

重复经颅磁刺激对缺血性脑卒中小鼠神经功能障碍及 NLRP3 表达的影响

蒋珣姝 李玮 秦灵芝 张弥兰 王晓娟 庞瑞 刘慧勤 张杰文

河南省人民医院(郑州大学人民医院)神经内科,郑州 450003

通信作者:李玮,Email:liwei71@126.com

【摘要】 目的 观察重复经颅磁刺激(rTMS)对缺血性脑卒中(IS)小鼠神经功能障碍、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)及炎性因子表达的影响。**方法** 采用随机数字表法将64只C57BL/6J小鼠分为正常对照组、模型组、假刺激组及观察组,每组16只。采用线栓法将模型组、假刺激组及观察组小鼠制成大脑中动脉闭塞(MCAO)模型。观察组小鼠于造模后24h给予低频(1Hz)rTMS干预,每天治疗1次,连续治疗7d;假刺激组小鼠则同期给予假磁刺激干预;模型组及正常对照组小鼠均未给予特殊处理。于rTMS干预7d后分别对各组小鼠进行Zea-Longa评分,采用TTC染色法检测小鼠脑梗死面积,采用免疫荧光技术检测脑梗死灶周围区域NLRP3表达变化,采用Western blot技术检测脑组织中NLRP3蛋白表达水平,选用ELISA技术检测脑组织中白细胞介素-1 β (IL-1 β)及IL-18表达情况。**结果** 与正常对照组比较,模型组及假刺激组神经功能缺损评分均显著升高($P<0.01$),脑皮质及海马区均出现大片脑梗死灶($P<0.01$),且该区域神经细胞中NLRP3蛋白表达明显增强($P<0.01$),IL-1 β 及IL-18大量释放($P<0.01$);与模型组及假刺激组比较,观察组小鼠神经功能缺损评分明显降低($P<0.05$),脑皮质及海马区脑梗死灶面积明显缩小($P<0.01$),且神经细胞中NLRP3表达明显减弱($P<0.05$),IL-1 β 及IL-18水平也明显降低($P<0.05$)。**结论** 低频rTMS干预可有效促进IS小鼠受损神经功能恢复,抑制神经细胞焦亡,减小脑梗死体积,其治疗机制可能与下调神经元中NLRP3表达、抑制IL-1 β 、IL-18等炎性因子释放有关。

【关键词】 NOD样受体蛋白3; 重复经颅磁刺激; 焦亡; 缺血性脑卒中; 神经功能障碍

基金项目:河南省医学科技攻关计划省部共建项目(SBGJ2018077)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.07.001

Transcranial magnetic stimulation at low frequency can promote the recovery of neurological functioning after a stroke

Jiang Yushu, Li Wei, Qin Lingzhi, Zhang Milan, Wang Xiaojuan, Pang Rui, Liu Huiqin, Zhang Jiwen

Department of Neurology, People's Hospital of Zhengzhou University and of Henan Province, Zhengzhou 450003, China

Corresponding author: Li Wei, Email: liwei71@126.com

【Abstract】 Objective To explore any effect of repeated transcranial magnetic stimulation (rTMS) on the recovery of neurological functioning and the expression of NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) and inflammatory factors after ischemic stroke. **Methods** Sixty-four C57BL/6J mice were randomly divided into a normal control group, a model group, a sham stimulation group and an observation group, each of 16. All mice except those of the normal control group received middle cerebral artery occlusion using the suture method to model an ischemic stroke. After the modeling the observation group was given 1Hz rTMS daily for 7 consecutive days, while the sham stimulation group was given sham rTMS. After the intervention, Zea-Longa scores were used for all of the groups, and the size of the cerebral infarct was measured using triphenyltetrazolium chloride staining. The expression of NLRP3 around the cerebral infarction was detected using immunofluorescence, while that in the brain tissue was measured using Western blotting. The expression of interleukin-1 β and IL-18 in the brain tissue was detected using enzyme-linked immunosorbent assays. **Results** Compared with the normal control group, a significant increase was observed in the other groups' average neurological function impairment scores. Expression of NLRP3, IL-1 β and IL-18 in the model and sham stimulation groups also increased, with large cerebral infarcts in the cortex and hippocampus. Compared with the sham stimulation and model groups, there was a significant decrease in the average neurological dysfunction scores, the area of cerebral infarction in the cortex and hippocampus, as well as the expression of NLRP3, IL-1 β and IL-18 in the observation group. **Conclusions** Low-frequency

rTMS can promote the recovery of damaged nerve function after an ischemic stroke, at least in mice. It can reduce the size of cerebral infarction, and inhibit neuronal pyroptosis, which is closely related to the down-regulation of NLRP3, IL-1 β and IL-18 expression.

