经功能重组奠定基础。

#### 3.2 高频 rTMS 改善 MCAO 模型大鼠神经功能可能与调控突触相关蛋白表达有关

本研究结果显示,与模型组比较,干预组 2 和干预组 3 干预 14 d 后 PSD-95、NeuN 均明显更高,干预组 3 干预 14 d 后 Synapsin-1 明显更高,提示高频 rTMS 改善 MCAO 模型大鼠神经功能可能与调控突触相关蛋白表达有关。这可能与以下因素有关:一个功能完善的突触是神经网络进行有效信息处理的基本单元<sup>[17]</sup>,突触可塑性的增强是神经环路重组和功能恢复的物质基础。长时程增强(long-term

potentiation, LTP)是运动技能再习得的神经基础<sup>[18]</sup>。高频 rTMS 可诱导 MCAO 模型大鼠皮层 LTP 发生,而 PSD-95 与 Synapsin-1 蛋白表达上调,是 LTP 发生过程中伴随的关键分子事件,通过激活 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR),触发下游的 Ca<sup>2+</sup>内流及 cAMP 反应元件结合蛋白磷酸化等细胞内信号级联反应,不仅保护了缺血后神经元的存活,还可促进突触结构的重建与功能成熟。这与 LÜSCHER 等<sup>[19]</sup>研究结果相似。

#### 3.3 高频 rTMS 改善 MCAO 模型大鼠神经功能可能与调节促炎细胞因子水平有关

研究结果显示,与模型组比较,干预组 1、干预组 2 和干预组 3 干预 14 d 后 IL-1β、IL-6 均明显更低,干预组 2 TNF-α 明显更低,提示高频 rTMS 改善 MCAO 模型大鼠神经功能与调节促炎细胞因子水平有关。这可能与以下因素有关:脑缺血后,小胶质细胞等神经免疫细胞被过度激活,释放大量炎症因子,会加剧神经元损伤并阻碍突触重塑<sup>[20]</sup>。高频 rTMS 可能通过调节小胶质细胞的表型极化,使其从促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型转变,从而降低炎症水平维持突触微环境的稳定,这与 LUO 等<sup>[21]</sup>研究结果相似。突触重塑与神经炎症调控密切相关,高频 rTMS 在调控“抗炎-促可塑”这一正反馈环路中发挥核心作用,不仅减轻神经炎症降低突触损伤风险,还可以通过增强突触可塑性促进功能恢复。

但本研究结果并未显示出简单、线性的 rTMS 频率相关性。这提示,不同频率 rTMS 可能通过不同的神经生物学通路发挥作用,其最终效应是多重机制整合后的结果。30 Hz rTMS 在促进神经元存活方面表现突出,可能与其能更有效地激活特定皮层环路有关;但不同频率 rTMS 在 Synapsin-1 蛋白表达上差异无统计学意义,则提示高频 rTMS 刺激可调控突触前功能,但不同频率 rTMS 间并无明显差异。

### 4 小结

高频 rTMS 可改善 MCAO 模型大鼠的神经功能缺损并促进其上肢运动功能恢复,其机制可能与调节突触可塑性关键蛋白表达及抑制促炎因子释放有关。但本研究样本量较小,未探讨不同频率产生差异化效应的内在机制以及大脑内部状态如神经振荡、行为状态等对运动皮层兴奋性和行为表现的影响<sup>[22-23]</sup>。未来研究还需进一步扩大样本量,结合光遗传及多组学技术探讨不同频率 rTMS 对神经功

