

· 基础研究 ·

重复经颅磁刺激对血管性痴呆大鼠认知功能影响的机制

王菲 耿鑫 陶华英 赵鹏 程焱

【摘要】目的 研究重复经颅磁刺激对血管性痴呆 (VD) 大鼠认知功能康复的影响, 探讨其康复治疗的分子学机制。**方法** 将 36 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、VD 模型组、VD 低频组和 VD 高频组, VD 低频组和 VD 高频组大鼠接受的刺激频率分别为 0.5 Hz 和 5 Hz。采用 Morris 水迷宫测试方法检测各组大鼠认知功能, 透射电镜下观察各组大鼠海马 CA1 区超微结构变化。应用实时定量逆转录多聚酶链反应 (RT-PCR)、Western blot 方法分别检测海马突触素、脑源性神经营养因子、N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 大鼠 Morris 水迷宫测试结果提示 2 个治疗组认知功能有改善, 各项指标均优于 VD 模型组 ($P < 0.05$); 透射电镜观察结果从形态学上显示 2 个治疗组突触界面曲率、突触后致密物质厚度、突触活性带长度均较 VD 模型组增加 ($P < 0.05$)。2 个治疗组各检测因子表达量也明显高于 VD 模型组 ($P < 0.05$)。**结论** 重复经颅磁刺激对 VD 致认知功能障碍有治疗作用, 其机制可能与其促进海马突触素、脑源性神经营养因子、N-甲基-D-天冬氨酸受体 1 的表达有关。

【关键词】 血管性痴呆; 重复经颅磁刺激; 突触素; 脑源性神经营养因子; N-甲基-D-天冬氨酸受体 1

Repetitive transcranial magnetic stimulation for the rehabilitation of vascular dementia: Mechanisms WANG Fei*, GENG Xin, TAO Hua-ying, ZHAO Peng, CHENG Yan. * Department of Neurology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Corresponding author: CHENG Yan, Email: cylfl@sohu.com

【Abstract】Objective To study the mechanism by which transcranial magnetic stimulation (rTMS) affects cognitive dysfunction in vascular dementia (VD). **Methods** Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into a control group, a VD group, a low frequency rTMS group and a high frequency rTMS group. Two-vessel occlusion was employed to induce VD models. Low frequency rTMS group rats were given 0.5 Hz rTMS for six weeks. High frequency rTMS group rats were given 5 Hz rTMS for six weeks. Morris' water maze test was used to measure their spatial learning ability and memory. The ultrastructures of the synapses in the four groups were detected with transmission electron microscopy. The expression of synaptophysin (SYN), brain derived neurotrophic factor (BDNF) and N-methyl-D-aspartate receptor 1 (NMDAR1) mRNA and protein in the hippocampus were determined by real-time PCR and Western blotting. **Results** The behavior and morphology of the rats treated with rTMS improved. The average expression of SYN, BDNF and NMDAR1 mRNA and protein in the low frequency rTMS group and the high frequency rTMS group were significantly higher than in the VD group. **Conclusion** rTMS can provide a rehabilitative effect for VD. The mechanism might be associated with enhancing the expression of SYN, BDNF and NMDAR1 in the hippocampus.

【Key words】 Vascular dementia; Transcranial magnetic stimulation; Synaptophysin; Neurotrophic factors; N-methyl-D-aspartate receptor 1

经颅磁刺激是 1985 年由 Baker 等^[1]首先应用于人体, 它具有无创性、无疼痛感、穿透力强、操作简便、安全可靠等优点。重复经颅磁刺激 (repetitive transcranial

magnetic stimulation, rTMS) 为经颅磁刺激的一种形式, 有研究表明, rTMS 对于脑卒中、阿尔茨海默病、癫痫、抑郁症等有很好的治疗作用, 对患者认知障碍有一定的疗效, 但其确切的作用机制尚未明了。

有报道称, 在亚洲国家中, 血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 这一与脑血管疾病相关的痴呆类型已成为老年期痴呆的首发原因^[2], 随着我国人口的老龄化和人们对生活质量要求的提高, VD 进一步引起我国医学界的重视。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.10.003

