



电子、语音版

·论著·

重复经颅磁刺激对小鼠缺血性脑损伤修复及DJ-1表达的影响

程俊凯¹, 张磊¹, 罗耀文¹, 汪毅峰², 王彦刚¹

1. 空军军医大学西京医院神经外科, 陕西 西安 710032

2. 西安交通大学电气工程学院, 陕西 西安 710049

摘要:目的 探讨重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)通过调控DJ-1的表达,使小鼠缺血性脑损伤后的神经功能缺损得到恢复的机制。方法 选取8~12周健康雄性C57BL/6J小鼠30只,随机分为3组:假手术组(Sham组)、缺血再灌注组(MCAO组)和治疗组(rTMS组),每组10只。MCAO组使用线栓法制备大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)小鼠模型,Sham组小鼠处理同MCAO组但不插入线栓。Sham组和rTMS组给予rTMS治疗,MCAO组不予治疗。造模后1 h拔出线栓进行再灌注,再灌注24 h后开始给予rTMS治疗,频率为1 Hz,每次持续25 s,每日5次,连续治疗7 d。在治疗前后对各组小鼠进行神经功能缺损评分;使用TTC染色确定各组小鼠脑组织梗死灶面积;并采用免疫组化技术检测梗死灶周围区域神经元中DJ-1表达变化;使用免疫印迹技术检测DJ-1的蛋白水平表达变化。结果 与Sham组(0.50±0.53)比较,MCAO组(2.80±0.63)和rTMS组(2.10±0.32)的神经功能缺损评分显著增高($P<0.05$);与MCAO组比较,rTMS组的神经功能缺损评分显著降低($P<0.05$)。与MCAO组比较,rTMS组的梗死灶面积明显减小,DJ-1表达显著提高($P<0.01$)。结论 rTMS可有效促进缺血性脑损伤的小鼠神经功能恢复,并显著减少梗死灶面积,可能分子机制是通过上调神经DJ-1蛋白表达干预损伤预后。

[国际神经病学神经外科学杂志, 2023, 50(2): 1-5]

关键词:缺血性脑损伤;重复经颅磁刺激;DJ-1;大脑中动脉闭塞;神经系统损伤修复;小鼠

中图分类号:R743.3

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.1673-2642.2023.02.001

Effect of repeated transcranial magnetic stimulation on repair of ischemic brain injury and expression of DJ-1 in mice

CHENG Junkai¹, ZHANG Lei¹, LUO Yaowen¹, WANG Yifeng², WANG Yangang¹

1. Department of Neurosurgery, Airforce Medical University, Xijing Hospital, Xi'an, Shaanxi 710032, China

2. School of Electrical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China

Corresponding author: WANG Yangang, Email: yg-wang@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the effect of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on the recovery of neurological deficit in mice after ischemic brain injury by regulating the expression of DJ-1. **Methods** A total of 30 healthy male C57BL/6J mice, aged 8-12 weeks, were randomly divided into sham-operation group (Sham group), ischemia/reperfusion group (MCAO group), and treatment group (rTMS group), with 10 mice in each group. The mice in the MCAO group were used to establish a mouse model of MCAO by the suture method, and those in the Sham group were given the same treatment as the MCAO group without suture occlusion. The mice in the Sham group and the rTMS group were treated with rTMS, and those in the MCAO group were not given any treatment. After 1 hour of modeling, the suture was extracted

基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划(2017JM8073);空军军医大学第一附属医院学科助推计划(XJZT19Z23);陕西省重点研发项目(2019KW-039);陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JM-338)。