能的影响,并结合个性化的大脑状态评估 rTMS 频率特异性效应及其神经保护的环路机制与分子网络,为 rTMS 精准治疗提供理论支持。

## 参考文献

- [1] GONZÁLEZ-SANTOS J, RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ P, PARDO-HERNÁNDEZ R, et al. A cross-sectional study: determining factors of functional independence and quality of life of patients one month after having suffered a stroke [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2023, 20(2): 995.
- [2] LEÓN RUIZ M, RODRÍGUEZ SARASA M L, SANJUÁN RODRÍGUEZ L, et al. Current evidence on transcranial magnetic stimulation and its potential usefulness in post-stroke neurorehabilitation: opening new doors to the treatment of cerebrovascular disease [J]. *Neurología*, 2018, 33(7): 459-472.
- [3] 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 [J]. *Front Hum Neurosci*, 2022, 16: 800349.
- [4] HUA Y C, LI B Y, WANG K X, et al. Therapeutic effect of repetitive transcranial magnetic stimulation with different frequencies on patients with ischemic stroke [J]. *Chin J Phys Med Rehabil*, 2019, 41(10): 745-748.
- [5] MAGNUSON J, OZDEMIR M A, MATHIESON E, et al. Neuromodulatory effects and reproducibility of the most widely used repetitive transcranial magnetic stimulation protocols [J]. *PLoS One*, 2023, 18(6): e0286465.
- [6] MACHII K, COHEN D, RAMOS-ESTEBANEZ C, et al. Safety of rTMS to non-motor cortical areas in healthy participants and patients [J]. *Clin Neurophysiol*, 2006, 117(2): 455-471.
- [7] ROSSI S, HALLETT M, ROSSINI P M, et al. Safety, ethical considerations, and application guidelines for the use of transcranial magnetic stimulation in clinical practice and research [J]. *Clin Neurophysiol*, 2009, 120(12): 2008-2039.
- [8] SASAKI N, MIZUTANI S, KAKUDA W, et al. Comparison of the effects of high- and low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on upper limb hemiparesis in the early phase of stroke [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2013, 22(4): 413-418.
- [9] National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals [M]. 8th Ed. Washington, D. C.: National Academies Press, 2011: 107-118.
- [10] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [11] LUO J, ZHENG H Q, ZHANG L Y, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves functional recovery by enhancing neurogenesis and activating BDNF/TrkB signaling in ischemic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 455.
- [12] CHEN Y, CONSTANTINI S, TREMBOVLER V, et al. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits [J]. *J Neurotrauma*, 1996, 13(10): 557-568.
- [13] LANGE N, HAMANN M, SHASHIDHARAN P, et al. Behavioural and pharmacological examinations in a transgenic mouse model of early-onset torsion dystonia [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2011, 97(4): 647-655.
- [14] KENNEDY M B. Synaptic signaling in learning and memory [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 8(2): a016824.
- [15] ZHU H J, YIN X N, YANG H L, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances the neuronal excitability of mice by regulating dynamic characteristics of Granule cells' Ion channels [J]. *Cogn Neurodyn*, 2023, 17(2): 431-443.
- [16] YANG X, HUANG Y A, MARSHALL J. Targeting TrkB-PSD-95 coupling to mitigate neurological disorders [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(3): 715-724.
- [17] LUO J, FENG Y, HONG Z Q, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation promotes neural stem cell proliferation after ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(8): 1772-1780.
- [18] GUO X S, TIAN Y, YANG Y P, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against cognitive impairment caused by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(9): 4309-4322.
- [19] LÜSCHER C, MALENKA R C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD) [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(6): a005710.
- [20] HONG Y, LIU Q, PENG M N, et al. High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves functional recovery by inhibiting neurotoxic polarization of astrocytes in ischemic rats [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 150.
- [21] LUO L, LIU M X, FAN Y H, et al. Intermittent *Theta*-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization *via* TLR4/NFκB/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 141.
- [22] MRACHACZ-KERSTING N, STEVENSON A J T, JØRGENSEN H R M, et al. Brain state-dependent stimulation boosts functional recovery following stroke [J]. *Ann Neurol*, 2019, 85(1): 84-95.
- [23] WU T T, YU Q X, ZHU X M, et al. Embracing internal states: a review of optimization of repetitive transcranial magnetic stimulation for treating depression [J]. *Neurosci Bull*, 2025, 41(5): 866-880.

