

大豆异黄酮对大鼠骨骼肌纤维组织形态及肌收缩蛋白表达的影响

唐伊^{1#} 谭金龙^{1#} 罗启慧^{1,2} 黄超¹ 刘文涛^{1,2} 陈正礼^{1,2*}

(¹四川农业大学动物医学院, 动物疾病模型实验室, 成都 611130; ²四川农业大学预防兽医研究所, 成都 611130)

摘要 为了探究SIF对肌肉生长的影响, 我们用6周龄SD雄性大鼠作为实验对象, 运用苏木精-伊红染色法、免疫组织化学法和实时荧光定量PCR法研究不同浓度大豆异黄酮(soybean isoflavone, SIF)作用下的雄性大鼠肌纤维形态学变化和 α -肌动蛋白(α -actin)、肌球蛋白(myosin)及其mRNA表达量的变化。苏木精-伊红染色结果显示, 中、高剂量组肌纤维直径极显著高于溶媒对照组($P<0.01$)。免疫组织化学结果显示, 中、高剂量组 α -actin表达量极显著高于溶媒对照组($P<0.01$); myosin表达量高剂量组极显著高于溶媒对照组($P<0.01$), 中剂量组显著高于溶媒对照组($P<0.05$)。实时荧光定量PCR结果显示, 目的基因 α -actin和myosin mRNA的表达量变化与蛋白表达基本一致。以上结果表明, SIF能够通过促进 α -actin和myosin蛋白及mRNA在肌肉中的表达, 使雄性大鼠肌纤维增粗。可为大豆异黄酮改善肌肉收缩、促进骨骼肌纤维增粗提供理论指导和实验依据。

关键词 大豆异黄酮; 肌纤维; 肌动蛋白; 肌球蛋白

Study on Morphology of Skeletal Muscle Fiber and Expression of Muscle Shrinkage Protein in Rats after Treatment with Soybean Isoflavone

Tang Yi¹, Tan Jinlong¹, Luo Qihui^{1,2}, Huang Chao¹, Liu Wentao^{1,2}, Chen Zhengli^{1,2*}

(¹Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; ²Institute of Preventive Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract To investigate the effect of SIF on muscle growth, they used 6-week-old SD male rats as test subjects. We used hematoxylin-eosin staining, immunohistochemistry, and Real-time fluorescence quantitative PCR to study morphological changes of myofibers and changes in the expression of α -actin, myosin and mRNA in male rats after treatment with different concentrations of soybean isoflavone. The results of the study showed that the muscle fiber diameters of the middle and high dose groups were significantly higher than those of the vehicle control group ($P<0.01$). Immunohistochemical results showed that the expression of α -actin was significantly higher in the medium and high dose groups than in the vehicle control group ($P<0.01$); the high dose group of myosin was significantly higher than the vehicle control group ($P<0.01$), and the middle dose group was significantly higher than the vehicle control group ($P<0.05$). The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that the expression levels of target gene α -actin and myosin mRNA were basically consistent with the protein expression.

收稿日期: 2018-02-07 接受日期: 2018-05-28

四川省大学生创新训练计划项目(批准号: 201610626067)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者: Tel: 13308168367, E-mail: chzhli75@163.com

Received: February 7, 2018 Accepted: May 28, 2018

This work was supported by the Project of Graduate Innovation in Sichuan Province (Grant No.201610626067)

#These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-13308168367, E-mail: chzhli75@163.com

网络出版时间: 2018-07-27 16:43:12

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180727.1642.010.html>

The results showed that soybean isoflavones could thicken the muscle fibers by promoting the expression of actin, myosin and their mRNA in muscle, which could provide theoretical guidance and experimental basis for soybean isoflavone to improve muscle contraction and promote skeletal muscle fiber thickening.

