

·基础研究·

低频电磁场在移植骨髓源神经祖细胞修复脑损伤大鼠中的作用研究*

李伟坤¹ 洪海珊¹ 白文芳^{2,3}

摘要

目的:通过分析 50Hz 电磁场干预骨髓源神经祖细胞移植修复大鼠脑损伤后的脑组织病理,免疫荧光染色,行为学情况,探讨 50Hz 电磁场在骨髓源神经祖细胞移植修复大鼠脑损伤中的作用。

方法:应用自由落体法建立大鼠脑损伤模型,实验随机分为空白对照组、磁场组、细胞组和磁场+细胞组。移植细胞选用的是骨髓源神经祖细胞,采用贴壁法培养骨髓间充质干细胞 P2,经悬浮诱导获得。造模术后 7 天,将 Dil 标记的骨髓源神经祖细胞移植至大鼠脑损伤部位,磁场干预组置于频率 50Hz,强度 5 mT 正弦波电磁场中,60min/次,1 次/天,共 30 天,空白对照组和细胞组大鼠处于无磁场刺激的相同环境中。在移植术后第 1 天、3 天、7 天、30 天予 Wayne Clark、爬梯试验行为学评分并取脑组织标本,采用 HE 染色观察大鼠脑组织病理变化;免疫细胞荧光检测移植细胞的胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经元特异性微管蛋白(β -III tubulin)的表达情况。

结果:移植术后 30 天,磁场+细胞组的 Wayne Clark、爬梯试验评分显著高于其他组($P<0.01$);HE 染色观察:磁场+骨髓源神经祖细胞组与其他组相比较,大鼠脑损伤部位水肿程度减轻,囊性空洞面积更小,细胞存活数较多;磁场+骨髓源神经祖细胞组大鼠损伤病灶的细胞免疫细胞荧光检测胶质纤维酸性蛋白阳性表达更少,神经元特异性微管蛋白阳性表达明显高于其他组。

结论:50Hz 电磁场可促进骨髓源神经祖细胞移植修复脑损伤大鼠爬行功能恢复。

关键词 低频电磁场;骨髓源神经祖细胞;脑损伤;分化

中图分类号:R651,R49 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2020)-10-1166-06

A study on low frequency electromagnetic fields on bone marrow-derived neural progenitor cells transplantation repairing the rats with brain injured/LI Weikun, HONG Haishan, BAI Wenfang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(10): 1166—1171

Abstract

Objective: To analyze whether the alterations of brain tissue, immunofluorescence staining and behavioral score of rats with brain injured after the repairment of transplanting the bone marrow-derived neural progenitor cells (BM-NPCs) were related to the intervention of 50Hz electromagnetic fields. We therefore aimed to investigate the effects of 50Hz electromagnetic fields on enhancing the repairment of brain injured rats with transplantation of BM-NPCs.

Method: We established the model of brain trauma by the free-falling way. Rats were randomly divided into four groups: control group, BM-NPCs group, electromagnetic field group and electromagnetic field+BM-NPCs group. Each group was subdivided into 4 subgroups: 1-day, 3-day, 7-day and 30-day of transplantation according to the observation points. We selected the BM-NPCs as the progenitors of transplanted cells which were obtained by culturing bone mesenchymal stem cells with the fast adherence method and by inducing under the

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.10.003

*基金项目:国家自然科学基金项目(81871842);广东省科技计划项目(2016A020214014)

1 广州市增城区人民医院康复医学科,广州市,511300; 2 广东省人民医院康复医学科,广东省医学科学院,广东省老年医学研究所;

3 通讯作者

第一作者简介:李伟坤,男,住院医师;收稿日期:2019-07-02

suspension. BM-NPCs labeled with Dil were transplanted to the brain injury site of rats 7 days after the surgery. The electromagnetic field group was placed in a sine wave electromagnetic field 7 days after the surgery with the frequency of 50 Hz, the intensity of 5 mT for 60mins at a time per day, lasting for 30 days. Wayne Clark scale and the ladder rung walking test were performed to evaluate the behavior function and the pathology of brain tissues were observed using hematoxylin and eosin (HE) staining at each observation point. Furthermore, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Neuron-specific Class III Beta-tubulin (β -III tubulin) were detected using immune-fluorescence cytochemistry.

