

# 补肾健脾方增加成肌分化表达促进去睾丸小鼠 骨质疏松性骨折愈合的实验研究

廖文英<sup>1</sup> 邱丽玲<sup>2,3</sup> 张伟强<sup>2</sup> 赵永见<sup>3</sup> 高翔<sup>2</sup> 唐德志<sup>3△</sup>

**[摘要]** 目的:研究补肾健脾方对去睾丸小鼠骨质疏松性骨折愈合的疗效,探讨“先后天之本”“肾脾相关”“骨肉不相亲”等中医理论在骨质疏松性骨折防治中的应用。方法:按照体重并采用随机方法将 30 只雄性 C57BL/6 小鼠分为对照组和补肾健脾方组,每组各 15 只;补肾健脾方组给予补肾健脾方灌胃,对照组给予生理盐水灌胃。两组制备去睾丸小鼠骨质疏松性骨折模型,于骨折术后第 2 天分别给予相应药物灌胃治疗,连续灌胃 28 d,隔天 1 次,治疗结束后处死小鼠并取材,进行影像学观察、病理组织学染色以及逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)方法检测 MyoD1、MEF2C、Myf5 及 Myogenin 的表达量。结果:微型 CT 结果显示,补肾健脾方可促进骨痂形成及加速骨折愈合;比目鱼肌苏木精-伊红(HE)染色结果显示,与对照组比较,补肾健脾方组肌纤维排列紧密,肌细胞较多。RT-PCR 和 Western Blot 结果发现,与对照组比较,补肾健脾方组胫骨后肌 MyoD1、MEF2C、Myf5 及 Myogenin 等成肌分化基因和蛋白表达量均较高,且差异都有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:补肾健脾方可促进去睾丸小鼠骨质疏松性骨折的愈合,其机制可能与增加胫骨附着肌内 MyoD1、MEF2C、Myf5 及 Myogenin 的表达有关。

**[关键词]** 骨质疏松;去睾丸;骨质疏松性骨折;补肾健脾方;成肌分化;中医药疗法

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2024)09-0001-05

**DOI:** 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.240901

## The Study of Efficacy of the Nourishing Kidney and Invigorating Spleen Formula in Improving Osteoporotic Fracture Repair by Promoting Myogenic Differentiation

LIAO Wenyi<sup>1</sup> QIU Liling<sup>2,3</sup> ZHANG Weiqiang<sup>2</sup> ZHAO Yongjian<sup>3</sup>

GAO Xiang<sup>2</sup> TANG Dezhi<sup>3△</sup>

<sup>1</sup> People's Hospital of Ruijin City, Ruijin 342500, Jiangxi China;

<sup>2</sup> Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China;

<sup>3</sup> Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China.

**Abstract Objective:** To examine the ability of the nourishing kidney and invigorating spleen formula to promote osteoporotic fracture healing, and to discuss the traditional Chinese medicine (TCM) theories of the relationship between spleen and kidney, the origin of the innateness and acquirement, along with disharmony between bone and muscle in the application of the osteoporotic fracture prevention. **Methods:** 30 male C57BL/6 mice were divided into control group and nourishing kidney and invigorating spleen formula group, with 15 mice in each group. The nourishing kidney and invigorating spleen formula group was treated with the nourishing kidney and invigorating spleen formula, and control group was treated with normal saline by gastric perfusion. The osteoporotic fracture model after castration were prepared in two groups. On the second day after fracture operation, each group was given corresponding drugs by gavage for 28 d, once every other day, and after the treatment, the mice were killed to take the samples for imaging observation, histopathological staining and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot methods to detect the expres-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82274548)

上海市科委中药创新与传承领域项目(20S21902000)

<sup>1</sup> 瑞金市人民医院(江西 瑞金, 342500)