Keywords soybean isoflavones; muscle fiber diameter; actin; myosin

大豆异黄酮(soybean isoflavone, SIF)来源广泛, 在大豆、葛根、小麦、黑米等常见食用植物中含量相对较多^[1]。研究表明, SIF具有抗氧化、抗肿瘤、降血脂、提高代谢以及增强免疫等功效^[2-5]。SIF还可与下丘脑和垂体等雌激素受体结合, 发挥其类雌激素作用, 但对雌性作用不明显。前人研究表明, 大豆异黄酮是一类具有较大治疗意义和营养学价值的生物活性物质。

肌动蛋白(actin)和肌球蛋白(myosin)是两种主要的骨骼肌收缩蛋白^[6]。actin在真核细胞中含量极丰富, 占肌细胞总蛋白含量的10%^[7]。Vandekerckhove等^[8]的研究发现, actin有 α 、 β 、 γ 三种不同类型, 其中 α -actin只存在于肌肉细胞中, 与肌丝滑行直接相关^[9]。 α -actin分子单体呈球形, 在聚合于细肌丝中, 组成细肌丝的主干。myosin组装成肌原纤维的粗肌丝, 其表达与体内激素、运动等有关^[10]。肌肉蛋白含量改变反映了肌肉张力等功能状态的变化, 减少标志着肌纤维的萎缩和退变^[11], 表现为肌肉无力、体积减小, 肌肉蛋白含量增多则表示肌肉功能的改善。

研究显示, 异黄酮类植物雌激素能促进蛋白质合成代谢加强, 使蛋白质总量积累显著增加, 表现为肌纤维的营养性增粗, 从而对肌肉生长有积极的促进作用^[12-13]。目前关于SIF对肌肉相关的研究较少, 本实验拟通过SIF对肌纤维直径和肌肉蛋白表达量变化影响的研究, 从形态学、蛋白质及核酸水平方向探究SIF对骨骼肌肌肉形态及肌肉收缩蛋白表达的影响, 可为大豆异黄酮改善肌肉收缩功能、促进骨骼肌纤维增粗提供理论指导和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及处理

6周龄SD雄性大鼠20只, 由成都达硕实验动物有限公司提供, 随机分为4组, 每组5只, 分别为溶媒对照组、高剂量组、中剂量组、低剂量组。实验中对动物的处置符合《关于善待实验动物的指导性意见》。动物福利符合“美国国家卫生研究院实验

室动物饲养管理和使用指南(The National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animal)”的要求, 由四川农业大学伦理委员会批准。溶媒对照组灌胃羧甲基纤维素钠, 高、中、低剂量组灌胃不同浓度SIF, 即高(500 mg/kg)、中(250 mg/kg)、低(50 mg/kg)剂量组^[14]。每天下午灌胃1次, 灌胃试验时间为30天。最后1次灌胃后禁食24 h, 腹腔注射10%水合氯醛(0.4 mL/100 g), 置于冰上快速处死, 进行解剖。取左前肢肱二头肌, 用生理盐水清洗后, 分别放在多聚甲醛和液氮中保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

α -actin和myosin家兔单克隆抗体、牛血清白蛋白封闭液、山羊抗家兔IgG、即用型SABC-AP试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)棕色显色剂均购自武汉博士德生物工程有限公司; SYBR Premix Ex Taq II(Tli RNaseH Plus)、RNAiso-Plus购自宝生物工程(大连)有限公司。

实验所使用的仪器包括: RM2235手动轮转式切片(Leica公司), BX41光学显微镜(Olympus公司); DS-Ri1生物数码显微镜(Nikon公司), CFX96荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司)。

1.3 大鼠肌肉石蜡切片的制备

取经30天高、中、低不同SIF灌胃及对照组大鼠左前肢肌肉组织置于4%多聚甲醛液中固定, 经流水冲洗24 h, 常规脱水, 石蜡包埋, 石蜡标本连续切片10片, 切片厚5 μ m, 裱片于多聚赖氨酸包被的载玻片上, 于烘箱处理5 h。

1.4 苏木素-伊红染色法

每只大鼠肌肉切片取3张, 经脱蜡、复水后, 进行常规苏木素-伊红染色, 封片, 镜检, 观察肌肉组织细胞形态, 测量肌纤维直径。

1.5 SABC免疫组化染色法

每只大鼠肌肉切片取6张(每个蛋白3张), 用SABC免疫组化染色法检测 α -actin和myosin的表达。切片按照常规步骤处理, 经抗原修复、封闭, 进行抗体孵育, 加DAB显色, 镜下控制反应时间, 蒸馏水终止反应, 脱水, 透明封片, 镜检。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 The sequences of real-time fluorescence quantitative PCR primers