Result: After BM-NPCs transplantation for 30 days, the Wayne Clark scale and the ladder rung walking test of the electromagnetic field + BM-NPCs group were significantly higher than the other groups ($P < 0.01$). HE staining showed that compared with the other groups, the brain edema degree was alleviated, the cystic void area was smaller and the number of nerve cells was increased in the electromagnetic field + BM-NPCs group. Moreover, the decrease of GFAP expression was observed in the electromagnetic field + BM-NPCs group, but the level of β -III tubulin expression was increased.

Conclusion: 50Hz electromagnetic fields could ameliorate the creeping disfunction in the brain injured rats after transplanting with BM-NPCs, and its mechanism might involve the induction of BM-NPCs to differentiate into neurons and elevation the expression of β -III tubulin.

Author's address Department of Rehabilitation Medicine, Zengcheng District People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou, 511300

Key word low-frequency electromagnetic fields; bone marrow-derived neural progenitor cells; traumatic brain injured; differentiation

创伤性脑损伤是一种常见的高致残率、高致死率的外伤性疾病^[1],常引起严重的神经功能缺失症状。神经干细胞作为一种具有多向分化潜能的细胞,其修复受损神经的能力被广泛认可,大量的临床和基础实验证实神经干细胞移植修复可改善其受损的运动、感觉、认知功能,还可以抑制炎症病理过程,改善局部微环境起到修复脑神经,提高肢体功能的作用^[2-3]。目前认为神经干细胞移植修复脑损伤机制主要包括移植细胞替代受损神经细胞,重建突触连接和外源性神经干细胞分泌神经修复因子、抗炎因子、抗氧化因子,改善局部微环境,启动内源性修复机制^[4]。但由于脑损伤后常导致不同程度的继发性损伤,其致病机理十分复杂,不论内源性或移植的神经细胞在其脑损伤的局部环境中,都难以存活并有效分化为神经元。随着研究深入,更多证据表明脑损伤后慢性炎症反应是引起脑内神经元死亡,引起神经功能障碍的主要原因^[5]。前期的系列体外研究表明^[6-7]:50Hz电磁场有助于诱导部分成熟并具有功能的骨髓源神经元形成。但在动物体内,低频电磁场是否也起到促进骨髓源神经祖细胞定向分化作用并参与到大鼠脑损伤修复,其作用机制仍不明

确。因此,我们拟研究50Hz电磁场干预移植骨髓源神经祖细胞移植脑损伤大鼠,通过观察脑组织结构与病理和动物行为学情况,进一步探讨50Hz电磁场在骨髓源神经祖细胞移植修复脑损伤大鼠中的作用。

1 材料与方法

1.1 制作脑损伤模型

将SPF级SD大鼠经腹腔注射麻醉后俯卧位固定,常规备皮消毒,切开皮肤,分离头皮下软组织,充分显露颅骨,于矢状缝旁开2.5mm,冠状缝后1.5mm开一直径约4.5mm骨窗,避免破坏硬膜,使用直径为4.5mm,重30g撞击棒在高30cm处自由落体撞击硬膜(撞击部位参考实验大鼠的脑图谱^[8])。大鼠出现意识丧失、瞳孔变化、肢体抽动等功能障碍及醒后恢复反射^[9],Wayne Clark评分^[10]为18分以上可认为造模成功,造模后青霉素连用5天预防感染。

1.2 骨髓源神经祖细胞培养、标记和移植

采用贴壁法培养骨髓间充质干细胞,取P2代骨髓间充质干细胞,经悬浮诱导并获得骨髓源神经祖细胞,具体操作方法见已发表论文^[7]。加入10 μ l的Dil荧光液标记细胞,37 $^{\circ}$ C孵育30min,移植前磷酸

盐缓冲液漂洗2次并用无血清培养基重悬,制备成 $1 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞混悬。造模7天后,骨髓源神经祖细胞组和磁场+骨髓源神经祖细胞组大鼠用微量注射器移植标记的细胞于脑损伤区域中心,移植细胞数约 10^6 个。其他两组注射生理盐水做对比。