【Key words】 NOD-like receptor family pyrin domain containing 3; Repetitive transcranial magnetic stimulation; Pyroptosis; Ischemic stroke; Neurological dysfunction; Interleukin-1 β

Funding: The Henan Medical Science and Technology research plan (project SBGJ2018077)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.07.001

当前脑卒中、特别是缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)已成为中老年人群的常见多发病,致死率、致残率均非常高,其中 60% 患者伴有严重的并发症,以言语、肢体功能及认知等神经功能障碍为主,严重影响患者生活质量,给其家庭及社会带来沉重负担^[1-3]。近年来相关研究发现,包括神经元及胶质细胞在内的神经细胞中均存在以 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 1(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 1, NLRP1)为代表的 NLRPs、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)及半胱氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)等结合形成的炎性小体,能调控白细胞介素-1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β)及白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)等炎性因子大量释放,并诱发一种不同于凋亡或坏死的“替补”程序性死亡方式——焦亡,在 IS 的发生、发展过程中具有重要作用,能介导神经细胞转归进而影响脑卒中患者预后^[4-6]。

由于 IS 的发病机制十分复杂,药物对患者偏瘫、失语等神经功能障碍的治疗效果不佳。近年来采用物理因子[特别是重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)]等非药物手段治疗 IS 的疗效已获得基础及临床转化研究的大力支持^[7-9],但 rTMS 是否能通过拮抗 IS 后神经元焦亡而发挥神经保护作用目前鲜见报道。基于此,本研究拟观察 rTMS 对 IS 模型小鼠神经功能障碍的影响,并初步探讨 rTMS 治疗 IS 的相关分子信号机制。

材料与方 法

一、实验动物及主要仪器、试剂

选取 8~12 周清洁级健康雄性 C57BL/6J 小鼠 64 只,由郑州大学实验动物中心提供,小鼠体质量(25 \pm 2)g,经一般体检均未发现异常,将其饲养于温度 20~23 $^{\circ}$ C、湿度 50%~60%、12 h~12 h 昼夜交替的标准动物房内,期间自由进食水。本研究主要实验仪器为 C-100 型经颅磁刺激器(丹麦丹迪公司出品);主要实验试剂包括兔抗小鼠 NLRP3 单克隆抗体(美国 Abcam

公司提供)、兔抗小鼠 β -actin 单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司提供)、山羊抗兔 IgG/辣根酶标记(中杉金桥生物技术有限公司提供)、IL-1 β 及 IL-18 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司提供)、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司提供)等。另外本研究已通过我院动物实验伦理学审查[(2021)伦审第(04)号]。

二、动物分组及制模

采用随机数字表法将上述 64 只小鼠分为正常对照组、模型组、假刺激组及观察组,每组 16 只小鼠。采用国际通用的线栓法将模型组、假刺激组及观察组小鼠制成大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型^[10],具体制模方法如下:首先将直径约 0.2 mm 的尼龙线置于 75% 医用酒精中浸泡消毒,再放入肝素化的生理盐水中浸泡备用。采用 0.1% 水合氯醛按 5 ml/kg 体重标准腹腔注射麻醉小鼠,待麻醉剂生效后暴露并分离左侧颈外动脉,结扎烙断其远端动脉及分支小动脉,用动脉夹暂时夹闭左侧颈总动脉及颈内动脉,在左侧颈外与颈总动脉交界处剪一小口,将尼龙线顺势插入,然后结扎并松开动脉夹,再将尼龙线继续插入至大脑前动脉处(距颈总动脉分叉处 18~19 mm)以阻断大脑中动脉血液供应,最后缝合皮肤。完成上述操作后将实验小鼠置于通风良好的笼内,直到其意识恢复后再放回原笼内饲养。IS 制模成功标准为小鼠苏醒后提尾时右侧前肢内收屈曲;同侧 Horner 征阳性;爬行时向右划圈;站立时向右侧倾倒。凡具有上述 4 项体征者表示制模成功,剔除死亡或制模失败小鼠并补足数量。