<sup>2</sup> 复旦大学附属华东医院

<sup>3</sup> 上海中医药大学附属龙华医院

△通信作者 E-mail: dztang702@126.com

sion of MyoD1, MEF2C, Myf5 and Myogenin. **Results:** The nourishing kidney and invigorating spleen formula had an effective effect in stimulating the formation of callus and improving the quality of fracture healing according to Micro-CT. The hematoxylin-eosin (HE) staining result of solus muscle showed that treatment of nourishing kidney and invigorating spleen formula could result in tighter arrangement of muscle fibers and more muscle cells than the control group. Western Blot and RT-PCR results showed that, compared with control group, the specific myogenic transcription factors of posterior tibial muscle, such as MyoD1, MEF2C, Myf5 and Myogenin, and protein expression in the nourishing kidney and invigorating spleen formula group were higher, and the differences were statistically significant. **Conclusion:** The nourishing kidney and invigorating spleen formula enhanced the repair of osteoporotic fracture, and its mechanism may be related to increasing the expression of MyoD1, MEF2C, Myf5 and Myogenin in tibial attachment muscle.

**Keywords:** osteoporosis; castrated male mice; osteoporotic fracture; nourishing kidney and invigorating spleen formula; myogenic differentiation; traditional Chinese medicine therapy

老年人是骨质疏松症的易发人群,其发病率与年龄正相关,65岁以上女性的骨质疏松发病率(53.8%)及骨折发生率(70.0%)显著升高<sup>[1]</sup>。美国和欧洲每年发生骨质疏松性骨折的人数约为250万人,相应的医疗支出约为230亿美元<sup>[2]</sup>。骨折均伴有骨骼和肌肉的损伤,而骨折依赖血管、韧带、肌肉等软组织的修复。国医大师施杞教授认为“肾、脾为先后天之本,骨之本在肾,骨之养在脾”,临床上运用补肾健脾方治疗骨质疏松性骨折,获得良好疗效。本研究旨在探究补肾健脾方治疗骨质疏松性骨折的疗效机制,为其进一步临床应用提供实验依据,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

通过上海中医药大学动物房订购2月龄C57BL/6雄鼠30只,在SPF级环境下适应性饲养至3月龄。实验过程中小鼠可自由饮水和进食(订购许可证号为SCXK(京)2012-0001)。

### 1.2 实验试剂和仪器

水合氯醛和10%中性缓冲福尔马林固定液(Titan公司);uCT80微型CT(SCANCO Medical,瑞士);5417R小型台式冷冻式离心机(Eppendorf,德国);MED-U53V-80℃超低温冰箱(SANYO,日本);BCA蛋白浓度试剂盒(P0010S,碧云天生物技术有限公司);RNase-free EP管(MCT-150, Axygen,美国);伊红、苏木精染液(南京建成科技有限公司);Anti-MyoD1抗体(ab16148, abcam);Anti-MEF2C抗体(ab211493, abcam);Anti-Myf5抗体(ab125078, abcam);抗肌生成素(Anti-Myogenin)抗体(ab124800, abcam);GAPDH小鼠单抗抗体(6004-1-Ig, proteintech)。

### 1.3 方法

**1.3.1 建立骨质疏松模型** 在雄鼠3个月龄时,以睾丸切除术建立骨质疏松模型,具体手术操作方式为:将10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)注射到小鼠腹腔,待麻醉起效后,将小鼠仰卧位平铺于无菌手术台,小鼠术口

备皮并消毒,戴无菌手套将小鼠睾丸从腹腔推入阴囊,在阴囊部选择切开约1 cm的手术切口,无菌缝合线将睾丸根部结扎并切除阴囊,之后缝合术口,金霉素眼膏涂抹伤口。

**1.3.2 分组** 去睾丸后3个月,对30只小鼠进行随机分组,分为补肾健脾方组和对照组,各15只。

**1.3.3 药物配制、煎煮方法** 1)补肾健脾方药物组成和剂量:补骨脂9 g,骨碎补9 g,党参12 g,刺五加12 g,独活9 g,丹参12 g,药方由上海中医药大学附属龙华医院中药房调制。2)将5幅中药(共计63 g生药)放入锅中,加水至超过药面2 cm左右(约3 L),确保全部中药充分浸润,浸泡1 h左右,用大火煮至沸腾改用小火,煎煮2次,头煎和二煎均为沸腾后煎30 min左右,两次煎出后药液相混合,最后得到约300 mL的药汁。3)小鼠药量计算公式:小鼠药量=(1/70)×10×体重×数量×次数。计算得小鼠每只0.3 mL/d灌胃。对照组给予等体积生理盐水灌胃。