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物长度(bp) Product length (bp)
<i>α-actin</i>	F: ATA TTC TGT CTG GAT CCG C R: GCT TCG TCA TAC TCC TGT TT	87
<i>myosin</i>	F: TTT ACA GCC GCC TCT TCG R: GCT GTT ATC CTC CAG TAT CTC AA	128
<i>β-actin</i>	F: ACG GTC AGG TCA TCA CTA TCG R: GGC ATA GAG GTC TTT ACG GAT G	155

1.6 实时荧光定量PCR

内参基因 β -actin及目的基因 α -actin、myosin上下游引物由宝生物工程(大连)有限公司合成(表1)。

提取大鼠肱二头肌组织总RNA进行反转录、实时荧光定量PCR,采用CFX96序列系统。总反应体系为25 μ L,进行如下扩增:95 $^{\circ}$ C预变性3 min;95 $^{\circ}$ C变性10 s,58 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸10 s,共进行40个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。待测样品分别以内参基因(β -actin)作为对照,每个样品3次重复,以3次得到的Ct值的平均值为最终测定结果。

1.7 软件分析

将制得的切片在光学显微镜400倍下拍照、观察、记录,用江苏捷达801形态分析软件测量HE染色结果,每张片子随机选取3个视野,每组3张,测定视野中全部肌纤维的长径和短径,取其平均值作为肌纤维直径。利用此软件对免疫组化结果进行分析,每张片子随机选取3个视野,每组3张,测定免疫组化阳性反应的平均积分光密度值。比较各组大鼠骨骼肌纤维直径和免疫组化阳性反应的积分光密度值。mRNA基因相对表达水平用Livak等^[14]建立的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,公式为: $\Delta\Delta Ct = \text{试验组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内标基因}}) - \text{对照组}(Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内标基因}})$,所有样品重复3次。

1.8 统计学分析

试验数据采用SPSS 17.0进行单因素方差分析,数据结果用平均值 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SIF对大鼠肌纤维的影响

选取大鼠肱二头肌切片,常规HE染色,镜下观察发现,肌纤维为均染的粉红色,横断面呈钝角多面形。细胞核位于肌纤维周边,各结构组织清晰规则,

无可见病理组织学变化(图1)。测量及统计肌纤维直径结果显示,中、高剂量组极显著高于溶媒对照组($P < 0.01$),高剂量组显著高于低剂量组($P < 0.05$)(图2)。结果表明,SIF能在一定程度上增大肌纤维直径,且中、高剂量效果显著。

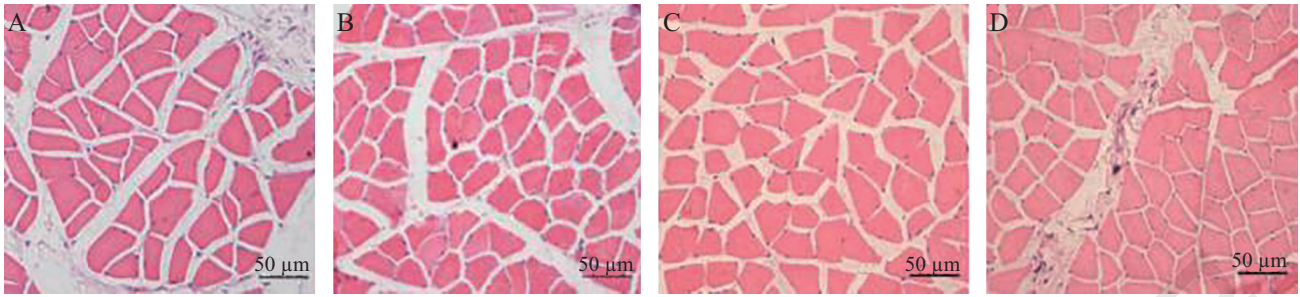
2.2 SIF对大鼠骨骼肌 α -actin和myosin分布的影响

选取大鼠肌肉切片进行免疫组织化学染色,阳性反应显色为黄褐色或棕黑色,分布于肌纤维胞质内,阴性对照未见阳性反应。肌纤维胞质内阳性区域深染,胞核无阳性反应,表明 α -actin和myosin均表达于肌纤维胞质(图3和图4)。