收稿日期:2022-07-12;修回日期:2023-02-22

作者简介:程俊凯(1994—),男,硕士研究生,主要从事神经系统损伤和癫痫的研究。Email:cjk534@qq.com。

通信作者:王彦刚(1965—),男,副主任医师,博士,主要从事神经系统损伤和癫痫的诊疗和研究。Email:yg-wang@163.com。

for reperfusion, and after 24 hours of reperfusion, rTMS treatment was given at a frequency of 1 Hz for 25 seconds each time, 5 times a day for 7 consecutive days. Neurological deficit score was determined for each group of mice before and after treatment; TTC staining was used to measure infarct area; immunohistochemistry was used to measure the change in the expression level of DJ-1 in neurons around the infarct area, and Western blotting was used to measure the change in the protein expression level of DJ-1. **Results** Compared with the Sham group, the MCAO group and the rTMS group had a significant increase in neurological deficit score (2.80 ± 0.63 , 2.10 ± 0.32 vs 0.50 ± 0.53 , $P<0.05$), and compared with the MCAO group, the rTMS group had a significant reduction in neurological deficit score ($P<0.05$). Compared with the MCAO group, the rTMS group had a significant reduction in infarct area and a significant increase in the expression of DJ-1 ($P<0.01$). **Conclusions** In mice with ischemic brain injury, rTMS can effectively promote neurological function recovery and significantly reduce infarct area, possibly by up regulating the protein expression of neuronal DJ-1 to intervene in the prognosis of such injury. [Journal of International Neurology and Neurosurgery, 2023, 50(2): 1-5]

Keywords: ischemic brain injury; repetitive transcranial magnetic stimulation; DJ-1; middle cerebral artery occlusion; nervous system injury repair; mouse

缺血性脑损伤(ischemic brain damage, IBD)的病因大多是脑主要动脉的血流短暂性或持久性的减少,大脑主要动脉被栓子堵塞或者管腔内形成血栓就会使大脑内的血流减少,由于缺血性脑损伤的发病率、致残率及复发率均高于全身各部位损伤,是一种严重威胁人类健康的疾病。恢复重症IBD患者意识并对受损神经组织结构和功能进行重建是一个艰巨而极具挑战的任务。有研究发现,定位于细胞核和细胞质中的DJ-1(一种经典的帕金森病相关蛋白)在氧化应激时可转位到线粒体,并具有多种功能,可以起到分子伴侣、转录调节剂、抗氧化清除剂和氧化还原传感器的作用^[1],进而可以有效改善IBD的预后。

由于IBD后的神经系统损伤机制十分复杂,而且其药物治疗效果不佳。近年来,理疗、针灸等非药物手段,特别是重复经颅磁刺激(repetitive transcranial magnetic stimulation, rTMS)在治疗缺血性脑损伤上取得了显著的疗效,并广泛应用于基础实验和临床研究中。rTMS是一种安全、无痛、便于操作的间接非侵入性治疗方法,其治疗原理是通电线圈产生穿过头皮的磁场在运动皮质诱发兴奋性变化,能在刺激期后改变和调节皮质活动,因此可以作为治疗神经和精神疾病的潜在方法^[2],并已在抑郁症、帕金森病、脑卒中及疼痛等神经精神疾病方面得到广泛应用^[3]。Lefaucheur等^[4]和Gao等^[5]的临床前及临床研究提示,rTMS对多种神经系统疾病具有治疗作用,如创伤、脑卒中、抑郁症和帕金森病。有研究报道,其治疗效果可能通过突触可塑性、增加神经营养因子及增强神经发生来介导^[6]。但rTMS能否通过影响DJ-1的表达进而影响缺血性脑损伤预后的研究未见报道。本研究拟采用rTMS治疗大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型小鼠神经功能障碍等,初步探讨rTMS在缺血性脑损伤功能恢复中的作用以及相关分子

信号机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选取8~12周清洁级健康雄性成熟C57BL/6J小鼠30只,由空军军医大学实验动物中心提供,体重(25 ± 2)g,所有动物均无异常。严格饲养于光照时间为12 h、调温20~23℃、调湿50%~60%的动物房。小鼠随机分为假手术组(Sham组)、缺血再灌注组(MCAO组)、治疗组(rTMS组),每组10只。各组均予以自由饮水及正常喂养。

1.2 动物造模

采用国际通用的线栓法建立动物MCAO模型。首先将直径约0.2 mm的尼龙线于75%医用乙醇中浸泡消毒,再放入肝素化的生理盐水中浸泡备用。采用异戊烷雾化吸入麻醉,暴露并分离左侧颈外动脉,结扎左侧颈总动脉,动脉夹暂时夹闭左侧颈内动脉,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,然后松开动脉夹,再将尼龙线继续插入直至大脑前动脉处(大约插入距颈总动脉分叉处9~10 mm),阻断大脑中动脉的血液供应。造模结束后1 h拔出尼龙线并扎紧结扎线,最后缝合皮肤。完成后将小鼠置于通风良好的笼中,直到小鼠意识恢复后,放回原笼内饲养。制模成功的标准为小鼠苏醒后表现为提尾时右侧前肢内收屈曲;同侧霍纳征;爬行时向右划圈;站立时右侧倾倒。凡具有上述4项体征者列入研究对象。