**1.3.4 建立骨质疏松性骨折模型** 骨质疏松模型建立3个月后,将10%氯醇(0.3 mL/100 g)注射到腹部进行麻醉,麻醉起效后将小鼠置于仰卧位。将左胫骨术口区表皮毛发全部剃光,以碘伏消毒,手术刀自胫骨前缘约1.5 cm处切开皮肤,钝性分离胫骨中上1/3(胫骨脊上方)内侧和外侧筋膜及肌肉等软组织。预先将髓内针自胫骨平台处沿着骨髓腔插入到胫骨上1/3直至断裂处,之后用手术刀完全切断胫骨,操作时应当避免伤及内侧周围血管、神经、肌肉等软组织。后将远端针头插入断端下部骨髓腔中约3/4长度并剪断近端针头,将针头抵入胫骨平台下方位置,术毕逐层缝合筋膜、肌肉和皮肤。手术后第2天进行灌胃。所有小鼠在连续灌胃28 d后处死,取材并检测相关指标。

**1.3.5 微型CT检测** 小鼠处死后切除左后腿,将其放到浓度为10%的中性福尔马林中固定,冲洗后放入消毒酒精中,每组随机选取6个样本进行18 μm逐层扫描成像及三维重建的微型CT检查,检测设备为

uCT80 微型 CT,检测部位统一定位于左侧胫骨骨折部位。

1.3.6 组织病理学染色 苏木精-伊红(HE)染色常规流程:将 6  $\mu\text{m}$  石蜡切片放置于 60  $^{\circ}\text{C}$  烤箱 5 min,常规脱蜡脱水→置于苏木精染液 2 min→置于蒸馏水冲洗 1 min→置于盐酸乙醇分化 5 s→置于氨水蓝化 15 s→置于蒸馏水冲洗→置于伊红染液 2 min→置于蒸馏水冲洗→进行梯度乙醇分化→二甲苯透明→中性树胶封片。Olympus VS120-SL 20 倍目镜下观察。

1.3.7 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 取出在-80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冻存的胫骨后肌(每组随机取出 3

个,每个不超过 0.3 g),加入钢珠、1 mL Trizol,使用振荡机将样品充分振荡混匀,室温静置 5 min。继续加入氯仿并振荡后室温下孵育离心,吸液枪吸取上层水相,在遗留物质内加入异丙醇,并使用离心机再次离心,吸液枪吸取沉淀物提取 RNA;之后加入 DEPC 水与 RNA 混合均匀,使用 ND1000 型微量紫外可见分光光度计检测总 RNA 浓度及吸光度值。RNA 浓度符合要求则严格按照操作说明进行反转录反应液配置和转录反应操作,生成 cDNA。配置聚合酶链式反应体系,以 cDNA 为模板行基因扩增,进行聚合酶链式反应。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	上游引物	下游引物
$\beta$ -actin	GCAGGAGTACGATGAGTCCG	ACGCAGCTCAGTAACAGTCC
Myf5	GCAGCAGAAGAAACGTGTGAC	GGCTCAAACCTGGTCCCCAAA
MyoD1	CCGTGTTTCGACTCACCAGA	GTAGTAGGCGGTGTCGTAGC
MEF2C	ACTTGTGCAGAGGGATCACG	GGAACAGCTTGTTGGTGCTG
Myogenin	GAGGAAGTCTGTGTCGGTGG	CCACGATGGACGTAAGGGAG