对 α -actin在肌肉中的平均积分光密度进行统计,结果显示:中、高剂量组极显著高于溶媒对照组($P < 0.01$);高剂量组极显著高于低剂量组($P < 0.01$);中剂量组显著高于低剂量组($P < 0.05$)(图5)。统计myosin在肌肉中的平均积分光密度,结果显示:高剂量组极显著高于溶媒对照组和低剂量组($P < 0.01$);中剂量组显著高于溶媒对照组($P < 0.05$);高剂量组显著高于中剂量组($P < 0.05$)(图6)。统计结果表明,SIF显著增加了 α -actin和myosin的分布,且 α -actin和myosin的分布和SIF剂量呈正相关。

2.3 SIF对大鼠骨骼肌 α -actin和myosin的mRNA表达的影响

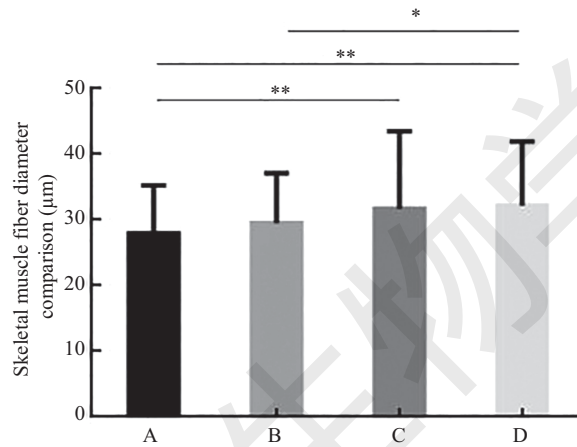
采用实时荧光定量PCR检测方法,得到雄性大鼠左前肢肌肉中 α -actin和myosin的mRNA表达量,结果如图7和图8所示。中、高剂量组 α -actin mRNA表达量极显著高于溶媒对照组($P < 0.01$),低剂量组显著高于溶媒对照组($P < 0.05$)(图7);高剂量组myosin mRNA表达量极显著高于溶媒对照组($P < 0.01$),中剂量组表达量显著高于溶媒对照组($P < 0.05$)(图8)。统计结果表明,SIF能明显促进目的基因mRNA的表达,且mRNA的表达量和SIF剂量相关。



A: 溶媒对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。
 A: vehicle control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group.

图1 各组大鼠骨骼肌HE染色光镜图像

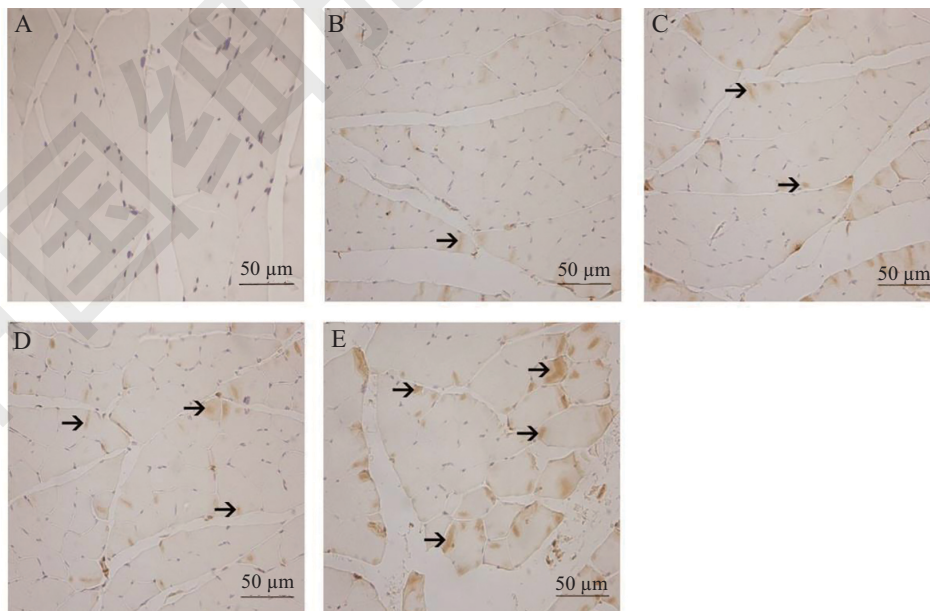
Fig.1 HE-stained light microscopy image of rats skeletal muscle