三、rTMS 干预

于制模结束 24 h 后采用 C-100 型经颅磁刺激器(丹麦产)对观察组小鼠进行低频 rTMS 干预,在正式干预前将小鼠制动 5 min,让其适应环境,将磁刺激器配置的直径 9 cm 高聚焦圆形线圈中心对准小鼠矢状缝中点,线圈距离小鼠头皮约 5 mm 并与其相切,设置磁刺激频率为 1 Hz,每持续刺激 25 s 则间歇 60 s,每次治疗约 7 min,每天治疗 1 次,连续治疗 7 d^[11]。假刺激组小鼠也同期制动处理并给予假磁刺激干预,干预期间磁刺激器无能量输出;正常对照组及模型组小鼠同期均无特殊干预。

四、标本取材及检测

1. 小鼠神经功能评估: 于 rTMS 干预 7 d 后且小鼠完全清醒时, 参照 Zea-Longa 标准对 4 组小鼠进行神经功能缺损评分: 0 分——无行为障碍; 1 分——左前肢内收, 不能完全伸展; 2 分——向瘫痪侧转圈; 3 分——身体向对侧倾倒; 4 分——不能自主行走并伴有意识障碍; 得分越高表示小鼠神经功能障碍程度越严重^[12]。

2. 脑梗死面积检测: 于神经功能评估结束后每组各取 4 只小鼠, 采用断头法处死小鼠, 在 10 min 内取脑并置于 0~4 °C 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 中, 再转移至 -20 °C 冰箱内冷冻 30 min。将各组小鼠脑标本去除小脑、嗅球及低位脑干后制作冠状位脑片, 片厚 2 mm, 将脑片置于 2% 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium-chloride, TTC) 染色液中 37 °C 避光水浴 30 min, 每 5 min 轻微晃动容器使其充分染色。用数码相机分别拍摄脑片正、反面, 利用 Image-J 软件检测全脑片及梗死组织面积, 再乘以脑片厚度即得到全脑及梗死组织体积: 梗死体积百分比 = 梗死组织体积/全脑体积 × 100%^[12]。

3. 免疫荧光法检测皮质 NLRP3 表达: 于神经功能评估结束后每组各取 4 只小鼠, 经冰生理盐水 (4 °C) 及 4% 多聚甲醛溶液 (4 °C) 心脏灌注后取脑组织, 置于 4 °C、4% 多聚甲醛溶液中浸泡 24 h。经脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、预冷后行连续冠状切片, 片厚 2 μm。石蜡切片经驴血清封闭 30 min, 加入一抗抗体 (NLRP3 1 : 50, NeuN 1 : 200) 4 °C 过夜, 经 PBS 液洗涤 3 次, 加入驴抗兔荧光二抗抗体 (1 : 1000) 室温孵育 3 h, 经 PBS 液洗涤 5 次, 采用 Hoechst 染料染核 5 min, 经 PBS 液洗涤 5 次后镜检。在激光扫描共聚焦免疫荧光显微镜下观察并选取 10 个视野, 通过 Image-Pro Plus 6.0 版图像分析软件对每个视野阳性表达区域的积分光密度值 (integrated optical density, IOD) 和面积 (area) 进行检测, 并计算平均光密度值 (mean density = IOD/area), 以 10 个视野平均光密度值的算术平均数纳入分析。

4. Western blot 法检测 NLRP3 表达: 于神经功能评估结束后每组各取 4 只小鼠, 经生理盐水心脏灌注取脑并收集皮质及海马组织, 提取总蛋白后采用牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BCA) 试剂盒检测总蛋白浓度, 于 80 V 恒压条件下在 10% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 90 min, 分离蛋白后在 260 mA 恒流条件下转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上并与 NLRP3 (1 : 500)、β-actin (1 : 2000) 抗体结合, 然后再与辣根过氧化物酶标记的二抗结合, 经电化学发光液显色后照相, 采用凝胶成像系统 (Image master