1.3.8 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 分离获取小鼠全部胫骨后肌,放入准备好的 1.5 mL 离心管中,并投入液氮冷冻,-80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。每组随机取出 3 个,按实验分组在液氮冷冻环境中将胫骨后肌碾成粉末,获得的粉末中按照每 20 mg 组织加入 1 mL 预冷的 RIPA 缓冲裂解液形成混悬液,在-4  $^{\circ}\text{C}$  15 000g 离心机中离心 10 min,吸液枪吸取上清液。随即选用 BCA 蛋白定量试剂盒,测定上清样本中蛋白浓度。Western Blot 检测具体操作步骤:将准备好的蛋白样品煮沸 10 min,定量 20  $\mu\text{g}$  上样,与标志物同时电泳;分离出蛋白后将蛋白转膜,并将膜置于 5%牛奶封闭液中室温孵育 1 h;Anti-MyoD1 抗体、Anti-MEF2C 抗体、Anti-Myf5 抗体、Anti-Myogenin 抗体和 GAPDH 小鼠单抗抗体 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育;之后以 TBST 缓冲液充分洗膜,待检查洗膜彻底后分别用相应二抗(1:1 000,辣根过氧化物酶标记的抗兔抗体和抗鼠抗体)室温下孵育 1 h,再次使用 TBST 缓冲液充分洗膜后使用增强型高敏感化学发光(ECL)试剂显色,扫描图片并拍照。每个实验样本均重复 2 次。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 进行数据分析和统计,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  形式表示,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组小鼠骨折断端影像学观察

经过治疗后,补肾健脾方组可见胫骨骨折部位板状骨痂存在明显,骨折线消失,骨髓腔已通。对照组胫骨的骨痂仍有不同程度吸收,且骨痂比较疏松(见

图 1)。

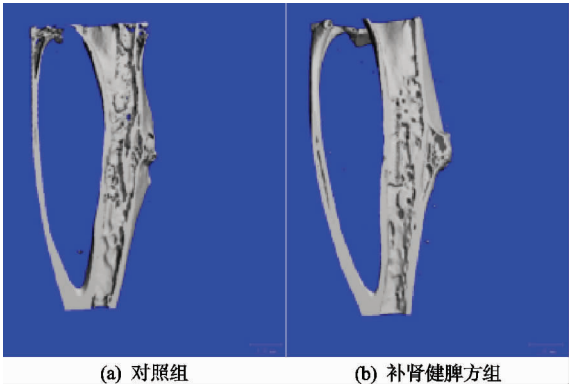


图 1 三维重建显示两组小鼠胫骨骨折断端结构

2.2 两组小鼠比目鱼肌 HE 染色结果比较

与对照组比较,补肾健脾方组肌纤维排列更为紧密,肌细胞明显较多(见图 2)。

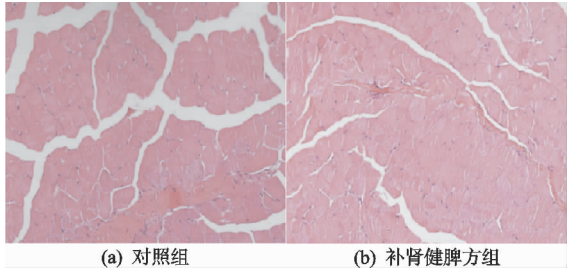


图 2 HE 染色显示两组小鼠比目鱼肌肌纤维结构( $\times 100$ )

2.3 成肌分化相关基因在胫骨后肌中表达情况

从所取胫骨后肌中每组随机抽 3 个样本,采用 RT-PCR 方法检测成肌分化相关基因表达水平,发现补肾健脾方组 MyoD1、MEF2C、Myf5、Myogenin 等成肌分化相关基因表达显著上调,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3。