1.3 主要试剂与仪器

经颅磁刺激器由空军军医大学生物医学工程系和西安交通大学提供;小鼠抗兔DJ-1单克隆抗体由Abcam公司提供;小鼠抗兔 β -Actin单克隆抗体由Abcam公司提供;山羊抗兔IgG/辣根酶标记由中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.4 干预方法

小鼠造模结束1 h后拔出栓线进行再灌注,再灌注24 h后开始使用配有直径为9 cm圆形线圈的高聚焦磁刺激器对rTMS组小鼠进行连续7 d的低频干预。干预操作和刺激参数具体设置如下。①小鼠固定:给予干预前5 min将小鼠提前固定稳妥,以让小鼠适应环境。②线圈放置:使圆形线圈中心处于小鼠矢状缝中点,平行于顶骨并距离头皮5 mm处固定安置。③干预强度:将干预强度设置为能成功诱发麻醉小鼠后肢腓肠肌动作电位的平均强度,即0.4 Tesla。④干预频率:每天固定时间进行400个脉冲,频率1 Hz、强度0.4 Tesla、宽度70 μ s的单脉冲刺激,每20个脉冲为1串,串间间隔10 s^[7]。

1.5 标本取材及检测

1.5.1 小鼠神经功能评估 rTMS干预结束后,对3组小鼠进行肢体运动检测(共5分)。0分:无神经功能缺损(正常);1分:轻度神经功能缺损(损伤侧前爪不能完全伸展);2分:中度神经功能缺损(行走时小鼠向损伤侧转圈);3分:重度神经功能缺损(行走时小鼠身体向损伤侧倾倒);4分:意识丧失(不能自主行走)。

1.5.2 TTC染色法检测小鼠梗死灶面积 断头法处死小鼠后,在冰上迅速取脑(10 min内),在提前预冷的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)中转移, -20 °C冰箱冷冻30 min。将小脑、嗅球和低位脑干切除。切取冠状位脑片5~6片,每隔1~2 mm切一片,随后将脑片放入2%氯化三苯基四氮唑(triphenyl tetrazolium chloride, TTC)溶液中,避光37 °C水浴30 min,每5 min轻微晃动容器,使染色均匀。取出脑片用PBS洗涤3~5 min,可马上拍照。选择每一切片的尾侧面,采用病理图文分析系统进行图像分析,测量每片的梗死面积和总面积,每层梗死体积为该层梗死面积和层厚的乘积,各层的梗死体积之和即为总的梗死体积。

1.5.3 免疫组化法检测皮质DJ-1的表达 小鼠肢体运动评分结束后,对3组小鼠进行1%肝素溶液(4 °C)和4%多聚甲醛溶液(4 °C)心脏灌注后取脑,置于4 °C的4%多聚甲醛溶液浸泡24 h。脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,蜡块预冷后行冠状连续切片,片厚2 μ m。烤片30 min后,进行脱蜡、透明;在柠檬酸修复液中高压修复;在3%的过氧化氢(H₂O₂)中封闭20 min, PBS洗涤3遍;山羊血清封闭30 min,加入一抗抗体(DJ-1, 1:500), 4 °C过夜, PBS洗涤3遍;加入山羊抗兔二抗抗体(1:1 000)室温孵育30 min, PBS洗涤3遍;加入三抗抗体室温孵育20 min, PBS洗涤3遍, DAB显色5 min, 自来水终止;苏木素衬染5 min, 自来水冲洗;盐酸乙醇分化, 自来水水洗;返蓝2 min, 自来水水洗;脱水、透明、封片、镜检。

1.5.4 Western blotting检测DJ-1的表达 小鼠肢体运动评分结束后,对3组小鼠进行生理盐水心脏灌注取脑

后,收集皮质组织,提取总蛋白,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,聚丙烯酰胺凝胶电泳,分离蛋白后转移到硝酸纤维素膜上,与DJ-1(1:500), β -actin(1:2 000)抗体结合,然后与辣根过氧化物酶标记的二抗结合,电化学发光免疫分析法显色后照相。最后用凝胶成像系统摄影,图像分析软件行灰度扫描分析。以目的蛋白与 β -actin的蛋白产物条带灰度值之比作为其蛋白水平的相对量。扫描图像分析仪计算蛋白条带的表达。