## Effects and Mechanism of High-Frequency Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation on Motor Function in Rats with Middle Cerebral Artery Occlusion Model

WANG Shuping<sup>1,2</sup>, ZHU Guangyue<sup>1,2</sup>, XU Dongsheng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

<sup>2</sup> School of Rehabilitation Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

\*Correspondence: XU Dongsheng, E-mail: dxu0927@shutcm.edu.cn

**ABSTRACT** **Objective** To investigate the effects and potential mechanisms of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) with different frequencies on motor function in rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO). **Methods** Thirty healthy male Sprague Dawley rats were selected, and the MCAO model was established using the modified Longa filament method. The rats were randomly divided into control group, model group, intervention group 1, intervention group 2 and intervention group 3, with six cases in each group. Interventions were initiated on the first postoperative day. The control group received only acoustic stimulation. The intervention groups 1, 2, and 3 received rTMS at frequencies of 5, 15, and 30 Hz, respectively, with an intensity of 80% of the mean resting motor threshold (RMT), a stimulation duration of 3 seconds, an interval time of 6 seconds, and a total of 1,260 pulses per session. Each group received intervention once daily for 14 consecutive days. At the 3rd, 7th and 14th days of intervention, the Modified Neurological Severity Score (mNSS) was used to assess neurological deficit; and a Grip-Strength Meter was used to assess forelimb grip strength of the affected side. After intervention, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to measure levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Western blot analysis was used to determine expression levels of postsynaptic density protein-95 (PSD-95), Synapsin-1, neuronal nuclei protein (NeuN), and  $\beta$ -actin. **Results** (1) mNSS: compared with those before intervention, mNSS increased significantly in the model group, the intervention group 1, the intervention group 2, and the intervention group 3 at the 3rd, 7th and 14th days of intervention ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, mNSS in the control group, the intervention group 1, the intervention group 2 and the intervention group 3 were significantly lower ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, mNSS in the intervention group 1, the intervention group 2, and the intervention group 3 were significantly higher ( $P<0.05$ ). (2) Forelimb grip strength: compared with that before intervention, forelimb grip strength in the model group, the intervention group 1, the intervention group 2, and the intervention group 3 were significantly lower at the 3rd, 7th and 14th days of intervention ( $P<0.05$ ). Compared with the model group, forelimb grip strength in the control group, the intervention group 1, the intervention group 2, and the intervention group 3 were significantly higher at the 3rd, 7th and 14th days of intervention ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, forelimb grip strength in the the intervention group 1 and the intervention group 2 were significantly lower at the 3rd, 7th and 14th days of intervention ( $P<0.05$ ), while forelimb grip strength in the intervention group 3 was significantly lower only at the 3rd day of intervention ( $P<0.05$ ). (3) Cortical inflammation: compared with the model group, IL-1 $\beta$  and IL-6 levels in the control group, the intervention group 1, the intervention group 2, and the intervention group 3 were significantly lower at the 14th day of intervention ( $P<0.05$ ), and TNF- $\alpha$  levels in the control group and the intervention group 2 were significantly lower ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in the intervention group 1, 2, and 3 were significantly higher after 14 days of intervention ( $P<0.05$ ). (4) Synaptic plasticity-related protein expression: compared with the model group, the expression levels of PSD-95 and NeuN in the control group, the intervention group 2, and the intervention group 3 were significantly higher at the 14th day of intervention ( $P<0.05$ ), Synapsin-1 level in the control group and the intervention group 3 were significantly higher ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, PSD-95, Synapsin-1, and NeuN levels in the intervention group 1 and 2 were significantly lower at the 14th day of intervention ( $P<0.05$ ), and Synapsin-1 in intervention group 3 was significantly lower ( $P<0.05$ ). **Conclusion** High-frequency rTMS can ameliorate neurological deficits and promote the recovery of forelimb motor function of model rats with MCAO. Its mechanism may be associated with the modulation of key synaptic plasticity protein expression and the suppression of pro-inflammatory cytokine release.

**KEY WORDS** stroke; middle cerebral artery occlusion; repetitive transcranial magnetic stimulation; motor function; neuroplasticity; inflammatory cytokines

DOI:10.3724/SP.J.1329.2025.06008