基金项目: 天津市科技发展计划重点项目 (06YFSZSF01700)

作者单位: 300052 天津, 天津医科大学总医院神经内科 (王菲、赵鹏、程焱), 神经病学研究所 (陶华英、程焱); 天津医科大学生物化学与分子生物学教研室 (耿鑫)

通信作者: 程焱, Email: cylfl@sohu.com

针对 VD 发病机制的康复治疗,近年来也在不断发展中,如康复运动训练、电针等是近年来研究的热点,但应用 rTMS 治疗 VD 鲜见报道。突触素(synaptophysin, SYN)、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、N-甲基-D-天冬氨酸受体 1(N-methyl-D-aspartate receptor 1, NMDAR1)三种蛋白与 VD 发病关系密切。为此,本实验研究了 rTMS 对 VD 大鼠认知功能康复的影响,并通过检测上述三种介质的 mRNA 和蛋白表达变化,探讨其康复治疗的分子学机制。

材料与方法

一、实验动物

选择健康雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重(290 ± 20)g,购自军事医学科学院实验动物中心。每笼饲养 4~6 只大鼠,每天给予充足的水和饲料;生活条件为 12 h 光照,12 h 黑暗,室温维持在(25 ± 1)℃。所有涉及动物的实验均按美国国立卫生院(National Institute of Health)颁布的“实验动物的照料和使用指南”要求操作。

二、VD 模型的制作

在 VD 模型制作前,采用随机数字表法将 36 只大鼠分成正常对照组 10 只、VD 模型组 10 只、VD 低频组 8 只和 VD 高频组 8 只。VD 模型组、VD 低频组及 VD 高频组参照 Ni 等^[3]介绍的方法,采用双侧颈总动脉持久性结扎(permanent bilateral common carotid artery occlusion)方法制作 VD 大鼠模型。大鼠于术前 8~12 h 禁食,不禁水,用 10% 水合氯醛(按 0.03 ml/kg 体重)腹腔注射麻醉。将大鼠仰卧位固定,行腹侧颈正中切口,钝性分离双侧颈总动脉,用 4 号缝线双重结扎,伤口用庆大霉素处理防止感染,缝合皮肤。术中注意防止过分牵拉刺激或损伤迷走神经。

三、rTMS 治疗

rTMS 治疗于术后第 2 天进行,采用丹麦 Meditronic 公司产 Maglite Pro R30 型磁刺激仪,选用聚焦效果较好的 MC-B70 型“8”字形线圈,内径 10 mm,外径 80 mm。施加刺激时,将“8”字线圈中心对准大鼠矢状缝的中央点,线圈表面紧贴头皮,平行于大鼠顶骨。VD 低频组刺激频率为 0.5 Hz,刺激强度为 0.5 T,每日 20 串刺激,每串刺激 10 个脉冲,间隔 2~3 s 进行下一串刺激。连续刺激 5 d 为 1 个疗程,共 6 个疗程,每个疗程间间隔 2 d。VD 高频组刺激频率为 5 Hz,其余治疗参数同 VD 低频组。

四、认知功能的评定

采用 Morris 水迷宫试验评定大鼠认知功能^[4]。术后 2 d 存活的各组大鼠进行 Morris 水迷宫测试,rTMS 治疗 6 个疗程后各组大鼠再次进行 Morris 水迷宫测试。

1. 定位航行试验:连续训练 4 d,测试第 1 天让大鼠自由游泳 2 min 以熟悉环境,水池中无平台,观察大鼠的游泳速度,剔除游泳能力差的大鼠。从第 2 天开始,每天分为 2 个训练时段(上午 8 时和下午 4 时),间隔 8 h,每个训练时段训练 4 次。分别从水池的 I、II、III、IV 4 个象限入水点将鼠面向池壁放入水中,鼠头均朝向同侧,记录大鼠在水中寻找并爬上第 III 象限平台的时间,即逃避潜伏期。设定大鼠在平台上停留 2 s 为找到平台。如果大鼠在 120 s 内未找到平台,则将其引至平台,停留 20 s 以熟悉环境及平台位置,此时逃避潜伏期计为 120 s。游泳路程即从实验开始到实验结束也就是从大鼠入水位置到结束位置的路程。