1.3 实验分组和磁场干预

实验用50Hz电磁场由暨南大学物理系研制^[7],实验随机分为对照组、磁场组、骨髓源神经祖细胞组和磁场+骨髓源神经祖细胞组,每组16只大鼠。磁场组和磁场+骨髓源神经祖细胞组大鼠置于频率50 Hz,强度5mT正弦波电磁场中,60min/次,1次/d,共30天,对照组和骨髓源神经祖细胞组处在无磁场干预的环境中。

1.4 行为学评估

移植术后第1、3、7、30天,进行实验动物的行为学评测。Wayne Clark评分:将各组大鼠置于在实验台平面,观察大鼠行为学表现评估神经功能障碍程度。参考爬梯试验^[8]评分标准:将各组大鼠置于一个不规则的梯子,造模前训练大鼠自发步行,从开始处沿水平梯子(每隔1cm设置一个横撑,梯子全长1m)到达终点,实验时随机放置横撑,使横撑间隔不等,以防动物学习,视频录像各组大鼠的肢体及爪子在爬梯上的表现,记录踏空并明显掉落的次数并分析。

1.5 实验取材

移植术后第1、3、7、30天取材。先用生理盐水冲灌,再予甲醛灌流固定。以脑损伤病灶为中心,在脑损伤病灶前后约2mm截取标本,加入OTC包埋行冰冻切片,制备厚度约4mm切片。

1.6 HE染色

取病理切片,室温吹干,苏木精染色10min,清水洗涤后1% HCL分化20s,返蓝1min,搽干后伊红染色60s,梯度酒精脱水,二甲苯5min,共2次,凉干后树脂封固,显微镜下观察大鼠脑组织病理变化。

1.7 免疫荧光染色

取病理切片,室温吹干,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗3次,每次5min;0.3% TritonX-100室温透化20min,PBS漂洗3次,每次5min;室温下山羊血清封闭20min;添加一抗(分别为兔抗鼠 β -III tubulin多克隆抗体(1:100)、兔抗鼠GFAP兔抗多克隆抗体(1:100)),4℃孵育过夜,PBS漂洗3次,每次5min;按比

例稀释FITC标记的羊抗兔IgG二抗,避光4℃孵育60min,磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;每张切片滴加100 μl DAPI核染液,室温避光孵育15min,PBS漂洗3次,每次5min,固定后显微镜下观察。

1.8 统计学分析

采用SPSS 19.0统计软件包进行处理,结果以均数 $\pm$ 标准差表示,统计分析采用重复测量数据的方差分析,单因素方差分析和LSD-*t*检验方差分析。

2 结果

2.1 Wayne Clark评分结果

移植术后第1天各组大鼠Wayne Clark评分无显著性意义($P>0.05$)。移植第3天,各组之间比较整体存在差异($P<0.01$),但磁场组与对照组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。移植第7天各组大鼠Wayne Clark评分呈下降趋势,两两比较均有明显差异($P<0.01$)。移植第30天,磁场组与骨髓源神经祖细胞组比较无显著差异($P>0.05$),对照组与其他组之间比较差异有显著性意义($P<0.01$)。见表1。

2.2 爬梯实验评分结果

移植术后第1天各组大鼠爬梯实验评分未见明显差异($P>0.05$)。移植第3天,对照组与磁场组之间比较无显著性意义($P>0.05$),其余各组间两两比较均有明显差异($P<0.01$)。移植第7天,各组大鼠爬梯实验中肢体踏空次数呈下降趋势,两两比较均有明显差异($P<0.01$),移植第30天,各组大鼠爬梯实验中肢体踏空次数明显减少,磁场组与骨髓源神经祖细胞组比较无显著差异($P>0.05$),对照组与其他组之间比较均有显著意义($P<0.01$)。见表2。

2.3 脑损伤组织病理形态学观察

移植第1天,磁场+骨髓源神经祖细胞组可见Dil标记的细胞填充在囊性空洞周围,各组大鼠脑组织具有损伤,囊性空洞周围可见炎症细胞伴有组织水肿,细胞排列不规则,结构模糊。移植第7天,各组大鼠脑组织结构有所恢复,炎症细胞数目减少,水肿范围减少,其中骨髓源神经祖细胞组和磁场+骨髓源神经祖细胞组效果更明显。移植第30天,磁场+骨髓源神经祖细胞组与其他组相比较,大鼠脑损伤部位水肿程度减轻,囊性空洞面积更小,细胞存活数较多并且排类规则。见图1。