A: 溶媒对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
 A: vehicle control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图2 大鼠骨骼肌纤维直径对比

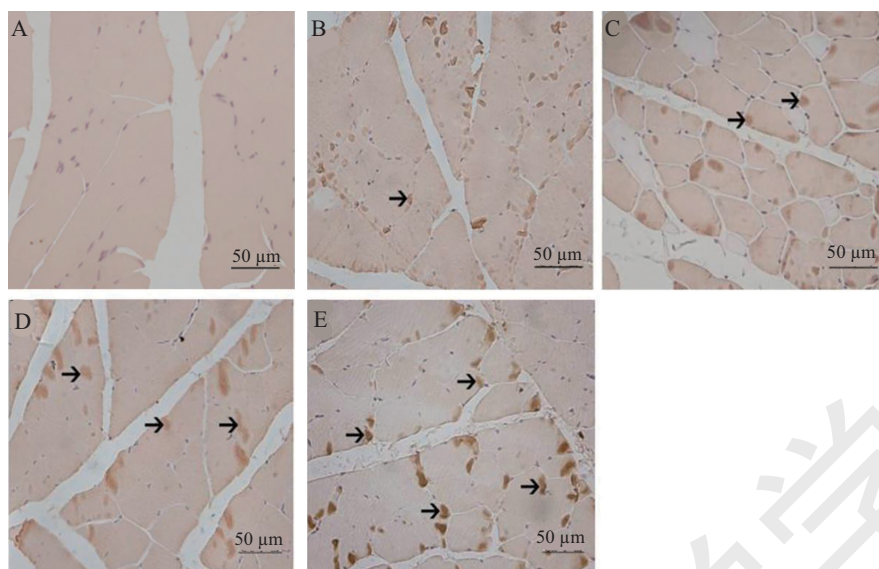
Fig.2 Skeletal muscle fiber diameter comparison



A: 阴性对照组; B: 溶媒对照组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组。箭头表示阳性产物。
 A: negative control group; B: vehicle control group; C: low dose group; D: middle dose group; E: high dose group. Arrows showed positive product.

图3 α-actin在大鼠骨骼肌纤维中分布的免疫组化染色图

Fig.3 The distribution of α-actin in skeletal muscle fiber of rats detected by IHC

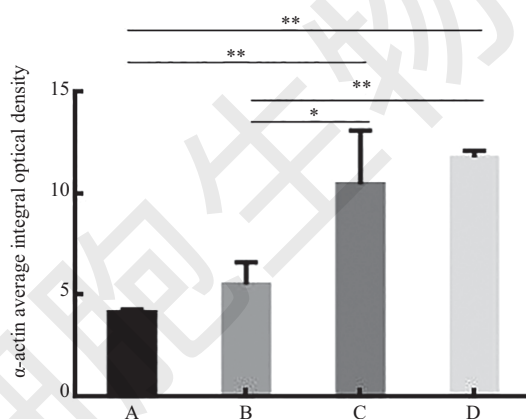


A: 阴性对照组; B: 溶媒对照组; C: 低剂量组; D: 中剂量组; E: 高剂量组。箭头表示阳性产物。

A: negative control group; B: vehicle control group; C: low dose group; D: middle dose group; E: high dose group. Arrows showed positive product.

图4 myosin在大鼠骨骼肌纤维中分布的免疫组化染色图

Fig.4 The IHC of myosin distributing in skeletal muscle fiber of rats

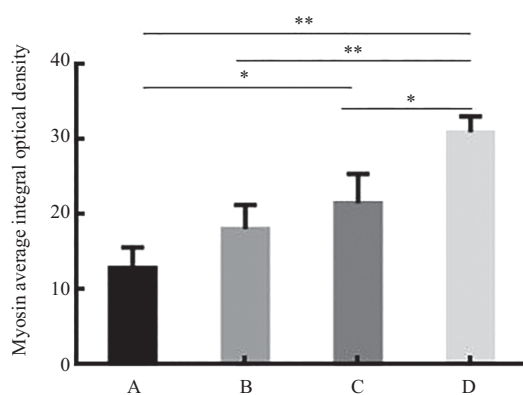


A: 溶媒对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: vehicle control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 α -actin平均积分光密度