VDS) 及图像分析软件 (Image J) 对目标蛋白进行灰度扫描分析。

5. IL-1β 及 IL-18 表达检测: 严格按照酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒说明书进行检测, 于神经功能评估结束后每组各取 4 只小鼠, 经生理盐水心脏灌注后取脑皮质, 用预冷的 PBS 液 (0.01 M, pH 值 7.4) 冲洗并去除残留血液, 称重后将脑组织剪碎, 并与对应体积 (按 1 : 9 的重量体积比, 即 1 g 组织样品对应 9 ml PBS 液, 同时 PBS 液中加入蛋白酶抑制剂) 的 PBS 液混合后转移至玻璃匀浆器内, 于冰上充分研磨; 然后将匀浆液离心 (约 5000 g) 5~10 min, 取上清进行检测。先包被抗原, 经洗涤后加入上清, 再加入辣根过氧化物酶标记的特异性 IL-1β 及 IL-18 抗体溶液, 反复洗涤后分别加入底物溶液并终止反应, 最后采用酶标比色计测定 IL-1β 及 IL-18 水平。

五、统计学方法

本研究所得计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析, 计量资料多组间比较采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA), 组间两两比较采用 Dunnett 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、rTMS 对各组小鼠神经功能恢复的影响

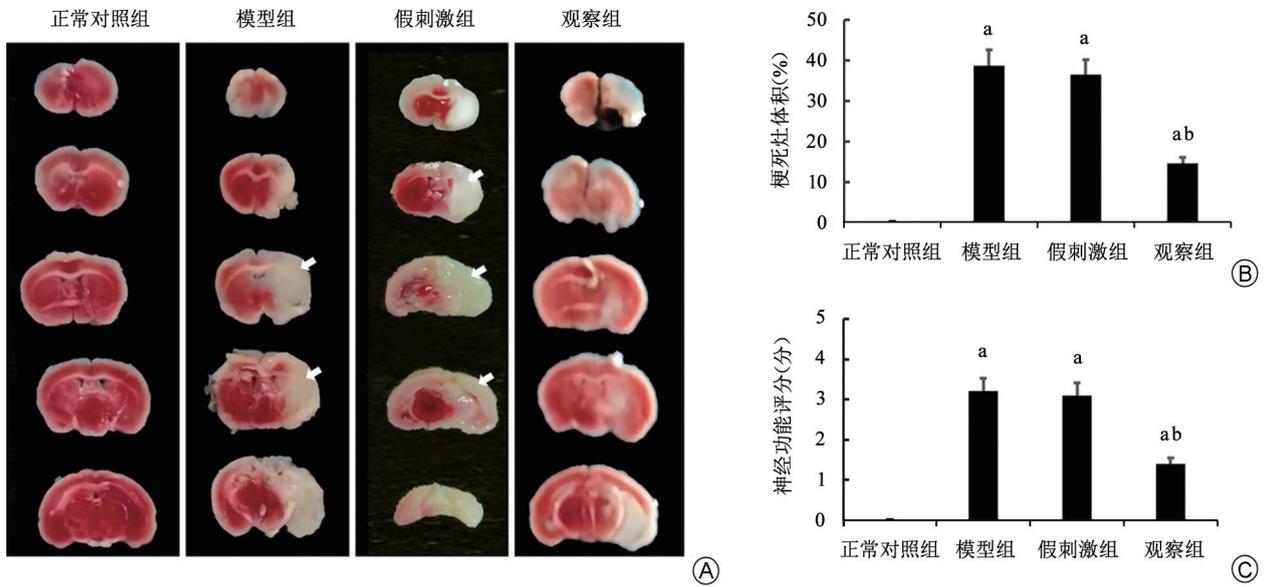
于 rTMS 干预 7 d 后对各组小鼠进行神经功能评估, 发现正常对照组小鼠神经功能缺损评分为 0 分, 而模型组、假刺激组及观察组小鼠神经功能缺损评分 [分别为 (3.22 ± 0.68) 分、(3.16 ± 0.71) 分和 (1.46 ± 0.77) 分] 均较正常对照组显著增高 ($P < 0.05$), 并且模型组、假刺激组小鼠神经功能缺损评分亦显著高于观察组水平 ($P < 0.05$), 具体情况见图 1。