2. 空间探索试验:第 5 天撤去平台,于第 I 象限入水点处将大鼠面向池壁放入水中,记录大鼠在 2 min 内的运动轨迹。计算其在第 III 象限游泳时间和在第 III 象限游泳路程占总游泳路程的百分比。

五、总 RNA 的提取

rTMS 治疗 6 个疗程后各组大鼠断头取脑,快速取出海马,用 TrizolTM 提取脑组织标本的总 RNA,采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测各标本 RNA 完整性,保存于 -80℃ 低温环境中。

六、BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达检测

采用实时定量逆转录聚合酶链反应(real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达。

1. 逆转录反应:70℃ 下处理 5 min,37℃ 下处理 60 min,70℃ 下处理 15 min,然后将 cDNA 保存于 -20℃ 下。

2. 扩增 SYN、BDNF、NMDAR1 目的片段:SYN 引物序列上游为 CCC TAC ATT CAC CCA CTT CTC C,下游为 TTA TCT CCT CTC TGC CCG TTT C,片段长度 363 bp;BDNF 引物序列上游为 GTG ACA GTA GTA GCG AGT GGG,下游为 TAT CCT TAT GAA CCG CCA GCA,片段长度 278 bp;NMDAR1 引物序列上游为 AAG TAT GCG GAT GCG GTG ACT,下游为 CAA AAG CCG TAG CAT CAC TGA,片段长度 392 bp; β -actin 上游为 GAG ACC TAC AAG ACC CCA GCC,下游为 TCG GCG CAT CGG TAC CGC TCA,片段长度 445 bp。

3. RT-PCR 反应:应用 LightCycler PCR 系统,按照说明书进行操作。RT-PCR 总体积 20 μ l,包括 2 μ l cDNA,0.5 μ mol/L 反应引物和 PCR 反应混合物。反应条件:95℃ 下处理 10 min,随后进行 PCR,共 35 个循环,95℃ 下处理 10 min,60℃ 下处理 10 s,72℃ 下处理 20 s,87℃ 下处理 2 s。应用凝胶成像系统检测 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达量,以其表达量与

β -actin 的比值 $\times 100$ 作为相对值进行统计分析。

七、BDNF、NMDAR1 和 SYN 的蛋白表达检测

采用 Western blot 方法检测蛋白的表达。rTMS 治疗 6 个疗程后各组大鼠断头取脑,快速取出海马, -70°C 冰箱中保存备用。取样品组织匀浆并离心,取上清液,应用 Bio-Rad 公司提供的蛋白质定量试剂盒进行蛋白质定量;蛋白质标本中加入等体积的上样缓冲液,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离,蛋白质上样量为 $20\ \mu\text{l}$;电泳结束后,用湿法将蛋白质转印至硝酸纤维素膜上,用 5% 的脱脂奶封闭过夜,然后分别加入 anti-SYN、anti-BDNF、anti-NMDAR1 蛋白一抗孵育 2 h,TTBS 洗膜;再加入二抗,室温孵育 1 h,TTBS 充分洗膜,显色;以 β -actin 作为内参,应用图像处理系统进行分析,计算 SYN、BDNF、NMDAR1 蛋白条带的整合光密度值。以整合光密度值与 β -actin 光密度值的比值 $\times 100$ 为相对值进行统计分析。

八、透射电镜观察

根据 Pellegrino 大鼠脑立体定位图谱^[5],rTMS 治疗 6 个疗程后迅速切取各组大鼠海马 CA1 区脑组织,立即投入 2% 戊二醛固定液(含 3% 新鲜多聚赖氨酸)中,1% 锇酸后固定 1 h,常规乙醇、丙酮脱水并固定,环氧树脂 Epon 812 包埋;应用 LKB-Nove 型超薄切片机切片,醋酸铀、柠檬酸铅双染色,于透射电镜下观察并拍片。用图像分析软件对突触界面曲率、突触后致密物质 (postsynaptic density, PSD) 厚度、突触活性带长度等进行定量分析。

