

· 基础研究 ·

共培养条件下电磁场干预对大鼠成骨细胞及骨髓间充质干细胞成骨分化的影响

虞冀哲 杨勇 刘朝旭 宋明宇 刘阳 吴华

【摘要】目的 观察共培养条件下电磁场干预对大鼠成骨细胞及骨髓间充质干细胞 (MSCs) 成骨定向分化的影响,并探讨电磁场促进成骨分化的相关机制。**方法** 体外分离培养 SD 大鼠 BMSCs 及成骨细胞,将第三代成骨细胞与 BMSCs 通过 transwell 培养小室建立共培养系统。采用随机数字表法将共培养细胞分为共培养组及共培养暴磁组,另随机选择单细胞培养的 BMSCs 及成骨细胞纳入单细胞培养组。共培养暴磁组细胞每日给予电磁场刺激 4 h。于实验进行 14 d 后随机提取各组细胞总 RNA,采用荧光定量 PCR 技术检测各组细胞 Runx2、Sp7、碱性磷酸酶、I 型胶原、骨形态形成蛋白-2 及骨钙素基因表达情况,并选用茜素红染色法检测各组细胞矿化钙结节形成情况。**结果** 单细胞培养模式下 BMSCs 及成骨细胞其各项成骨相关基因表达水平均较低,而共培养模式下 BMSCs 及成骨细胞其各项成骨相关基因表达均呈现不同程度增强,并且以共培养暴磁组成骨细胞上述指标增强幅度较显著。通过茜素红染色发现,与单纯共培养组比较,共培养暴磁组细胞矿化钙结节数量明显增多。**结论** 低频电磁场干预可显著促进共培养条件下 BMSCs 及成骨细胞成骨定向分化,其可能机制为电磁场刺激能促进骨形态形成蛋白-2 表达,使其通过自分泌或旁分泌方式介导细胞间信号转导,从而诱导 BMSCs 向成骨细胞分化及成骨细胞进一步成熟分化。

【关键词】 电磁场; 成骨细胞; 骨髓间充质干细胞; 共培养

The effects of electromagnetic fields on osteogenesis during co-culture of bone marrow mesenchymal stem cells with osteoblasts YU Ji-zhe, YANG Yong, LIU Zhao-xu, SONG Ming-yu, LIU Yang, WU Hua. Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding author: WU Hua, Email: wuhua360@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the effects of electromagnetic fields (EMFs) on osteogenesis during co-culture of bone mesenchymal stem cells (BMSCs) with osteoblasts in rats. **Methods** BMSCs and osteoblasts were isolated from Sprague-Dawley rats and cultured. Sub-cultured osteoblasts and BMSCs were seeded in transwell cell-culture-chamber polyester inserts to establish the co-culture system. The co-cultures were then randomly divided into a normal co-culture group and a group exposed to an EMF. Single-cultured BMSCs and osteoblasts were set as a single culture group. The EMF group was exposed to an EMF for 4 hours per day. On the 14th day, cell culture plates or inserts were randomly selected for total RNA extraction and measurement of the mRNA expression levels of Runt-related transcription factor 2, transcription factor 7, alkaline phosphatase, collagen type I, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and bone gamma-carboxyglutamate protein (Osteocalcin gene, OC gene) using real-time PCR assays. Cell culture dishes or inserts were also randomly chosen for Alizarin red staining to detect mineralized nodules. **Results** The level of osteogenic gene expression in single-cultured BMSCs and osteoblasts was low, while it was much higher in the co-culture group. The level of gene expression in the EMF-exposed and co-cultured group was even higher. Alizarin red staining also showed that calcium mineralized modules had increased in the stimulated, co-cultured system compared with the unstimulated, co-cultured cells. **Conclusion** EMF exposure can promote osteogenic differentiation of BMSCs and osteoblasts when they are co-cultured. BMP2-mediated cellular interaction might play an important role in osteogenic differentiation induced by EMF exposure.