1.6 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Dunnett *t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rTMS对MCAO模型小鼠神经功能恢复的影响

与Sham组比较, MCAO组神经功能缺损评分显著升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与MCAO组比较, rTMS组神经功能缺损评分显著降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 但仍高于Sham组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

组别	例数	神经功能缺损评分/分
Sham组	10	0.5 \pm 0.53
MCAO组	10	2.8 \pm 0.63 ^a
rTMS组	10	2.1 \pm 0.32 ^{ab}
<i>F</i> 值		53.61
<i>P</i> 值		<0.001

注:a为与Sham组比较, $P<0.05$; b为与MCAO组比较, $P<0.05$ 。

2.2 rTMS对各组MCAO模型小鼠脑梗死面积的影响

与Sham组比较, MCAO组小鼠缺血后脑片TTC染色明显出现皮质和海马大面积缺血, 经rTMS治疗后, 上述缺血面积明显减少。见图1。

2.3 rTMS对各组MCAO模型小鼠皮质DJ-1空间表达的影响

DJ-1蛋白阳性染色呈棕色、棕黄色或棕褐色, 定位于细胞核或者细胞质。如图2所示, rTMS组脑组织细胞中DJ-1表达量明显多于MCAO组和Sham组。

2.4 rTMS对各组MCAO模型小鼠皮质DJ-1表达水平的影响

与Sham组比较, MCAO组中DJ-1蛋白水平增高, 差异有统计学意义($P<0.05$); rTMS治疗后, DJ-1蛋白表达水平增高, 且高于Sham组($P<0.01$)和MCAO组($P<0.05$)。见图3、表2。

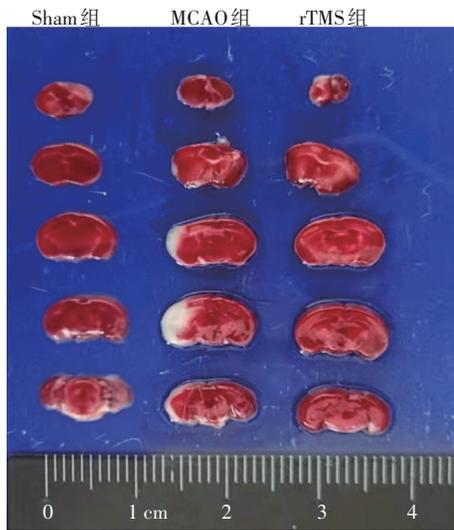
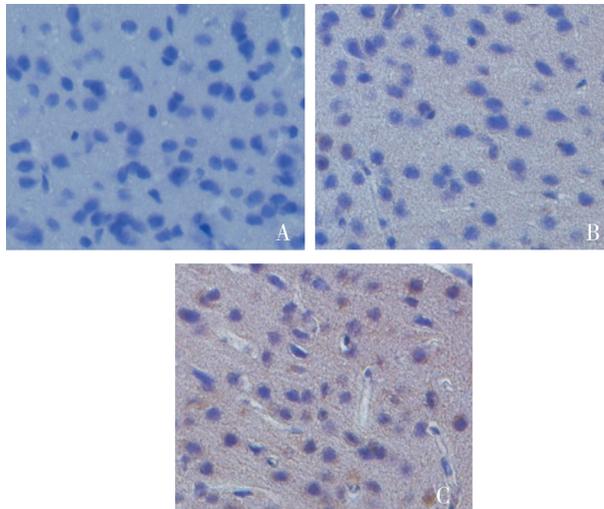


图1 3组小鼠缺血后脑片TTC染色结果



A:Sham组; B:MCAO组; C:rTMS组。

图2 3组小鼠大脑皮质细胞DJ-1免疫组织化学图像(×400)

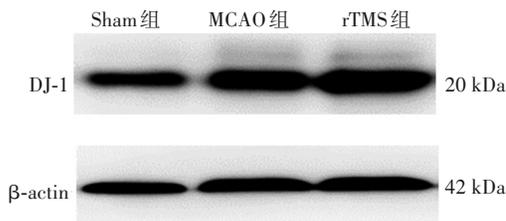


图3 3组小鼠DJ-1蛋白及β-actin的Western blotting蛋白表达

表2 3组小鼠DJ-1表达水平的比较 (x̄±s)