Fig.5 The average integral optical density of α -actin

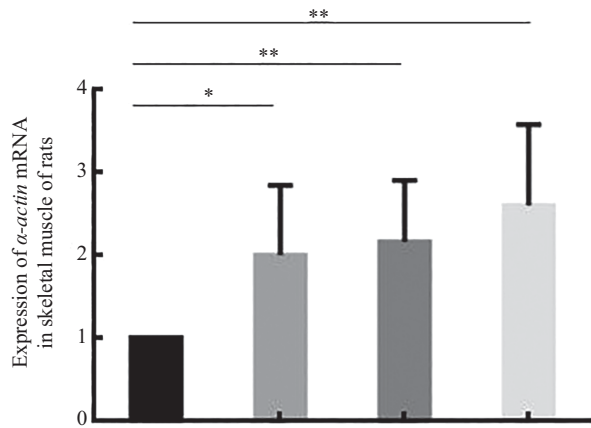


A: 溶媒对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A: vehicle control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 myosin平均积分光密度

Fig.6 The average integral optical density of myosin

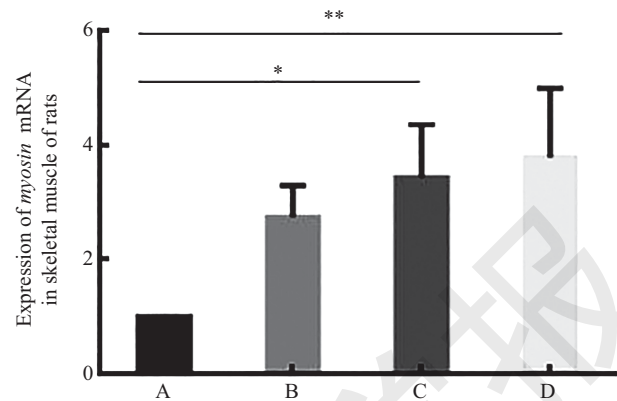


A: 溶媒对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: vehicle control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图7 大鼠骨骼肌 α -actin mRNA表达情况

Fig.7 The expression of α -actin mRNA in skeletal muscle of rats



A: 溶媒对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

A: vehicle control group; B: low dose group; C: middle dose group; D: high dose group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图8 大鼠骨骼肌myosin mRNA表达情况

Fig.8 The expression of myosin mRNA in skeletal muscle of rats

3 讨论

SIF含量占全大豆的0.2%~0.4%，有类似雌激素作用的活性功能，已证实具有抗肿瘤、抗氧化、增强免疫力等一系列保健、美容功效，具有治疗意义和营养学价值。SIF被国际上列为安全有效的天然植物雌激素，受到了越来越多的社会关注^[16-17]。

骨骼肌是哺乳动物体内占比较大的肌肉，并通过肌肉收缩产生运动^[18-20]。其中，最为重要的 α -肌动蛋白和肌球蛋白在骨骼肌中参与并调控着肌肉的收缩运动， α -肌动蛋白还是骨骼肌细丝的主要蛋白质组分。肌球蛋白通过结合肌动蛋白产生肌肉收缩力，因此，它对肌肉收缩以及运动和呼吸至关重要^[21]。陈晓林等^[22]指出，SIF能调控生长轴和性腺轴的神经-内分泌系统来促进动物生长，对雄性具有明显促进作用。有研究表明，SIF可提高血清睾酮水平，睾酮水平与机体的骨骼系统、肌肉增长及脂肪代谢均密切相关，可增加四肢骨骼肌肌量，改善肌肉力量，增加瘦体质量^[23-24]。瘦体质量的增加也可以加强肌肉功能，改善运动状态，SIF也可能是通过睾酮来发挥促进肌肉发育的作用。这与马海田等^[12]研究结果相符。朱泽远等^[25]指出，连续饲喂一定量的SIF之后骨骼肌总RNA含量增加，其中mRNA量的增减在一定程度上也反映了蛋白质合成的增加或减少^[26]。本实验结果中的 α -actin、myosin在肌肉中分布增加，以及2种肌肉收缩蛋白的mRNA核酸水平的增加，与