【Key words】 Electromagnetic fields; Osteoblasts; Bone marrow; Mesenchymal stem cells; Co-culturing

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.04.003

基金项目:国家自然科学基金面上项目(51077065)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科

通信作者:吴华,Email: wuhua360@yahoo.com.cn

自从 20 世纪 70 年代 Bassett 等^[1]首次将电磁场 (electromagnetic fields, EMF) 用于治疗骨不连并取得良好效果后,国内、外许多学者均开始研究电磁场促进骨折愈合的作用机制。如有研究发现,电磁场干预可促进体外成骨细胞增殖及细胞外基质形成^[2-4],诱导软骨内成骨^[5],加速骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 增殖及成骨分化^[6];但关于电磁场加速骨折愈合及促进细胞增殖、成骨分化的具体机制和作用方式仍未明确。目前大多数关于电磁场促进骨折愈合的研究都是在体外单细胞培养体系基础上进行的,鲜见基于机体多细胞微环境的相关电磁场报道。由于细胞间相互作用广泛存在,且细胞间信号转导机制错综复杂,为了能更好地研究低频电磁场生物学效应,本研究将大鼠成骨细胞与 BMSCs 进行共培养并给予低频电磁场刺激,观察细胞增殖及定向成骨分化情况,并从基因水平检测成骨相关指标表达,同时结合组织化学染色法观察细胞矿化结节生成情况,从而探讨电磁场促进成骨分化的可能机制。现报道如下。

材料与方法

一、主要实验试剂与仪器

主要实验试剂包括胎牛血清 (美国 Gibco 公司)、DMEM/F12 培养基 (美国 Hyclone 公司)、胰蛋白酶、I 型胶原酶 (美国 Sigma 公司)、青链霉素混合液 (美国 Solarbio 公司)、Trizol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)、逆转录试剂盒 (日本 Toyobo 公司)、SYBgreen 荧光定量试剂盒 (日本 Toyobo 公司)、茜素红 (北京华迈生物技术有限责任公司) 等。主要实验仪器包括 Bio-rad IQ5 型 PCR 仪 (美国 Bio Rad 公司)、HF240 型细胞培养箱、TE2000-S 型倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司) 及 Neofuge 15R 型高速离心机等。

二、实验动物

共选取 6 只 4 周龄雄性清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠及 24 只新生 24 h 清洁级 SD 大鼠,均由华中科技大学同济医学院附属同济医院动物中心提供。

三、细胞分离及培养

1. BMSCs 分离及体外培养:将 4 周龄 SD 大鼠颈椎脱臼处死后,经 75% 酒精浸泡 15 min,于超净工作台中分离大鼠双侧股骨及胫骨,去除肌肉筋膜等软组织后剪破干骺端。用 DMEM/F12 培养基冲洗骨髓腔,将所得细胞悬液用移液器吹打均匀,制成单细胞悬液后以 1500 r/min 的速度离心 5 min,弃上清。加入适量含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基后再次混匀,将细胞悬液以 10^6 个/ml 密度接种到细胞培养瓶中,置于 37 °C 饱和湿度恒温培养箱中。于 48 h 后首次更换

培养基,以后每隔 3 d 换液 1 次。待细胞长满瓶底 80% 后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,按 1:2 比例接种至培养瓶中。于倒置显微镜下观察细胞生长情况,取第 3 代细胞用于实验。

2. 成骨细胞分离及体外培养:取新生 24 h SD 大鼠 8 只,经颈椎脱臼处死后,采用 75% 酒精浸泡 15 min。用眼科剪去除头皮,取出头盖骨,放入盛有磷酸盐缓冲液的培养皿中。剔除附着的结缔组织及骨膜,经磷酸盐缓冲液冲洗 3 次后将颅盖骨剪碎成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的骨片。将碎骨片用 5 ml 0.25% 胰蛋白酶在 37 °C 条件下消化 20 min。去除消化液后用 0.1% II 型胶原酶 37 °C 恒温消化 4 h,收集上清液,以 1500 r/min 离心 10 min,弃上清;所得白色沉淀物即为成骨细胞,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基并轻轻吹打成单细胞悬液,以 10^6 个/ml 的密度接种于培养瓶中,置于 37 °C 恒温饱和湿度培养箱内培养。每隔 3 d 换液 1 次,待细胞长满瓶底 80% 后消化传代,取第 3 代细胞用于共培养体系。