表1 各组脑损伤大鼠 Wayne Clark 评分 (x±s,分)

组别	例数	检测时间			
		第1天	第3天	第7天	第30天
对照组	16	19.00±0.82	18.25±0.50	15.00±0.82	6.00±0.82
磁场组	16	19.25±1.26	17.50±0.58 ^②	10.00±0.82 ^{①②}	2.75±0.50 ^①
骨髓源神经祖细胞组	16	19.75±0.96	15.75±0.50 ^①	7.25±0.50 ^①	2.25±0.50 ^①
磁场+骨髓源神经祖细胞组	16	19.75±0.96	13.75±0.96 ^{①②③}	5.00±0.82 ^{①②③}	0.75±0.50 ^{①②③}

注:与对照组比较:①P<0.01;与细胞组比较:②P<0.01;与磁场组比较:③P<0.01

表2 各组脑损伤大鼠爬梯试验结果 (x±s,次)

组别	例数	检测时间			
		第1天	第3天	第7天	第30天
对照组	16	19.25±0.50	17.75±0.96	15.00±1.16	6.25±0.96
磁场组	16	19.50±1.00	17.75±0.50	9.75±0.50 ^①	2.50±0.58 ^①
骨髓源神经祖细胞组	16	19.50±0.57	15.00±0.82 ^{①③}	7.75±0.96 ^{①③}	2.25±0.50 ^①
磁场+骨髓源神经祖细胞组	16	19.50±0.58	12.50±1.73 ^{①②③}	4.25±0.50 ^{①②③}	0.50±0.58 ^{①②③}

注:与对照组比较:①P<0.01;与细胞组比较:②P<0.01;与磁场组比较:③P<0.01

2.4 免疫荧光染色

蓝色荧光是细胞核的阳性标志物DAPI,绿色荧光是GFAP和β-Ⅲ tubulin标志物阳性表达,红色荧光为DiI标记的细胞。移植术后30天,磁场+骨髓源神经祖细胞组大鼠脑损伤部位的细胞免疫细胞荧光检测胶质纤维酸性蛋白阳性表达更少,神经元特异性微管蛋白阳性表达明显高于其他组。见图2。

3 讨论

动物实验表明,神经干细胞移植到动物体内可

促进神经营养因子分泌并分化为不同类型的神经细胞参与受损神经的恢复^[12],有研究通过基因修饰源性神经营养因子转染神经干细胞可使其向成熟神经细胞分化^[13]。Shear等^[14]在神经干细胞移植修复脑损伤小鼠的研究中,选择不同时间进行移植,并在移植后第7、14、49天对小鼠的进行运动能力评估及组织学,细胞免疫观察,认为:最佳移植时间窗为脑损伤后2—7天,移植细胞的时间与其短时间内表型分化无明显相关性,与移植部位有关,其中移植到病灶皮质区分化及存活的细胞更多,运动功能恢复快。

图1 大鼠脑组织的病理形态学观察 (HE染色,×200)