二、rTMS 对各组小鼠脑梗死体积的影响

正常对照组脑片 TTC 染色呈鲜红色, 提示不存在梗死病灶; 与正常对照组比较, 假刺激组、模型组 TTC 染色可见皮质、海马及丘脑区均出现大面积梗死灶 (呈白色), 而对侧正常脑区呈现红色; 观察组 TTC 染色显示皮质、海马及丘脑区梗死灶明显缩小。通过进一步比较发现, rTMS 组脑梗死灶体积较模型组及假刺激组均显著缩小, 组间差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 具体情况见图 1A 和图 1B。

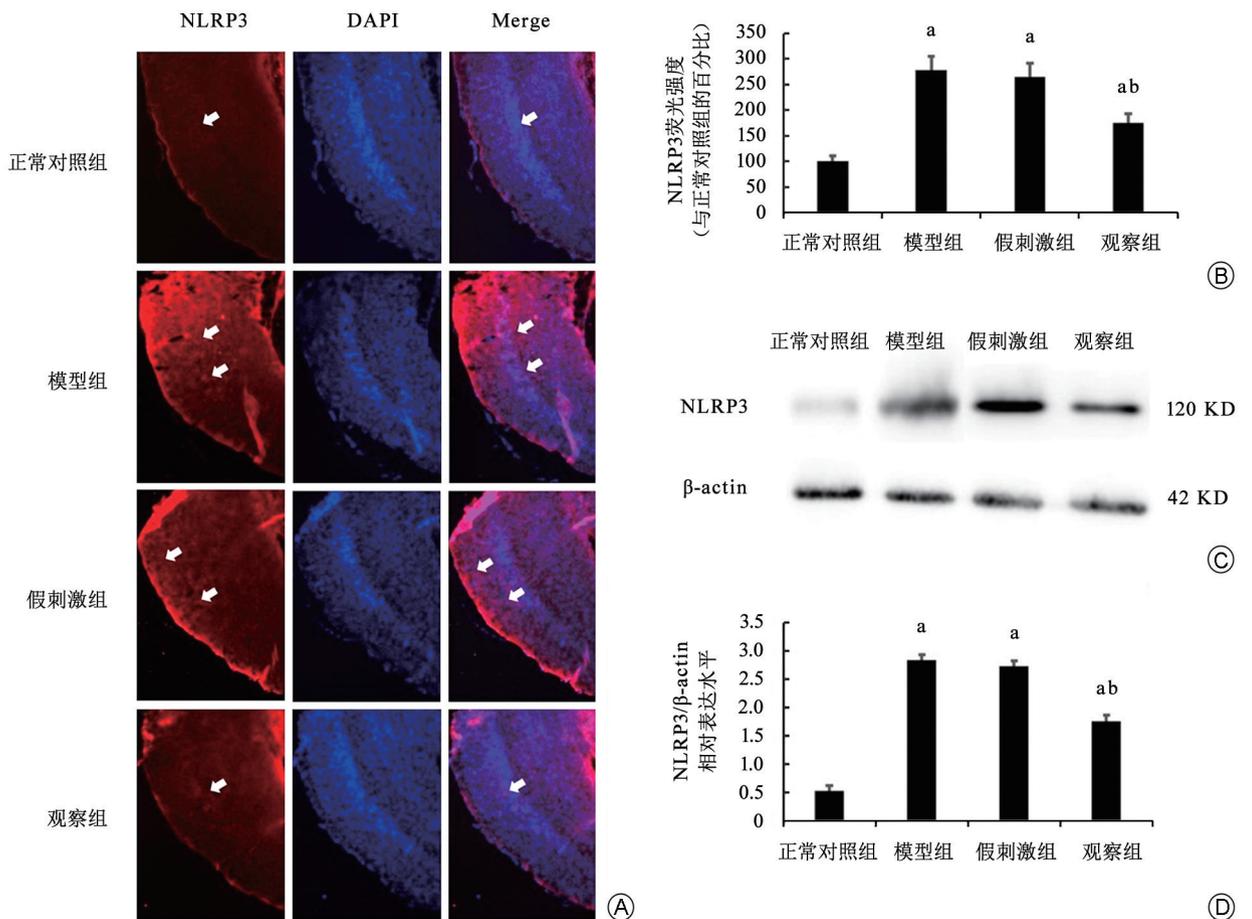
三、rTMS 对各组小鼠皮质 NLRP3 表达的影响

4 组小鼠脑皮质中均有 NLRP3 阳性染色神经细胞, 可见红色的颗粒状阳性染色主要分布于细胞膜、细胞质及突起部位 (图 2)。与表达量很低的正常对照组比较, 模型组及假刺激组神经细胞 NLRP3 阳性染色