## 2.4 成肌分化相关蛋白在胫骨后肌中表达情况

从所取胫骨后肌中每组随机抽 3 个样本,采用 Western Blot 法对胫骨后肌中这些标志物的蛋白表达量进行检测,发现补肾健脾方组 MyoD1、MEF2C、Myf5、Myogenin 等成肌分化相关蛋白表达显著上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 4 和图 5。

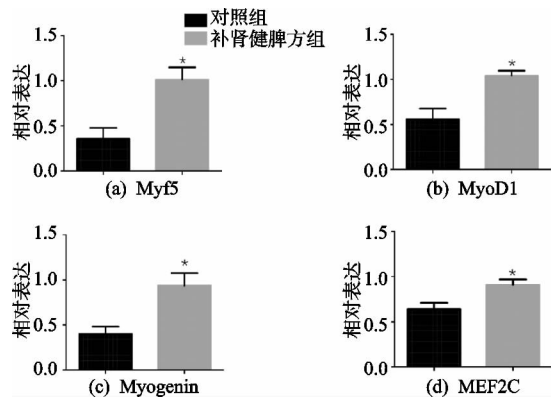


图 3 RT-PCR 法检测两组小鼠胫骨后肌中成肌分化相关基因的表达(两组比较, \*  $P < 0.05$ )

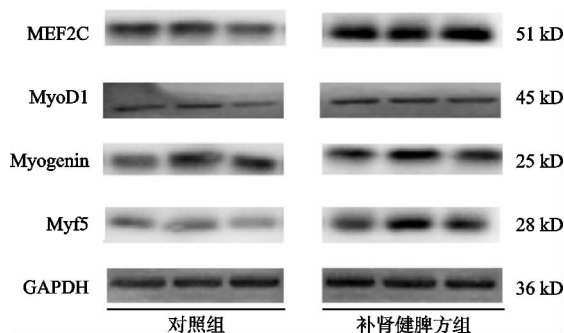


图 4 Western Blot 法检测两组小鼠胫骨后肌中成肌分化相关蛋白的表达

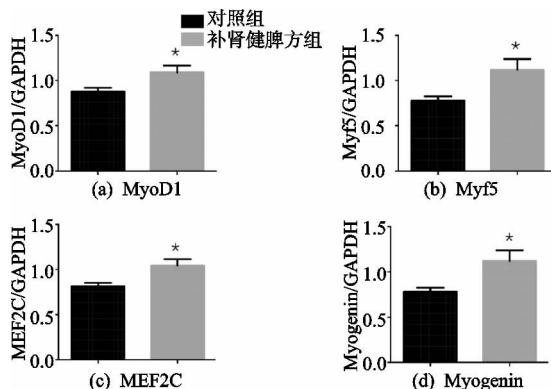


图 5 两组小鼠胫骨后肌中成肌分化相关蛋白表达量(两组比较, \*  $P < 0.05$ )

## 3 讨论

现代医学治疗骨质疏松性骨折的首要目标是加速骨折愈合、恢复骨骼的支撑作用和生理功能。除了改善复位质量,提高骨折固定技术等,还需重视综合措施改善体内骨折愈合环境,促进骨折愈合并预防再次骨折<sup>[3-6]</sup>。而中医传统文献将骨质疏松疾病归为“骨痹”

“骨痿”等范畴。目前国内骨伤科医家多从“三期辨证”治疗骨质疏松性骨折,主以补肝肾、益气血,辅以健脾<sup>[7-8]</sup>。中医学认为“脾为后天之本”“脾主肌肉”“肾主骨”以及“先后天之本”等,阐述脾与骨生理、病理上的联系<sup>[9]</sup>,一定程度确证了脾-肌肉-骨的紧密联系。