九、统计学分析

所有数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用 SPSS 13.0 版统计软件包进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,用 Student's *t* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、rTMS 治疗对大鼠认知功能的影响

1. 定位航行试验结果:VD 模型组连续 3 d 的全时程平均逃避潜伏期及游泳路程与正常对照组比较,显著延长($P < 0.05$);VD 低频组、VD 高频组的全时程平均逃避潜伏期及游泳路程与 VD 模型组比较,显著缩短($P < 0.05$);VD 低频组与 VD 高频组上述参数比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2. 空间探索试验结果:与正常对照组比较,VD 模型组大鼠在第Ⅲ象限游泳时间显著缩短,在第Ⅲ象限游泳路程占总路程的百分比明显降低($P < 0.05$);与 VD 模型组比较,VD 低频组、VD 高频组大鼠在第Ⅲ象限游泳时间显著延长,在第Ⅲ象限游泳路程占总路程的百分

比明显提高($P < 0.05$);VD 低频组与 VD 高频组上述参数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

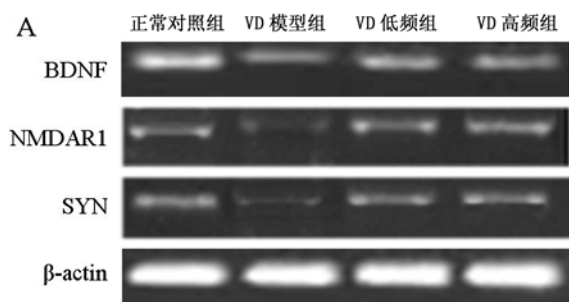
表 1 各组大鼠定位航行试验及空间探索
试验测试结果比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	只 数	全时程 平均逃避 潜伏期(s)	游泳路程 (cm)	在第Ⅲ 象限游泳 时间(s)	在第Ⅲ象限 游泳路程占 总路程百分比 (%)
正常对照组	10	20.41 $\pm$ 3.78	506.47 $\pm$ 32.18	79.34 $\pm$ 13.84	65.71 $\pm$ 7.23
VD 模型组	10	61.32 $\pm$ 7.29 ^a	1380.53 $\pm$ 128.69 ^a	33.19 $\pm$ 7.83 ^a	26.41 $\pm$ 4.37 ^a
VD 低频组	8	31.18 $\pm$ 5.73 ^{abc}	743.89 $\pm$ 60.47 ^{abc}	68.21 $\pm$ 10.26 ^{abc}	58.73 $\pm$ 6.28 ^{abc}
VD 高频组	8	33.34 $\pm$ 6.84 ^{ac}	791.48 $\pm$ 67.33 ^{ac}	64.23 $\pm$ 9.32 ^{ac}	56.03 $\pm$ 5.79 ^{ac}

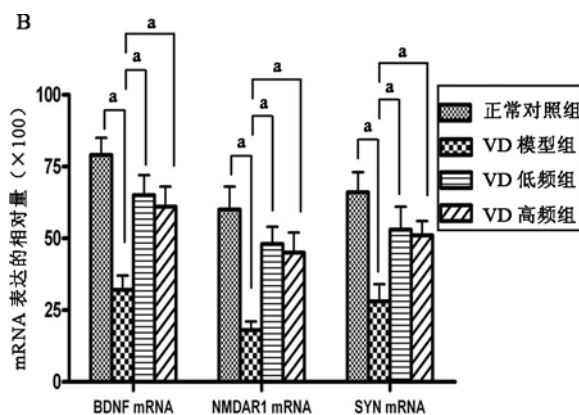
注:与正常对照组比较,^a $P < 0.05$;与 VD 高频组比较,^b $P > 0.05$;与 VD 模型组比较,^c $P < 0.05$

二、各组 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达

VD 模型组的 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达水平显著低于正常对照组($P < 0.05$);VD 低频组和 VD 高频组的 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达水平显著高于 VD 模型组($P < 0.05$);VD 低频组与 VD 高频组的 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。