组别	例数	DJ-1
Sham组	6	1.15±0.06
MCAO组	6	1.35±0.08 ^a
rTMS组	6	1.54±0.08 ^{ab}
F值		42.46
P值		<0.001

注:a为与Sham组比较,P<0.01;b为与MCAO组比较,P<0.05。

3 讨论

rTMS是经颅磁刺激技术中的一种刺激模式,即通过重复磁刺激颅脑达到预期效果的治疗方式,这种治疗方法没有创伤、没有疼痛,且操作简便。磁场中的磁信号可以透过颅骨,且能做到信号不衰减,进而准确刺激局部大脑神经,同时改变神经细胞的膜电位,影响颅脑物质代谢和神经电生理活动。目前临床上应用rTMS作为辅助治疗手段,并通过调节刺激频率、刺激时间、间隔时间、治疗时间以达到不同的治疗效果。rTMS对于神经系统疾病,尤其是脑卒中及抑郁等疾病的治疗效果是有目共睹的。Cheng等^[8]的研究证明,经颅磁刺激对抑郁症状有显著的改善作用,并认为rTMS可能通过跨越靶向药物的阈值,以便达到足够高的缓解率,可作为抑郁患者的一线治疗手段。有研究表明,rTMS能够调节多种神经递质和连接系统,如对γ-氨基丁酸、谷氨酸和大脑活动的调节会因rTMS的干预而得到改善^[9]。与以往文献相似,本研究在对大脑缺血敏感的C57BL/6J小鼠MCAO模型中发现,小鼠出现了位于皮质以及海马的梗死灶,并发生了各种神经功能障碍;同时,由于机体的自我保护机制使得DJ-1表达增加,发挥了抗氧化应激,抑制细胞凋亡,缩小梗死灶面积的作用;更重要的是,在经过rTMS治疗后,小鼠脑内DJ-1表达增加,且神经功能障碍减轻,梗死灶面积减小,提示IBD后,采用rTMS治疗可能通过上调DJ-1蛋白,减轻脑组织缺血,改善IBD预后。

IBD致伤、致残率及致死率均居全身各部位损伤之首,而IBD因其特殊的发病因素使其具有治疗难度大、预后差的特点。脑缺血引发的复杂神经毒性级联反应的关键事件,包括能量储存和膜去极化的耗竭、谷氨酸兴奋毒性、细胞内钙水平的增加、氧自由基的产生、分解代谢酶系统的刺激(磷脂酶、蛋白酶和核酸内切酶)、凋亡途径的激活、炎症的诱导等^[10]。当前中枢神经系统缺血性损伤主要治疗方式有:①加速损伤部位的神经细胞再生,使用神经生长因子,或者是使用能使神经生长抑制剂失去作用的因子;②促进轴突的再生,通过使用含有生长因子的桥架来修复神经系统的损伤部位;③修复受损的髓鞘,恢复神经冲动的传导;④增强中枢神经系统的可塑性^[11]。目前临床上缺血性脑损伤的治疗方式主要为康复理疗和药物治疗,但是疗效大都不尽如人意,而本研究结果可为IBD的治疗和改善预后提供了新的方向。

DJ-1是由基因PARK7编码,DJ-1的功能缺失或突变与早发家族性帕金森病息息相关^[12]。有研究表明,DJ-1可以直接与Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶β相互作用,并改变cAMP反应元件结合蛋白1活性,从而调节酪氨酸羟化酶的表达^[13]。在正常情况下,DJ-1位于细胞质和细胞膜之间,在线粒体和细胞核中较少出现;在氧化应激的情况下,DJ-1表达水平增加,并在3h内转位至线粒体,

12 h后转至细胞核^[14]。这证明DJ-1不只与帕金森病的发生和发展有关,与缺血性脑损伤也有潜在的关系。在MCAO大鼠模型中,缺血灶周围细胞内聚集了大量DJ-1,其清除了自由基,并减少了细胞损伤,显著缩小了梗死灶面积^[15-16]。在本研究中,MCAO组小鼠免疫组化结果显示,DJ-1表达增加,并发挥作用。在经过rTMS治疗后,DJ-1的表达量显著增加,TTC染色结果显示梗死灶面积显著减小,相应的行为学结果也显示IBD预后良好。