注:箭头处为梗死病灶;与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组及假刺激组比较,^b $P < 0.05$

图 1 4 组小鼠神经功能评分及脑梗死情况比较(TTC 染色)



注:箭头处为 NLRP3 阳性神经细胞,可见细胞膜、胞质及突起部位均有阳性染色颗粒;DAPI 指 4,6-二氨基-2-苯基吡咯(4,6-diamidino-2-phenylindole);与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组及假刺激组比较,^b $P < 0.05$

图 2 4 组小鼠脑皮质 NLRP3 免疫荧光染色及蛋白表达比较($\times 200$)

率明显增高 ($P<0.01$); 与模型组及假刺激组比较, 观察组脑片显示有较多神经细胞存活, 且 NLRP3 阳性染色率亦大幅下降 ($P<0.05$), 但仍显著高于正常对照组水平 ($P<0.05$), 具体情况见图 2。

与正常对照组比较, 模型组、假刺激组及观察组脑皮质中 NLRP3 蛋白表达均显著增强 ($P<0.05$), 并且模型组、假刺激组 NLRP3 蛋白表达亦显著强于观察组水平 ($P<0.05$), 具体情况见图 2。

四、rTMS 对各组小鼠脑皮质 IL-1 β 及 IL-18 表达的影响

与正常对照组比较, 模型组、假刺激组及观察组脑皮质 IL-1 β 及 IL-18 表达均显著增强 ($P<0.05$); 并且模型组、假刺激组脑皮质 IL-1 β 及 IL-18 表达亦显著强于观察组水平 ($P<0.05$), 具体情况见图 3。

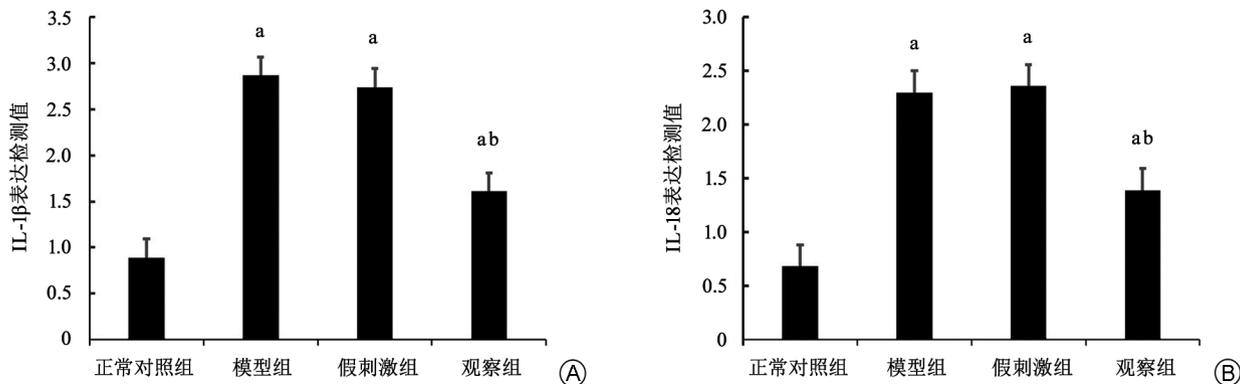
讨 论

本研究结果显示, 实验小鼠经 MCAO 制模后出现神经功能障碍, 其神经细胞胞膜、胞质及突起内可见大量炎性小体经典分子 NLRP3 蛋白表达, 炎性因子 IL-1 β 、IL-18 大量分泌释放, 能诱发神经细胞焦亡, 进一步加重脑损伤; 而制模后小鼠经低频 rTMS 干预后, 发现其脑梗死灶体积缩小, 神经功能障碍改善, 神经细胞焦亡发生率显著降低, 炎性因子含量也明显减少。上述结果提示低频 rTMS 可通过抑制小鼠脑皮质及海马中 NLRP3 蛋白表达及 IL-1 β 、IL-18 等炎性因子释放, 减少神经细胞焦亡, 进而缩小脑梗死灶体积并改善受损神经功能, 对脑缺血损伤具有治疗作用。