RT-PCR 方法检测 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达情况



BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达相对量,^a $P < 0.05$

图 1 各组 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的 mRNA 表达

三、各组 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的蛋白表达

VD 模型组 SYN、BDNF、NMDAR1 的蛋白表达水

平显著低于正常对照组 ($P < 0.05$); VD 低频组和 VD 高频组的蛋白表达水平显著高于 VD 模型组 ($P < 0.05$); VD 低频组与 VD 高频组 BDNF、NMDAR1 和 SYN 的蛋白表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

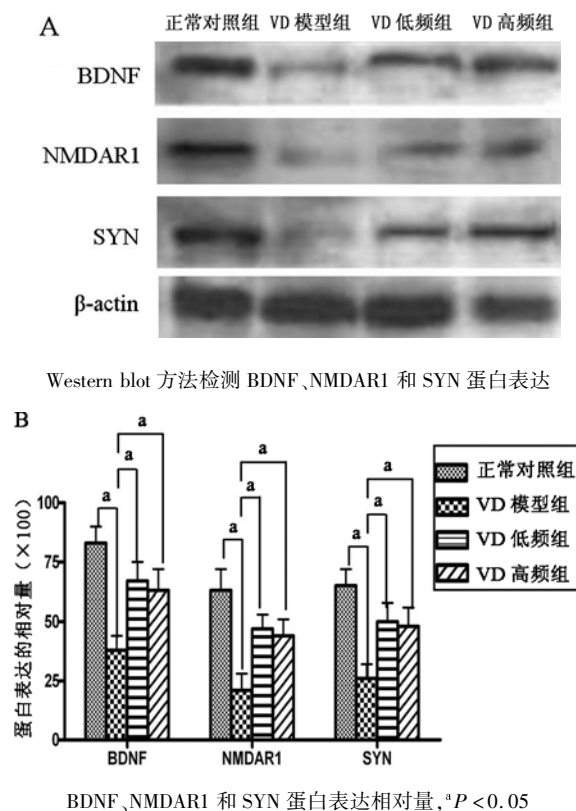


图 2 各组 BDNF、NMDAR1 和 SYN 蛋白表达

四、透射电镜超微结构观察

电镜下观察到, VD 模型组大鼠海马 CA1 区突触数量较正常对照组多, 但突触体积明显减小, 形态改变为长形或不规则形; 突触前区变形, 突触小泡减少并聚集, 线粒体凝聚; 突触后区体积减小, 突触前后膜增厚、融合, 突触间隙消失, 失去其正常形态。与 VD 模型组比较, VD 低频组与 VD 高频组大鼠海马 CA1 区突触形态较规则, 为球形; 突触前区小泡丰富, 均匀分布, 线粒体凝集程度减轻; 突触后区线粒体轻度变性, 突触前后膜略见增厚, 但突触间隙可辨认, 部分突触结构近于正常。各组大鼠海马 CA1 区突触结构参数见表 2。

表 2 各组大鼠海马 CA1 区突触结构参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	只数	突触界面 曲率	PSD 厚度 (nm)	突触活性带 长度 (nm)
正常对照组	10	1.123 ± 0.021	63.51 ± 3.11	287.34 ± 61.35
VD 模型组	10	1.020 ± 0.014 ^a	55.02 ± 3.66 ^a	201.56 ± 62.22 ^a
VD 低频组	8	1.081 ± 0.023 ^{abc}	60.06 ± 2.55 ^{abc}	255.24 ± 52.76 ^{abc}
VD 高频组	8	1.073 ± 0.035 ^{ac}	60.01 ± 4.12 ^{ac}	255.89 ± 66.43 ^{ac}

注: 与正常对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 VD 高频组比较, $^b P > 0.05$; 与 VD 模型组比较, $^c P < 0.05$