近年来,骨骼和肌肉之间关系引起了许多研究者的兴趣。骨骼与肌肉之间的作用不限于机械联系,还有生物化学和分子水平联系<sup>[10]</sup>。有研究认为骨是内分泌器官,成骨细胞和骨细胞均具有释放诸如骨钙素等因子能力,骨钙素可以通过肌肉力量和总体骨钙素水平等对肌肉产生影响。另外,运动可以增加血液中未经丙基化骨钙素的水平,该生物指标水平可能对肌肉的强度有直接影响<sup>[11]</sup>。骨细胞还可产生循环因子(如 FGF23),FGF23 对心肌有影响,最近有研究表明血液循环中 FGF23 水平升高与心脏病风险增加有关;而在人群研究中,FGF23 升高与左室肥厚有独立联系。另一方面,有研究者报告,肌生长抑素失活可导致动物和人类肌肉肥大或“双肌”,表明局限于一个组织的突变会导致另一个组织特性的改变<sup>[12]</sup>。Hamrick 等认为肌肉-骨骼具有双向关联,肌肉质量与骨矿物含量和密度正相关,体积较大的肌肉内往往存在大量的表皮生长因子等有利于骨骼生长的因子,在骨量增加、成骨性因子分泌的同时也可以反馈性改善肌肉质量和优化肌肉功能。肌-骨平衡是中医学在整体观念指导下诊治运动系统疾病的重要理论体系,强调肌肉-骨骼系统功能的平衡有序和互相协调。一项基础实验研究发现肌肉质量可显著影响肌肉附着部骨骼骨矿物含量和骨密度水平,较大体积的肌肉中往往伴随有较多的骨生长因子等促进骨骼生长的因子分泌,影响骨量<sup>[13]</sup>。另外有文献报道,编码一种肌细胞增强因子 2C 转录因子的基因(Myocyte Enhancer Factor 2C, MEF2C),目前被相关研究者证实参与心脏和骨骼肌的发育。在一个特异性敲除 MEF2C 的小鼠模型中,研究者发现这些小鼠可能通过复杂机制增加骨密度,该机制可能是通过减少骨硬化蛋白(SOST)表达,增加骨保护素表达,进而导致 RANKL/OPG 比率的降低,最终导致破骨细胞形成减少<sup>[14]</sup>。骨质疏松作为一种先天性骨病,由于 Col1A1 和 Col1A2 突变导致胶原蛋白缺乏,骨脆性增加,使患者容易发生骨折。在此病的模型中,Gremminger 等<sup>[15]</sup>观察发现,即使在没有肌肉疾病情况下,小鼠仍然存在明显肌肉无力。上述这些研究不仅为临床相关骨与肌肉串扰提供了强有力的证据,同时也表明肌肉增加的负荷并非骨骼-肌肉关系中唯一决定因素。受到损伤的骨骼会对肌肉功能产生负面影响,或者被破坏的骨骼可能释放促进肌肉修复的因子或其他蛋白。总之,肌肉与骨的密切相关性在骨质疏松和骨质疏

松性骨折防治中具有重要作用。因此,在骨质疏松和骨质疏松性骨折防治过程中肌肉与骨骼的治疗贯穿始终。

在本实验中,通过检测肌肉中成肌分化标志物蛋白和 mRNA 表达变化,观察胫骨骨折愈合情况,试图证明在骨质疏松性骨折中肌肉的恢复有助于骨折的愈合。从细胞学角度来看,有可能骨折受到创伤后引起肌肉分化成肌细胞,促进骨折部位肌纤维的修复,进而修复骨骼损伤。而从力学角度来看,当肌肉功能下降时,骨骼的负荷就会减少,从而导致骨量的减少<sup>[16]</sup>。然而,仅靠肌肉萎缩并不能完全解释骨质疏松症的整体情况。随着骨量的减少,衰老也并不能完全解释骨质疏松症的原因<sup>[2,17]</sup>。从中医学角度来看,中老年人骨质疏松症及骨质疏松性骨折多因肝、脾、肾亏虚,气血阴阳紊乱所致,肾为先天之本,肝肾同源,脾为后天之本,为气血生化之源。从病因来讲,肾虚是骨质疏松症的根本,脾虚是主要环节,血瘀是促进环节<sup>[18]</sup>。因此,本研究选用施杞教授临诊中的经验基础方补肾健脾方,此方以补肾为主,辅以健脾、活血。其中君药补骨脂温肾壮阳,骨碎补补肾强骨、续伤止痛;臣药党参补中益气,刺五加益气健脾,补肾安神;佐药丹参活血祛瘀,通经止痛;使药独活,入肾经、通痹止痛等。补肾健脾方可促进去睾丸小鼠骨质疏松性骨折的愈合,其机制可能与增加胫骨附着肌内 MyoD1、MEF2C、Myf5、Myogenin 的表达有关,而通过补肾健脾提高机体对成骨中药有效成分的充分吸收可能也是其潜在机制之一。