四、共培养体系的建立及暴磁干预

共培养体系采用含有微孔 (直径 0.4 μm) 的 Transwell 细胞培养小室 (美国 Costar 公司),该培养室可防止细胞通过,但培养基可自由渗入。首先在六孔板中以 1×10^6 个/ml 的密度接种 SD 大鼠 BMSCs,在另外的六孔板中置入 Transwell 细胞培养小室,同样以 1×10^6 个/ml 的密度在 Transwell 小室中接种 SD 大鼠成骨细胞。待细胞均长满瓶底 80% 以上时,将含有大鼠成骨细胞的 Transwell 培养小室置入已接种大鼠 BMSCs 的六孔板中,建立共培养体系 (图 1)。成骨细胞作为上层细胞, BMSCs 作为下层细胞,这两种细胞均使用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基。采用随机数字表法将共培养细胞分为共培养组及共培养暴磁组,共培养暴磁组细胞每天给予 50 Hz, 1 mT 正弦波电磁场刺激 4 h,所用电磁场发生装置由海军工程大学研制。另外本研究将未建立共培养体系的大鼠成骨细胞及 BMSCs 纳入单细胞培养组,单细胞培养组及共培养组细胞在实验期间均不给予电磁场干预。

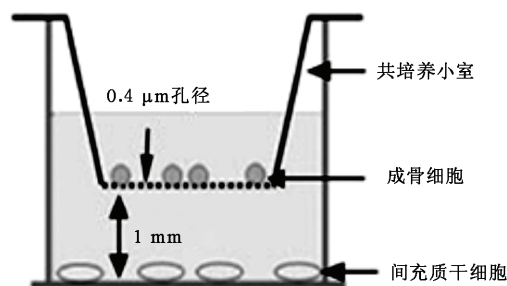


图 1 共培养体系示意图

五、成骨相关基因检测

于实验进行 2 周后,采用荧光定量 PCR 技术检测各组细胞成骨相关基因表达情况,具体检测步骤如下:随机选取单细胞培养组、共培养组及共培养暴磁组成骨细胞及 BMSCs,提取细胞总 RNA 后使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。SD 大鼠成骨相关基因引物由美国 Invitrogen 公司合成,具体引物序列如下:① β -actin, 上游序列 5'-CGTTGACATCCGTAAAGACCTC-3', 下游序列 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3'; ② Runx2, 上游序列 5'-CTACTCTGCCGAGCTACGAAAT-3', 下游序列 5'-TCTGTCTGTGCCTTCTTGGTTC-3'; ③ Sp7, 上游序列 5'-CTGGGAAAAGGAGGCACAAAG-3', 下游序列 5'-GGGTGGGTAGTCATTGGCATAG-3'; ④ 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP), 上游序列 5'-CCTGGACCTCATCAGCATTT-3', 下游序列 5'-AGGGAAGGGTCAGTCAGGTT-3'; ⑤ 骨形态发生蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP2), 上游序列 5'-AACGAGAAAAGCGTCAAGCC-3', 下游序列 5'-CCAGTCATTCCACCCCACA-3'; ⑥ I 型胶原 (collagen type I, Col1 α 2), 上游序列 5'-TTCCCGGTGAATTCCGTCTC-3', 下游序列 5'-ACCTCGGATTCCAATAGGACCAG-3'; ⑦ 骨钙素 [bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein, Bglap], 上游序列 5'-ACCTCGGATTCCAATAGGACCAG-3', 下游序列 5'-GAAGCCAATGTGGTCCGC-3'。荧光定量 PCR 反应程序如下:95 ℃ 预变性 1 min, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火延伸 30 s, 共进行 40 个扩增循环,最后检测各项指标 CT 值,目标基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。

六、矿化结节染色

于实验进行 2 周后随机选取单细胞培养组、共培养组、共培养暴磁组大鼠成骨细胞及 BMSCs 进行茜素红染色。使用磷酸盐缓冲液洗涤细胞 2 次后,经 95% 乙醇固定 10 min,再用去离子水冲洗 3 次;加入 0.1% 茜素红-Tris-HCl (pH 8.3) 在 37 ℃ 环境下孵育 30 min,蒸馏水冲洗,晾干后置于光学显微镜 ($\times 100$ 倍) 下观察,可见沉积钙盐呈红色。随机选取 10 个视野照相,采用 Image Pro Plus 6.0 版专业图像分析软件对图像进行分析。