国内外目前关于rTMS治疗缺血性脑损伤的研究逐渐增加,也逐渐深入,并取得了显著的进展。但目前rTMS治疗时刺激参数(频率、部位、强度以及持续时间等)没有统一的标准,可能容易导致治疗误差^[17],而且rTMS对IBD后神经细胞,甚至神经元细胞死亡的影响以及临床应用安全性等方面仍需要持续深入探索^[18]。

参 考 文 献

- [1] van DER MERWE C, JALALI SEFID DASHTI Z, CHRISTOFFELS A, et al. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease - causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1[J]. *Eur J Neurosci*, 2015, 41(9): 1113-1125.
- [2] KLOMJA I W, KATZ R, LACKMY-VALLÉE A. Basic principles of transcranial magnetic stimulation (TMS) and repetitive TMS (rTMS)[J]. *Ann Phys Rehabil Med*, 2015, 58(4): 208-213.
- [3] 赵德泉,郭永坤,王新军,等. 重复经颅磁刺激对慢性意识障碍患者的促醒治疗研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2022, 49(2): 54-60.
- [4] 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.
- [5] GAO TH, HU YQ, ZHUANG J, et al. Repetitive transcranial magnetic stimulation of the brain region activated by motor imagery involving a paretic wrist and hand for upper-extremity motor improvement in severe stroke: a preliminary study[J]. *Brain Sci*, 2022, 13(1): 69.
- [6] CAMACHO - CONDE JA, DEL ROSARIO GONZALEZ - BERMUDEZ M, CARRETERO - REY M, et al. Therapeutic potential of brain stimulation techniques in the treatment of mental, psychiatric, and cognitive disorders[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023, 29(1): 8-23.
- [7] 蒋琦姝,李玮,秦灵芝,等. 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[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2022, 44(7): 577-582.
- [8] CHENG CM, LI CT, JENG JS, et al. Antidepressant effects of prolonged intermittent theta - burst stimulation monotherapy at the bilateral dorsomedial prefrontal cortex for medication and standard transcranial magnetic stimulation - resistant major depression: a three arm, randomized, double blind, sham - controlled pilot study[J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2022;1-10. DOI: 10.1007/s00406-022-01523-4.
- [9] ACEVES-SERRANO L, NEVA JL, DOUDET DJ. Insight into the effects of clinical repetitive transcranial magnetic stimulation on the brain from positron emission tomography and magnetic resonance imaging studies: a narrative review[J]. *Front Neurosci*, 2022, 16: 787403.
- [10] HAN B, JIANG W, CUI P, et al. Microglial PGC-1 α protects against ischemic brain injury by suppressing neuroinflammation [J]. *Genome Med*, 2021, 13(1): 47.
- [11] SCHWAB ME. Repairing the injured spinal cord[J]. *Science*, 2002, 295(5557): 1029-1031.
- [12] JIA YQ, KIM RQ, KOUIJ R, et al. Chemical toolkit for PARK7: potent, selective, and high-throughput[J]. *J Med Chem*, 2022, 65 (19): 13288-13304.
- [13] XU XY, WANG R, HAO ZB, et al. DJ - 1 regulates tyrosine hydroxylase expression through CaMKK β /CaMKIV/CREB1 pathway in vitro and in vivo[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 869-879.
- [14] JUNN E, JANG WH, ZHAO X, et al. Mitochondrial localization of DJ - 1 leads to enhanced neuroprotection[J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(1): 123-129.
- [15] YANAGIDA T, TSUSHIMA J, KITAMURA Y, et al. Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2009, 2(1): 36-42.
- [16] PARRADO-FERNÁNDEZ C, SCHNEIDER B, ANKARCORONA M, et al. Reduction of PINK1 or DJ - 1 impair mitochondrial motility in neurites and alter ER-mitochondria contacts[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(11): 5439-5449.
- [17] 李二凤,王雅敏,刘凤荣,等. 重复经颅磁刺激治疗帕金森病2年随访[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2020, 47(3): 295-299.
- [18] D'AGATI D, BLOCH Y, LEVKOVITZ Y, et al. rTMS for adolescents: Safety and efficacy considerations[J]. *Psychiatry Res*, 2010, 177(3): 280-285.

责任编辑:龚学民