## 参考文献

- [1] TANG D Z, YANG F, YANG Z, et al. Psoralen stimulates osteoblast differentiation through activation of BMP signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 405(2): 256-261.
- [2] VAN DEN BERGH J P, VAN GEEL T A, GEUSENS P P. Osteoporosis, frailty and fracture: implications for case finding and therapy[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2012, 8(3): 163-172.
- [3] YANG T L, SHEN H, LIU A, et al. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(2): 91-103.
- [4] CLAES L, RECKNAGEL S, IGNATIUS A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(3): 133-143.
- [5] FUGGLE N R, CURTIS E M, WARD K A, et al. Fracture prediction, imaging and screening in osteoporosis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2019, 15(9): 535-547.
- [6] YOO J H, MOON S H, HA Y C, et al. Osteoporotic frac-

- ture; 2015 position statement of the Korean society for bone and mineral research[J]. *Journal of Bone Metabolism*, 2015, 22(4): 175-181.
- [7] KHOSLA S, HOFBAUER L C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5(11): 898-907.
- [8] 袁明阳, 王建伟. 中医药治疗骨质疏松症的研究进展[J]. *世界中医药*, 2016, 11(6): 1119-1121.
- [9] 笪巍伟, 唐德志, 赵永见, 等. 探“先天、后天”理论在促进去卵巢小鼠骨质疏松性骨折愈合中的作用[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(6): 2647-2651.
- [10] BONEWALD L F, KIEL D P, CLEMENS T L, et al. Forum on bone and skeletal muscle interactions: summary of the proceedings of an ASBMR workshop[J]. *J Bone Miner Res*, 2013, 28(9): 1857-1865.
- [11] BROTT M, BONEWALD L. Bone and muscle: interactions beyond mechanical[J]. *Bone*, 2015, 80: 109-114.
- [12] MIRZA M A, LARSSON A, MELHUS H, et al. Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 207(2): 546-551.
- [13] BETTIS T, KIM B J, HAMRICK M W. Impact of muscle atrophy on bone metabolism and bone strength: implications for muscle-bone crosstalk with aging and disuse[J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(8): 1713-1720.
- [14] KRAMER I, BAERTSCHI S, HALLEUX C, et al. MEF2C deletion in osteocytes results in increased bone mass[J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(2): 360-373.
- [15] GREMMINGER V L, JEONG Y, CUNNINGHAM R P, et al. Compromised exercise capacity and mitochondrial dysfunction in the osteogenesis imperfecta murine (oim) mouse model[J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(9): 1646-1659.
- [16] HARRY L E, SANDISON A, PEARSE M F, et al. Comparison of the vascularity of fasciocutaneous tissue and muscle for coverage of open tibial fractures[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2009, 124(4): 1211-1219.
- [17] PEDERSEN B K, FEBBRAIO M A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2012, 8(8): 457-465.
- [18] 袁林, 李亚锋, 赵学千, 等. 从“骨肉不相亲”探讨补肾健脾活血法治疗骨质疏松性椎体骨折[J]. *现代中医临床*, 2023, 30(1): 72-75.

(收稿日期: 2023-10-10)