七、统计学分析

本研究所得计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,选用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据分析,各组间数据比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组细胞形态学观察

体外培养期间可见大鼠 BMSCs 及成骨细胞均贴壁生长,细胞形态呈梭形或三角形,细胞增殖后呈鱼群样或漩涡样生长,其中以成骨细胞的增殖速度相对较快,如均以 1×10^5 个/ml 的密度接种,成骨细胞需 7 ~ 9 d 即长满瓶底,而 BMSCs 则需要 10 ~ 12 d 才能长满瓶底,具体情况见图 2。

二、各组细胞矿化结节染色结果比较

SD 大鼠 BMSCs 在单细胞培养模式下无明显钙结节形成,而共培养体系中 BMSCs 其细胞外基质钙化结节生成增多,如在共培养基础上给予电磁场刺激,可进一步促进 BMSCs 成骨分化及细胞外矿化结节形成。

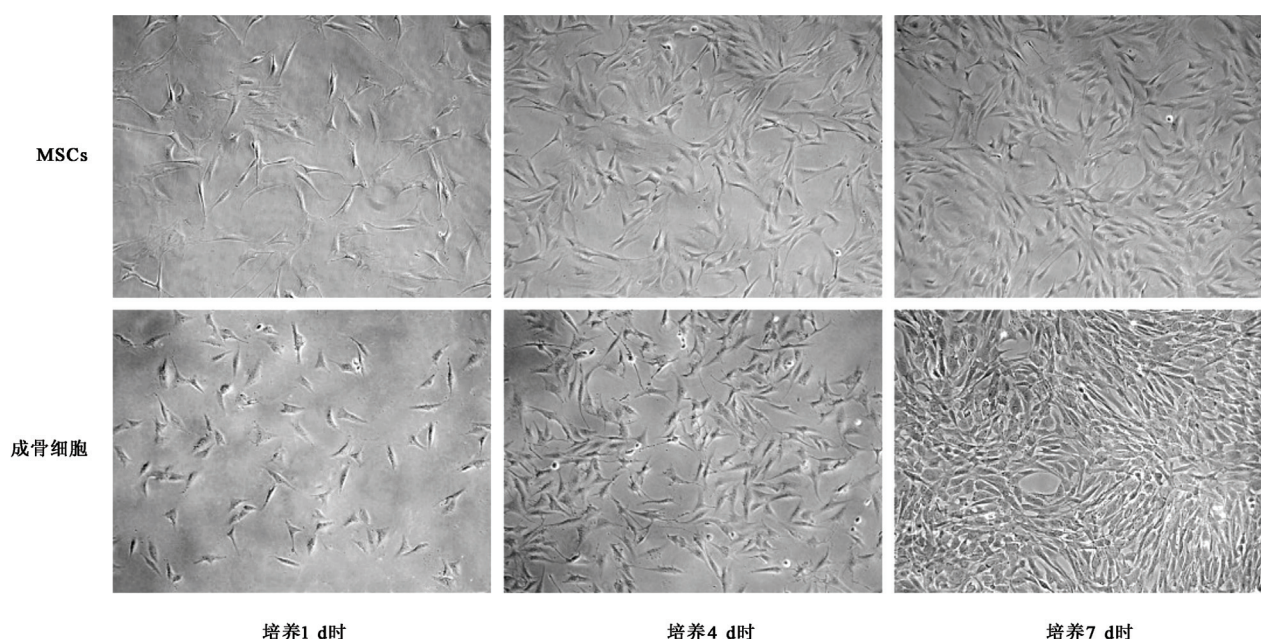


图 2 单细胞培养模式下大鼠 BMSCs 及成骨细胞生长情况比较 (倒置相差显微镜, $\times 100$)

与单细胞培养组成骨细胞比较,共培养体系中成骨细胞其细胞外基质矿化结节生成明显增多,并且以共培养暴磁组细胞矿化钙结节数量尤为显著,与单纯共培养组间差异非常显著。上述结果提示共培养模式及电磁场干预均可促进大鼠 BMSCs 及成骨细胞外基质分泌、成熟,加速矿化结节形成。具体情况见图 3、图 4。