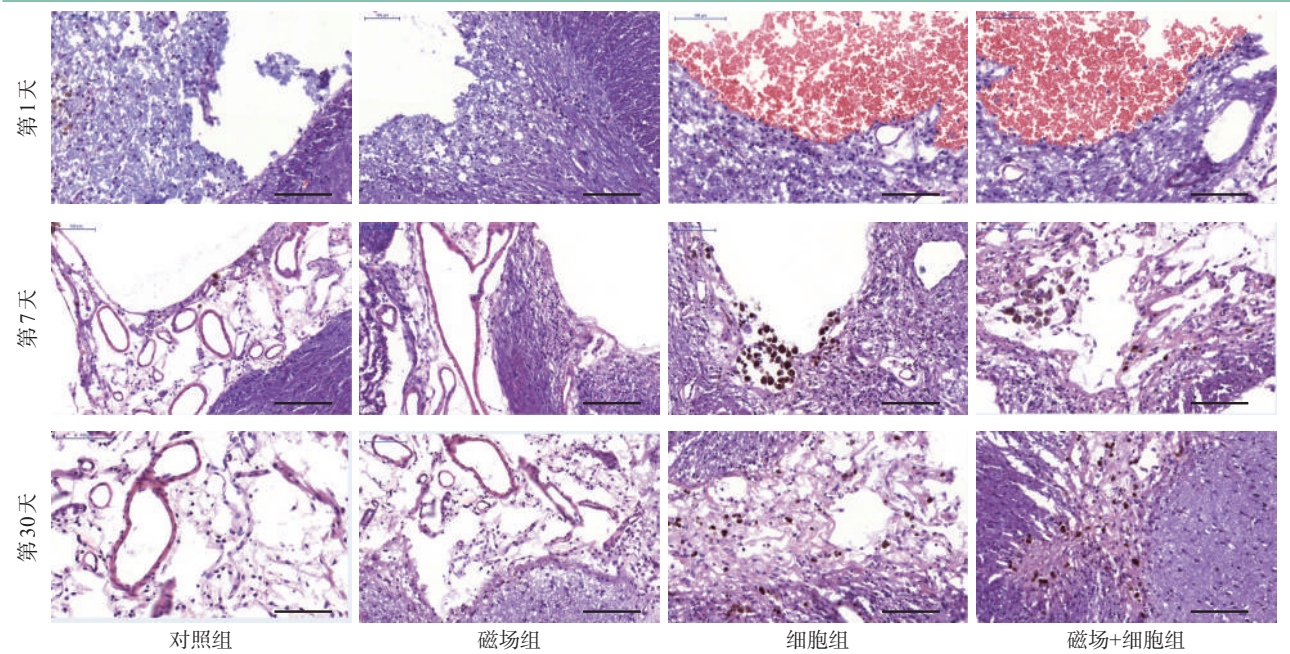
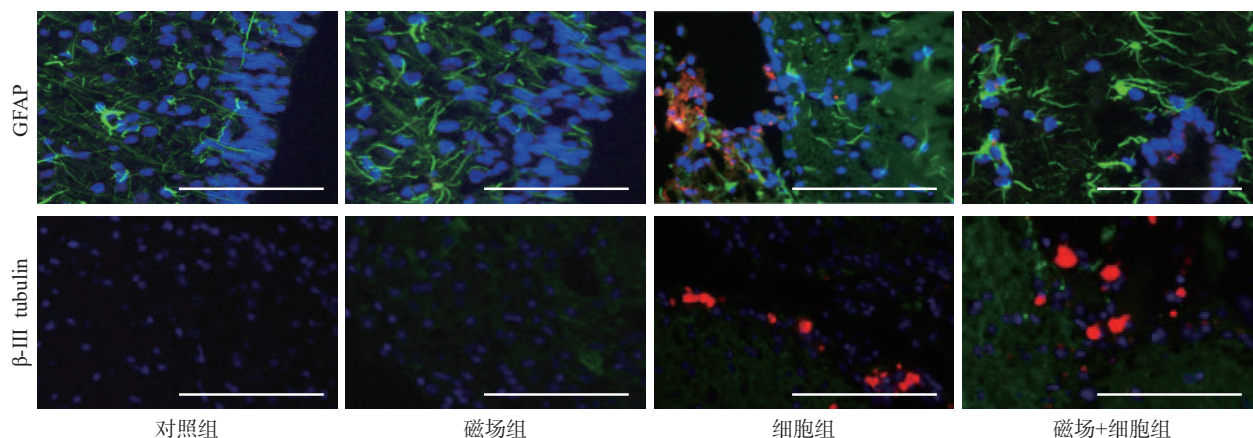


图2 移植术后30d,脑损伤组织 β -III tubulin和GFAP表达(免疫荧光染色, $\times 100$)