近年来相关研究发现除坏死、凋亡等细胞死亡方式外, 还存在一种在固有免疫系统中发生的以炎性因子 IL-1 β 和 IL-18 大量释放为主要特征的死亡方式——焦亡。焦亡在很多疾病(如肿瘤、心梗、肾炎及

神经退行性疾病等)中均发挥重要作用^[4-6,13]; 如 Deora 等^[14]指出, 小胶质细胞 NLRP3 炎性小体激活是神经退行性变过程中神经发炎的关键因素, 能刺激炎性因子释放、促进疾病恶化, 提示小胶质细胞焦亡在神经系统疾病中具有重要影响; 同时本课题组利用拟神经元的 HT22 细胞制作 IS 模型, 发现 IS 后 NLRP3 蛋白表达明显增强, IL-1 β 及 IL-18 大量释放, 而白藜芦醇能有效抑制焦亡, 对 IS 后神经损伤具有改善作用^[15]。与上述离体细胞实验获得的结果类似, 本研究在 MCAO 模型小鼠(伴有多种神经功能障碍)脑皮质、海马及纹状体等脑组织中均发现梗死灶, 同时神经细胞中 NLRP3 蛋白表达明显增强, IL-1 β 及 IL-18 大量释放, 能促使神经元发生焦亡, 提示 IS 后脑梗死灶形成或扩大, 并由此造成运动性或非运动性功能障碍可能与焦亡密切相关。

rTMS 作为一种无痛、无创、操作简便且安全性较高的神经电生理刺激技术目前已在临床上获得广泛应用, 该疗法通过重复脉冲磁场刺激局部中枢神经系统, 通过调节磁刺激频率、持续时间、刺激间歇及强度影响中枢神经系统兴奋性, 对脑卒中、脑创伤、认知障碍或抑郁等精神类疾病具有治疗作用。戈蕾等^[16]发现低频 rTMS 联合依达拉奉可有效抑制脑梗死失语患者体内炎性反应, 特别是降低高敏 C 反应蛋白 (high sensitivity C reactive protein, hs-CRP)、IL-6、肿瘤坏死因子 α 水平, 能改善神经组织受损程度, 促进皮质语言中枢神经元功能恢复。李辉萍等^[17]也发现 rTMS 可通过减轻脑梗死后 IL-6 等炎性因子诱发的炎症反应, 促进神经功能改善。近年来有大量文献报道^[18-19], 脑损伤动物模型经 rTMS 干预后, 发现其脑组织内脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 片段减少, 脑梗死体积缩小, 大脑皮质血流量 (cerebral blood flow, CBF) 明显改善, 相关治疗机制可能与抑制细胞凋亡等因素有关



注: 与正常对照组比较, ^a $P<0.01$; 与模型组及假刺激组比较, ^b $P<0.05$

图 3 4 组小鼠脑皮质 IL-1 β 及 IL-18 表达比较

本研究结果发现, MCAO 模型小鼠经低频 rTMS 干预 7 d 后, 发现其神经细胞内 NLRP3 表达明显减弱, 炎症因子 IL-1 β 及 IL-18 水平均显著降低, 神经功能评分也明显改善, 提示 rTMS 治疗 IS 后神经功能障碍的机制在一定程度上可能与减轻炎症反应、抑制细胞焦亡有关。

综上所述, 本研究发现 MCAO 模型小鼠神经元内 NLRP3 大量表达, IL-1 β 及 IL-18 等炎症因子水平明显增高, 能诱发神经元焦亡; 而 1 Hz 低频 rTMS 干预能抑制神经元内 NLRP3 表达并降低炎症因子水平, 减少神经细胞焦亡, 缩小脑梗死灶体积并加速受损神经功能恢复; 后续研究将利用基因敲除或过表达技术, 进一步探讨 rTMS 治疗脑梗死的分子信号机制及临床应用安全性。