三、电磁场对 BMSCs 及成骨细胞成骨相关基因表达的影响

各组细胞成骨相关基因表达结果详见图 5,单细胞培养组大鼠 BMSCs 及成骨细胞 Runx2、Sp7、ALP、Col1 α 2、Bglap 基因表达水平均相对较低,而共培养组

大鼠 BMSCs 及成骨细胞上述各成骨基因表达量均呈现不同程度上升,并且共培养暴磁组成骨细胞上述成骨基因表达水平较共培养组进一步升高。通过对共培养组及共培养暴磁组 BMSCs 成骨相关基因表达结果进行比较,发现早期成骨基因 Runx2 及 Sp7 表达组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),但其他成骨相关基因(如 ALP、BMP2 及 Col1 α 2)均以共培养暴磁组的表达水平相对较高,与单纯共培养组间差异均具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。另外值得注意的是,与单细胞培养组比较,共培养组 BMSCs 其 BMP2 表达并无明显增强,但经暴磁处理后 BMP2 表达水平显著上调。

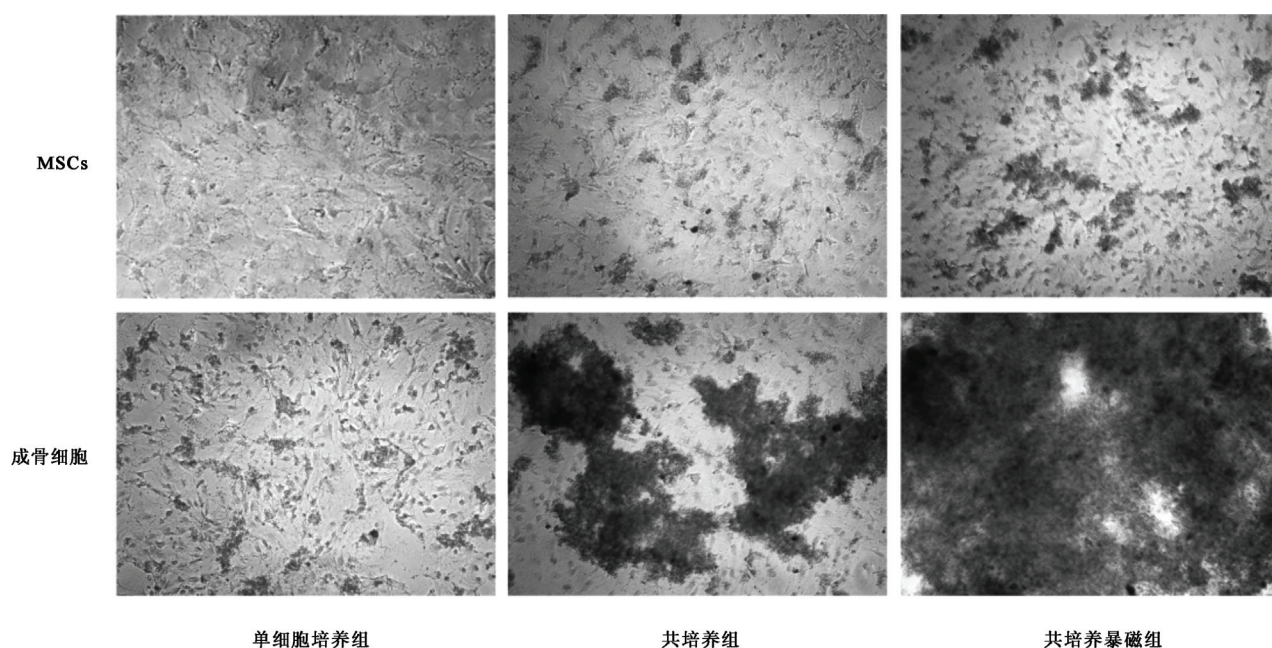
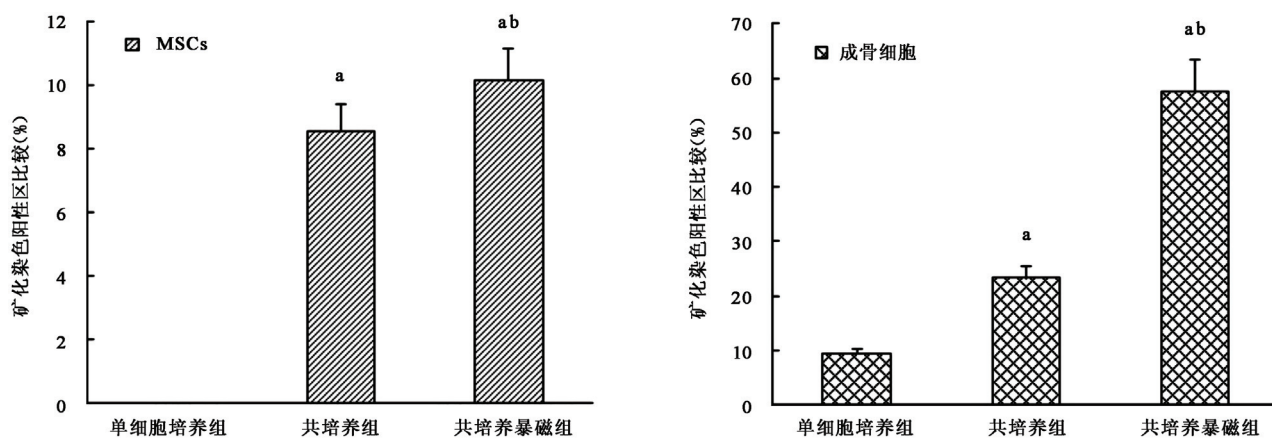
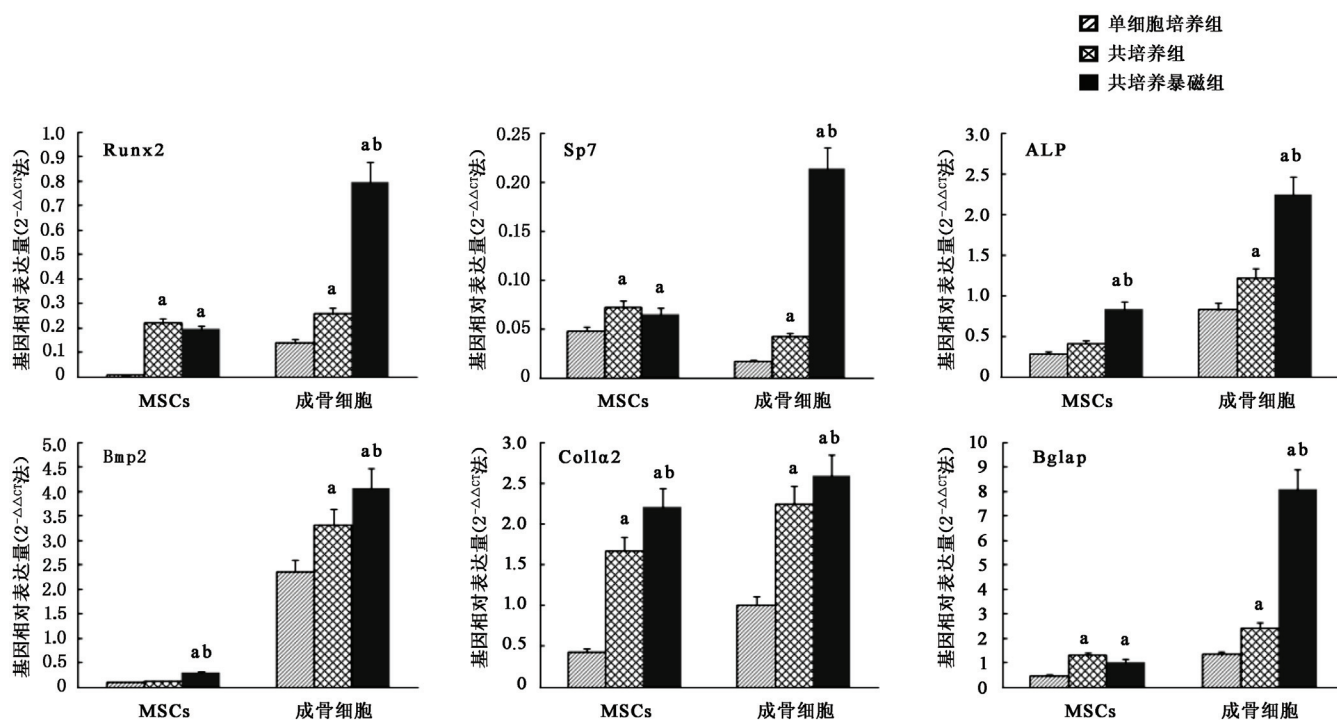