低频电磁场作为临床上常用的物理治疗方法,在消炎镇痛,减轻水肿等方面有一定疗效。经研究发现低频电磁场可促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞、心肌细胞分化。本实验组前期也证明正弦低频电磁场不仅促进了骨髓间充质干细胞的增殖,还促进了其向神经细胞的分化。近期研究表明:Grehl等^[15]观察到低强度电磁场可以激活小脑神经元并且促进神经可塑性相关基因的表达。Seo等^[16]体外实验结果表明,低频脉冲电磁场预处理的骨髓间充质干细胞增殖速度更快,生长因子的基因表达量更高,而体内实验发现预处理组分化的神经元细胞数目更多,轴突计数和轴突密度增加。本实验也发现各组大鼠脑损伤均有不同程度减轻,其中以磁场+骨髓源神经祖细胞组大鼠脑损伤恢复效果最明显。Mashkouri等^[17]认为单独细胞移植修复对中枢神经系统损伤后运动的恢复作用有限。本研究也观察到相似结果,在移植术后第30天时,骨髓源神经祖细胞组和磁场组行为学评分比较无明显差别,可能由以下原因造成:①可能与骨髓源神经祖细胞中移植细胞所处的生存环境恶化有关,混悬移植细胞所用的无血清神经培养基在损伤区迅速消耗,导致细胞生长所需的营养物质相对不足,引起其自身凋亡;②低频电磁场可能促进内源性神经干细胞分化为神经细胞并发挥修复作用并改善局部微环境,该作用与移植外源性神经干细胞的修复效果相当;③相对低频电磁场干预骨髓源神经祖细胞的相互效应,单独低频电磁场干预或移植细胞修复脑损伤大鼠的治疗

作用受限。上述实验均表明低强度、低频率电磁场在神经干细胞的增殖和分化中均具有促进作用,同时也证实电磁场与骨髓源神经祖细胞具有协同效应,可共同促进脑损伤大鼠运动功能的恢复。

神经元特异性微管蛋白是神经元的早期标志物^[18],存在于神经元的胞体、树突和轴突。胶质纤维酸性蛋白是星形胶质细胞的标志物^[19],参与形成细胞骨架。Shetty AK等^[20]实验观察到在大鼠脑损伤的急性期, γ -氨基丁酸能中间神经元减少,星形胶质细胞反应性增加和出现促炎症细胞因子,导致神经元异常生长及迁移。本实验中观察到,移植术后第30天,与骨髓源神经祖细胞组比较,磁场+骨髓源神经祖细胞组大鼠脑损伤部位的细胞免疫荧光检测胶质纤维酸性蛋白阳性表达更少,神经元特异性微管蛋白阳性表达明显高于其他组,并可见DiI标记细胞呈神经元特异性微管蛋白阳性表达,与损伤区域脑组织连接生长。HE染色:磁场+骨髓源神经祖细胞组与其他组相比较,大鼠脑损伤部位水肿程度减轻,囊性空洞面积更小,细胞存活数较多。Seong等^[21]观察到低频电磁场(50Hz, 1mT)在无添加神经营养因子的情况下可促进hBM-MSC向具有电生理特性的神经元分化。Lin等^[22]发现,在炎症环境中,低强度电磁场可改善损伤区域微环境,有助于促进成骨细胞增殖和成熟。有文献报道,低频电磁场可通过调整体内促炎反应或抗炎反应的平衡机制起到抗炎和调节细胞功能的作用^[23]。前期体外实验^[7]也观察到在50Hz电磁场诱导骨髓源神经祖细胞向神

经元细胞分化过程中Q-PCR检测神经元特异性微管蛋白mRNA也呈阳性表达,此外还检测到ACHE, GABA, 5-HT表达ACHE, GABA, 5-HT mRNA表达。上述研究提示50Hz电磁场无论在改善损伤灶周围微环境,减轻炎症反应,移植细胞本身,或者营养因子的表达都起到促进作用,可能与低频电磁场促进骨髓源神经祖细胞向神经元分化并参与脑损伤组织修复有关。至于50Hz电磁场促进骨髓源神经祖细胞移植修复大鼠脑损伤的机制如何,是否与神经递质的表达有关,有待进一步研究。

本实验提示骨髓来源的神经祖细胞具有替代修复神经组织,改善大鼠神经功能的作用,50Hz电磁场可促进骨髓源神经祖细胞移植修复大鼠脑损伤运动功能恢复、可能与其有助于移植骨髓源神经祖细胞向神经元分化,上调神经元特异性微管蛋白的表达并参与大鼠脑损伤修复有关。低频电磁场相当于微环境的调节器,是一种简便、有效、可行的减轻脑外伤继发性损伤的治疗手段。