参 考 文 献

- [1] Nadruz W, Claggett B, Henglin M, et al. Racial disparities in risks of stroke [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376 (21): 2089-2090. DOI: 10.1056/NEJMc1616085.
- [2] 孙松堂, 王丽娜, 朱良付, 等. 急性缺血性脑卒中颅内动脉粥样硬化的识别与治疗进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2020, 20 (41): 67-68, 70. DOI: 10.3969/j.issn.1671-3141.2020.41.030.
- [3] An JQ, Cheng YW, Guo YC, et al. Safety and efficacy of remote ischemic postconditioning after thrombolysis in patients with stroke [J]. *Neurology*, 2020, 95 (24): 3355-3363. DOI: 10.1212/WNL.0000000000010884.
- [4] Broz P. Immunology: Caspase target drives pyroptosis [J]. *Nature*, 2015, 526 (7575): 642-643. DOI: 10.1038/nature15632.
- [5] Zeng ZL, Li GH, Wu SY, et al. Role of pyroptosis in cardiovascular disease [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52 (2): e12563. DOI: 10.1111/cpr.12563.
- [6] Fiachra H, Liraz SG, Natalia KC, et al. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis [J]. *Science*, 2020, 369 (6511): 1633-1637. DOI: 10.1126/science.abb9818.
- [7] Lefaucheur JP, Aleman A, Baeken C, et al. Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS): an update (2014-2018) [J]. *Clin Neurophysiol*, 2020, 131 (2): 474-528. DOI: 10.1016/j.clinph.
- [8] McClintock SM, Reti IM, Carpenter LL, et al. Consensus recommendations for the clinical application of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in the treatment of depression [J]. *J Clin Psychiatry*, 2018, 79 (1): 10905. DOI: 10.4088/JCP.16cs10905.
- [9] 黄步哲, 廖亮华, 高丽君, 等. 高频与低频重复经颅磁刺激对脑外伤患者认知功能的影响 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2019, 41 (5): 329-331. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.05.003.
- [10] Huang L, Ma Q, Li Y, et al. Inhibition of microRNA-210 suppresses pro-inflammatory response and reduces acute brain injury of ischemic stroke in mice [J]. *Exp Neurol*, 2018, 300: 41-50. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.10.024.
- [11] Dong Q, Wang Y, Ping G, et al. The neuroprotective mechanism of low-frequency rTMS on nigral dopaminergic neurons of Parkinson's disease model mice [J]. *Parkinsons Dis*, 2015, 25: 564095. DOI: 10.1155/2015/564095.
- [12] Wang J, Zhang WT, Lv C, et al. A novel biscoumarin compound ameliorates cerebral ischemia reperfusion-induced mitochondrial oxidative injury via Nrf2/Keap1/ARE signaling [J]. *Neuropharmacology*, 2020, 167: 107918. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.107918.
- [13] Chen X, Liu G, Yuan Y, et al. NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF-kappaB signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10 (12): 906. DOI: 10.1038/s41419-019-2157-1.
- [14] Deora V, Lee JD, Albornoz EA, et al. The microglial NLRP3 inflammatory is activated by amyotrophic lateral sclerosis proteins [J]. *Glia*, 2020, 68 (2): 407-421. DOI: 10.1002/glia.23728.
- [15] 秦灵芝, 李玮, 王晓娟, 等. 白藜芦醇预处理减轻神经元焦亡及对神经缺血性损伤的保护作用 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2019, 48 (1): 38-41. DOI: 10.3870/j.issn.1672-0741.2019.01.007.
- [16] 戈蕾, 赵玉晓, 常永霞, 等. 低频重复经颅磁刺激联合依达拉奉对脑梗死失语患者炎症因子及脑代谢产物的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2017, 23 (5): 694-697. DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20161205.006.
- [17] 李辉萍, 徐伟, 宋治, 等. 重复经颅磁刺激对急性脑梗死患者血清白介素-6 水平及神经功能康复的影响 [J]. *中国全科医学*, 2010, 13 (33): 3709-3711. DOI: 10.3969/j.issn.1007-9572.2010.33.002.
- [18] Ganho-Avila A, Poleszczyk A, Mohamed MMA, et al. Efficacy of rTMS in decreasing postnatal depression symptoms: A systematic review [J]. *Psychiatry Res*, 2019, 279 (5): 315-322. DOI: 10.1016/j.psychres.2019.05.042.
- [19] 李书剑, 秦灵芝, 邵文君, 等. 重复经颅磁刺激联合丁苯酞软胶囊治疗脑梗死患者的疗效观察 [J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2020, 42 (1): 37-39. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2020.01.009.

(修回日期: 2022-04-12)

(本文编辑: 易 浩)