图 3 各组细胞外基质矿化结节形成情况比较(茜素红染色, $\times 100$)



注:与单细胞培养组比较,^a $P < 0.05$;与共培养组比较,^b $P < 0.05$

图 4 各组细胞茜素红-矿化结节染色定量分析



注:与单细胞培养组比较,^a $P < 0.05$;与单纯共培养组比较,^b $P < 0.05$

图5 各组成骨细胞及 BMSCs 成骨相关基因表达情况比较

讨 论

骨生长因子在骨组织形成过程中具有重要作用,可通过细胞间、细胞与外基质间传递信息,参与骨形成调节过程^[7-8]。近年来相关研究表明,电磁场作为一种物理干预因子,能从多方面调控细胞活动,包括加速成骨细胞及 BMSCs 增殖与分化,促进成骨细胞外基质合成、成熟与钙化等^[9-11]。关于电磁场的促成骨效应是否通过细胞间信号转导来实现,目前仍未明确。为此本研究通过建立共培养体系模拟体内微环境,将 SD 大鼠成骨细胞与 BMSCs 进行共培养并给予低频电磁场干预,观察低频电磁场刺激对其成骨相关生长因子表达的影响,从而探讨电磁场是否通过影响成骨生长因子合成来发挥其生物学效应。

Runx2 与 Sp7 是两个重要的转录因子,Runx2 因能激活及启动 BMSCs 向成骨细胞系分化并调控成骨细胞成熟,被认为是骨形成过程中的关键因子^[12];而 Sp7 主要在成骨细胞分化下游环节中发挥效应,对成骨细胞生成具有调控作用^[13]。Duxy 等^[14]研究发现,Runx2 基因与成骨细胞特异性顺式作用元件结合后能激活 Collα2、Bglap 等基因的转录及表达。I 型胶原是 Collα2 基因所编码的蛋白,是成骨细胞外基质的主要有机成份,它可刺激 BMSCs 向成骨细胞方向分化,并通过增强蛋白激酶 C 活性促进成骨细胞表达 ALP 及 Bglap^[15]。ALP 是成骨细胞的功能性酶,而 Bglap 基因

所编码的骨钙素是一种维生素 K 依赖性 Ca^{2+} 结合蛋白,可维持骨的正常矿化速率^[16]。BMP2 属于转化生长因子 β 超家族成员,它可通过自分泌和旁分泌方式发挥作用,在体内可诱导骨、软骨及骨相关结缔组织形成。目前有研究已证实 BMP2 可通过激活 Smads 信号通路增强 Runx2 表达,从而促进骨形成及诱导成骨细胞分化^[17-19]。Schwartz 等^[20-21]研究表明电磁场干预可促进 BMSCs 及成骨细胞 BMP2 依赖性成骨相关基因表达增强,而这些基因包括 Runx2、Sp7、ALP、Collα2 及 Bglap 等,提示电磁场干预能通过增强 BMP2 表达对成骨细胞分化发挥影响作用。

本研究结果显示共培养暴磁组细胞外基质中矿化结节数量较其它组细胞明显增多,表明在共培养条件下电磁场刺激可促进 BMSCs 成骨分化及加速成骨细胞成熟。通过对比分析共培养组及共培养暴磁组成骨相关基因表达水平,发现电磁场干预能明显促进 BMSCs 及成骨细胞 BMP2 表达,同时还能增强 BMP2 依赖性成骨相关基因表达;提示在共培养模式下给予电磁场刺激,可显著促进成骨细胞及 BMSCs 成骨定向分化,其可能机制为在共培养模式下电磁场干预能影响 BMP2 合成,通过细胞间信号转导促使 BMSCs 向成骨细胞分化及成骨细胞进一步分化成熟。