参考文献

- [1] Abou El Fadl MH, O'Phelan KH. Management of traumatic brain injury: an update [J]. *Neurosurg Clin N Am*, 2018, 29: 213—221.
- [2] Kang JM, Yeon BK, Cho SJ, et al. Stem cell therapy for Alzheimer's disease: a review of recent clinical trials[J]. *Alzheimers Dis*, 2016, 54: 879—889.
- [3] Bernstock JD, Peruzzotti-Jametti L, Ye D, et al. Neural stem cell transplantation in ischemic stroke: A role for preconditioning and cellular engineering[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37: 2314—2319.
- [4] Butti E, Cusimano M, Bacigaluppi M, et al. Neurogenic and nonneurogenic functions of endogenous neural stem cells [J]. *Front Neurosci*, 2014, 8: 92.
- [5] Lozano D, Gonzales-Portillo GS, Acosta S, et al. Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2015, 11: 97—106.
- [6] Bai WF, Zhang MS, WC Xu, et al. 50Hz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stem cells to differentiate into functional neurons[J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(8): 961—970.
- [7] 李伟坤, 白文芳, 许伟成, 等. 50Hz电磁场促进骨髓源神经祖细胞向神经元分化[J]. *中国康复医学杂志*, 2016, (7): 723—728.
- [8] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates, Sixth Edition; Hard Cover Edition[M]. Academic Press, 2007.
- [9] Kilbourne M, Kuehn R, Tosun C, et al. Novel model of frontal impact closed head injury in the rat[J]. *Neurotrauma*, 2009, 26(12): 2233—2243.
- [10] Feeney DM, Bailey BY, Boyeson MG, et al. Animal models of traumatic brain injury : a review[J]. *Aust Vet*, 2001, 79(9): 628—633.
- [11] Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination[J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 115(2): 169—179.
- [12] Shear DA, Tate CC, Tate MC, et al. Stem cell survival and functional outcome after traumatic brain injury is dependent on transplant timing and location[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2011, 29: 215—225.
- [13] Fernandes AR, Chari DM. Part II: Functional delivery of a neurotherapeutic gene to neuralstem cells using minicircle DNA and nanoparticles: Translational advantages for regenerative neurology[J]. *Control Release*, 2016, 238: 300—310.
- [14] Shear DA, Tate CC, Tate MC, et al. Stem cell survival and functional outcome after traumatic brain injury is dependent on transplant timing and location[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2011, 29(4): 215—225.
- [15] Grehl S, Martina D, Goyenvall C, et al. In vitro magnetic stimulation: a simple stimulation device to deliver defined low intensity electromagnetic fields[J]. *Front Neural Circuits*, 2016, 10: 85.
- [16] Seo N, Lee SH, Ju KW, et al. Low-frequency pulsed electromagnetic field pretreated bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote the regeneration of crush-injured rat mental nerve[J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13: 145—153.
- [17] Mashkouri S, Crowley MG, Liska MG, et al. Utilizing pharmacotherapy and mesenchymal stem cell therapy to reduce inflammation following traumatic brain injury[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11: 1379—1384.
- [18] Yu YH, Narayanan G, Sankaran S, et al. Purification, visualization, and molecular signature of neural stem cells[J]. *Stem Cells and Development*, 2016, 25(2): 189—201.
- [19] Papageorgiou IE, Valous NA, Lahrmann B, et al. Astrocytic glutamine synthetase is expressed in the neuronal somatic layers and down-regulated proportionally to neuronal loss in the human epileptic hippocampus[J]. *Glia*, 2018, 66(5): 920—933.
- [20] Shetty AK, Hattiangady B, Rao MS. Vulnerability of hippocampal GABA-ergic interneurons to kainate-induced excitotoxic injury during old age[J]. *Cell Mol Med*, 2009, 13(8B): 2408—2423.
- [21] Seong Y, Moon J, Kim J. Egr1 mediated the neuronal differentiation induced by extremely low-frequency electromagnetic fields[J]. *Life Sci*, 2014, 102(1): 16—27.
- [22] Lin HY, Lin YJ. In vitro effects of low frequency electromagnetic fields on osteoblast proliferation and maturation in an inflammatory environment[J]. *Bioelectromagnetics*, 2011, 32(7): 552—560.
- [23] Rosado MM, Simko M, Mattsson MO, et al. Immune-modulating perspectives for low frequency electromagnetic fields in innate immunity[J]. *Front Public Health*, 2018, 6: 85.