讨 论

rTMS 是指通过特殊装置将磁刺激以重复的形式传递到脑组织, 可暂时改变被刺激组织的兴奋性而发挥治疗作用^[6]。rTMS 作用于脑组织后即产生电场, 当生成的生物电流超过神经细胞兴奋性阈值时则可则使细胞膜去极化, 激活神经细胞, 从而引起各种生理生化反应及微观变化^[7]。在神经元处于不应期时, rTMS 作用仍存在, 将产生兴奋性突触后电位总和, 从而发挥更大的治疗作用^[8]。但不同的刺激参数所引起的生物学效应不相同^[6]。本实验显示, 低频磁刺激与高频磁刺激治疗结果差异无统计学意义, 可能由于实验条件所限, 样本量偏小, 今后还应进一步加大样本量, 继续加以探讨。高频率、高强度的经颅磁刺激有使皮质兴奋性扩散的作用, 可诱发癫痫等不良事件^[9]。在本实验中, 大鼠未发生癫痫等不良事件, 故我们的实验条件下, 所选用的参数是安全的。

SYN 是突触前区中的重要囊泡膜蛋白之一, 可间接反映突触的数量、密度和分布情况, 是突触功能的物质基础^[10]。SYN 是 1985 年由 Jahn 等^[11]首先在大鼠脑内发现的是一种钙结合蛋白, 在神经元胞体内合成后主要转运至轴突终末, 特异性位于轴突终末的突触前区中突触囊泡膜上, 是突触前终末的特异性标志物。SYN 参与囊泡转运、排放和再循环, 可能在钙离子依赖的神经递质, 如乙酰胆碱、谷氨酸的释放过程中起重要作用, 还可能参与突触的发生, 反映突触传递效能^[12]。本实验的电镜观察发现, VD 模型组突触数目虽较正常对照组多, 但突触形态明显改变, 结构明显破坏。同时, 本研究结果还显示, VD 模型组 SYN 表达量低于正常对照组, 可见虽然 VD 模型组突触数目增多, 但突触功能下降。有研究表明, 磁刺激可以引起局部脑血流量增加, 从而有利于神经细胞的生长, 形成新的树突和轴突^[13]。反复磁刺激可降低突触传导阈值, 使突触变得相对活跃, 从而形成新的传导路径, 促进神经功能恢复。本实验结果显示, VD 低频组和 VD 高频组海马 SYN 的表达量高于 VD 模型组, 部分突触结构近于正常。上述变化说明, rTMS 可促进突触发生和再建, 从而增加突触的传递效能, 这可能为 rTMS 治疗 VD 的机制之一。

BDNF 最初是由 Barde 等于 1982 年从猪脑中分离获得, 是脑中含量最多的神经营养因子, 不仅能促进神经细胞生长、分化, 维持其存活, 而且对缺血缺氧神经细胞具有保护作用^[14], 在改善认知功能障碍方面也起着重要作用^[15]。研究发现, rTMS 可通过上调 BDNF 的表达, 实现其对缺血缺氧脑组织的保护作用^[16]。此与本实验结果一致。但 rTMS 调节 BDNF 表达增高的

机制目前尚未明确。有研究表明,rTMS 可促使即早基因 c-fos 表达上调^[17],而作为第三信使的 c-fos 可调节 BDNF 基因的表达,从而实现其生理功能^[18]。

NMDAR 的分布在海马 CA1 区最为密集,NMDAR1 是 NMDAR 功能亚单位,具有 NMDAR 的全部功能特性,与学习记忆关系密切^[19]。在脑缺血缺氧慢性期,NMDAR 介导的兴奋性氨基酸的细胞毒性作用已不存在,学习记忆功能的进一步损害可能与 NMDAR 减少致突触传递功能障碍有关。NMDAR1 的激活在长时程增强(long-term potentiation,LTP)的诱导和空间学习记忆中有着重要的作用^[20]。Black^[21]采用膜片钳技术研究后发现,BDNF 可通过增加 NMDAR 通道的开放频率,特异性地增强突触后致密物上 NMDAR 亚单位的磷酸化,进而影响 NMDAR 依赖性 LTP 的产生。rTMS 可能通过促进 BDNF 等神经营养因子及其相关基因 c-fos 等的表达,增加 NMDAR 通道的开放频率,特异性地增强突触后致密物上 NMDAR 亚单位的磷酸化,促进 NMDAR 依赖的 LTP。同时,NMDAR 被激活后,钙离子通透性增加,进入细胞内激活钙离子依赖性酶,从而引起一系列生理生化过程,改变突触的传递效能,促使学习记忆功能增强。此途径可能为 rTMS 促进 VD 致认知功能障碍康复的另一可能机制。