参 考 文 献

- [1] Bassett CA, Pilla AA, Pawluk RJ. A non-operative salvage of surgical-

- ly-resistant pseudarthroses and non-unions by pulsing electromagnetic fields. A preliminary report. Clin Orthop Relat Res, 1977, 124: 128-143.
- [2] Tsai MT, Chang WH, Chang K, et al. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. Bioelectromagnetics, 2007, 28: 519-528.
- [3] Zhang X, Zhang J, Qu X, et al. Effects of different extremely low-frequency electromagnetic fields on osteoblasts. Electromagn Biol Med, 2007, 26: 167-177.
- [4] Fassina L, Visai L, Benazzo F, et al. Effects of electromagnetic stimulation on calcified matrix production by SAOS-2 cells over a polyurethane porous scaffold. Tissue Eng, 2006, 12: 1985-1999.
- [5] Ciombor DM, Lester G. Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins. J Orthop Res, 2002, 20: 40-50.
- [6] Yang Y, Tao C, Zhao D, et al. EMF acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. Bioelectromagnetics, 2010, 31: 277-285.
- [7] Elima K. Osteoinductive proteins. Ann Med, 1993, 25: 395-402.
- [8] Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. Clin Orthop Relat R, 1991, 263: 30-48.
- [9] Chang WH, Chen LT, Sun JS, et al. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. Bioelectromagnetics, 2004, 25: 457-465.
- [10] Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. J Orthop Res, 2000, 18: 637-646.
- [11] Cifra M, Fields JZ, Farhadi A. Electromagnetic cellular interactions. Prog Biophys Mol Biol, 2011, 105: 223-246.
- [12] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, 2007, 89: 747-754.
- [13] Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, et al. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. J Biol Chem, 2008, 283: 29119-29125.
- [14] Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science, 2000, 289: 1501-1504.
- [15] Green J, Schotland S, Stauber DJ, et al. Cell-matrix interaction in bone: type I collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells. Am J Physiol, 1995, 268: 1090-1103.
- [16] Hauschka PV. Osteocalcin: the vitamin K dependent- Ca^{2+} -protein of bone matrix. Haemostasis, 1986, 16: 258-272.
- [17] Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, et al. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. Periodontol, 2000, 2006, 41: 48-72.
- [18] 郁卫东, 秦书俭. 骨形态发生蛋白-2 在骨形成过程中的作用机制. 中国临床解剖学杂志, 2000, 18: 82-83.
- [19] Yang S, Wei D, Wang D, et al. In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. J Bone Miner Res, 2003, 18: 705-715.
- [20] Schwartz Z, Simon BJ, Duran MA, et al. Pulsed electromagnetic fields enhance BMP-2 dependent osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Orthop Res, 2008, 26: 1250-1255.
- [21] Selvamurugan N, Kwok S, Vasilov A, et al. Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression. J Orthop Res, 2007, 25: 1213-1220.

(修回日期: 2013-01-16)

(本文编辑: 易浩)

· 外刊摘英 ·

Hippotherapy for strength and balance in the elderly

BACKGROUND AND PURPOSE: Previous studies have demonstrated a correlation between strength and functional abilities among the elderly. One exercise therapy, hippotherapy, has shown beneficial results in patients with neurologic conditions, including multiple sclerosis. This study assessed the effects of hippotherapy on functional ability, muscle strength and balance among elderly individuals. **METHODS:** Twenty-eight healthy individuals, ages 60 to 84 years, were randomized to one of two groups. The treatment group received 30 minute sessions of hippotherapy twice weekly for eight weeks. The control group was instructed to continue their current daily activities without beginning any new strength or balance training. At baseline and at two days following the completion of the program, all subjects were tested for balance, lower extremity strength and functional abilities using the Berg Balance Scale (BBS), the 30-Second Chair Stand Test (30CST) and the Timed Get up and Go Test (TUG). **RESULTS:** Compared with controls, the hippotherapy group demonstrated significant improvement on the BBS ($P=0.003$) and the 30CST ($P=0.032$). No significant differences were seen between the groups on the TUG. **CONCLUSION:** This small study of elderly individuals found that hippotherapy may have a positive effect on balance and lower extremity strength in healthy, elderly individuals.

【摘自: de Araújo TB, de Oliveira RJ, Martins WR, et al. Effects of hippotherapy on mobility, strength and balance in elderly. Arch Gerontol Geriatr, 2013, 56: 478-481.】