综上所述,应用 rTMS 的常规参数进行治疗,不仅不会引起脑组织损伤,而且还具有促进神经功能康复的作用,其安全性已得到认可。本研究结果发现,VD 大鼠脑组织中与认知功能相关的 SYN、BDNF 和 NMDAR1 的 mRNA 和蛋白表达量均低于正常对照组,但在应用 rTMS 治疗一段时间后,这三种介质 mRNA 及蛋白的表达量均有所增加,由此,我们推测 rTMS 对 VD 致认知功能障碍有治疗作用,其具体机制还有待进一步的探索。

参 考 文 献

- [1] Barker AT, Lalinous R, Freeston IL. Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*, 1985, 1: 1106-1107.
- [2] Ikejima C, Yasuno F, Mizukami K, et al. Prevalence and causes of early-onset dementia in Japan: a population-based study. *Stroke*, 2009, 40: 2709-2714.
- [3] Ni J, Ohta H, Matsumoto K, et al. Progressive cognitive impairment following chronic cerebral hypoperfusion induced by permanent occlusion of bilateral carotid arteries in rats. *Brain Res*, 1994, 653: 231-236.
- [4] Morris R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Meth*, 1984, 11: 47-60.
- [5] Gamble HJ. A stereotaxic atlas of the rat brain. *J Anat*, 1980, 131: 199-200.
- [6] Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron*, 2007, 55: 187-199.
- [7] Miranda PC, Hallett M, Basser PJ. The electric field induced in the brain by magnetic stimulation: a 3-D finite-element analysis of the effect of tissue heterogeneity and anisotropy. *IEEE Trans Biomed Eng*, 2003, 50: 1074-1085.
- [8] Wassermann EM, Lisanby SH. Therapeutic application of repetitive transcranial magnetic stimulation: a review. *Clin Neurophysiol*, 2001, 112: 1367-1377.
- [9] Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron*, 2007, 55: 187-199.
- [10] Lauri SE, Lamsa K, Pavlov I. Activity blockade increases the number of functional synapses in the hippocampus of newborn rats. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22: 107-117.
- [11] Jahn R, Schiebler W, Ouimet C, et al. A 38000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad U S A*, 1985, 82: 4137-4141.
- [12] Tarsa L, Goda Y. Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99: 1012-1016.
- [13] Nadeau SE, McCoy KJ, Crucian GP, et al. Cerebral blood flow changes in depressed patients after treatment with repetitive transcranial magnetic stimulation: evidence of individual variability. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 2002, 15: 159-175.
- [14] Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, et al. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke*, 2009, 40: 1490-1495.
- [15] Chuang CM, Hsieh CL, Lin HY, et al. Panax Notoginseng Burk attenuates impairment of learning and memory functions and increases ED1, BDNF and beta-secretase immunoreactive cells in chronic stage ischemia-reperfusion injured rats. *Am J Chin Med*, 2008, 36: 685-693.
- [16] Cheeran B, Talelli P, Mori F, et al. A common polymorphism in the brain derived neurotrophic factor gene (BDNF) modulates human cortical plasticity and the response to rTMS. *J Physiol*, 2008, 586: 5717-5725.
- [17] Doi W, Sato D, Fukuzako H, et al. C-Fos expression in rat brain after repetitive transcranial magnetic stimulation. *Neuroreport*, 2001, 12: 1307-1310.
- [18] Zhang X, Mei Y, Liu C, et al. Effect of transcranial magnetic stimulation on the expression of c-Fos and brain-derived neurotrophic factor of the cerebral cortex in rats with cerebral infarct. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2007, 27: 415-418.
- [19] Béhé P, Stern P, Wyllie DJ. Determination of NMDA NR1 subunit copy number in recombinant NMDA receptors. *Proc Biol Sci*, 1995, 262: 205-213.
- [20] Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 1996, 87: 1327-1338.
- [21] Black IB. Trophic regulation of synaptic plasticity. *J Neurobiol*, 1999, 41: 108-118.

(修回日期: 2010-05-25)

(本文编辑: 吴 倩)