前人的报道一致。

肌肉质量的维持包含两个不同的方面，一个涉及由于肌原细胞引起的肌核增生在早期增殖和成熟，另一个涉及成熟阶段的肌纤维增粗^[27]。本实验结果中，中、高剂量SIF组大鼠骨骼肌纤维直径显著高于溶媒对照组，表明中、高剂量组的SIF有促进骨骼肌纤维增粗的作用，从形态上使肌肉增大变粗。本实验结果显示， α -actin、myosin表达均显著增加，这可能与加强肌肉收缩功能、改善运动状态密切相关。深入研究SIF对骨骼肌肌纤维增粗的影响，还需要对早期肌原细胞的胞核增生、早期肌原细胞的增殖与成熟、成熟肌纤维相关理化性质等方面做更全面、更深入的检测。同时，SIF影响肌纤维生长发育的具体机制调控还需进一步研究，靶向研究单个因子，如睾酮或者生长轴的生长激素、IGF-1等在其中的调控作用，这可能是一个新方向。

参考文献 (References)

- 冯晓帆, 陈世伟, 张立实. 大豆异黄酮对于肥胖大鼠血脂及瘦素水平的影响. 现代预防医学(Feng Xiaofan, Chen Shiwei, Zhang Lishi. The effect of soy isoflavone on the lever of blood lipid and leptin of the obese rats. Modern Proventive Medicine) 2006; 33(2): 131-2.
- Watanabe S, Uesugi S, Kikuchi Y. Isoflavones for prevention on of cancer, cardiovascular diseases, gynecological problems and possible immune potentiation. Biomed Pharmacother 2002; 56(6): 302-31.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature 2000; 407(4): 233-41.

- 4 华旭. 大豆异黄酮对肥胖大鼠血脂水平的影响. 四川农业大学 (Hua Xu. The influence of soy isoflavones on obesity rats blood lipid level. Sichuan Agricultural University), 2014.
- 5 刘春龙, 李忠秋, 单安山. 大豆异黄酮在畜牧业生产中的应用及研究进展. 大豆科学(Liu Chunlong, Li Zhongqiu, Shan Anshan. Research progress and application of soybean isoflavone in animal industry. Soybean Science) 2007; 26(6): 955-60.
- 6 冯宪超, 徐幸莲, 周光宏. 蛋白质组学在肉品学中的应用. 食品科学(Feng Xianchao, Xu Xinlian, Zhou Guanghong. Application of proteomics in meat science. Food Science) 2009; 30(5): 273-9.
- 7 Biancone L, Conaldi PG, Toniolo A, Camussi G. *Escherichia coli* porin induces proinflammatory alterations in renal tubular cells. *Exp Nephrol* 1997; 5(4): 330-6.
- 8 Vandekerckhove J, Weber K. At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 1978; 126(4): 783-802.
- 9 Pizzesi G, Lucii L, Lombardi V. The size and the speed of the working stroke of muscle myosin and its dependence on the force. *J Physiol* 2002; 545(1): 145-51.
- 10 胡柏平, 赵咏梅. 运动对骨骼肌肌动蛋白及其基因表达影响的研究. 体育学刊(Hu Boping, Zhao Yongmei. Effects of exercise on α -actin and its gene expression. Journal of Physical Education) 2004; 11(2): 48-50.
- 11 Koshima I, Endo T. Experimental study of vascularized muscle multifunctional analysis of muscle regeneration following denervation. *J Reconstr Microsurg* 1989; 5(3): 225-30.
- 12 马海田, 韩正康, 王国杰, 邹思湘. 异黄酮对雄性大鼠芳香化酶活性及骨骼肌生长的影响. 南京农业大学学报(Ma Haitian, Han Zhengkang, Wang Guojie, Zou Sixiang. Effects of isoflavone on aromatase activity and muscle growth in male rats. Journal of Nanjing Agricultural University) 2005; 28(1): 76-9.
- 13 Anderson J. Effects of phytoestrogens on tissues. *Nutr Res Rev* 1999; 12: 75-116.
- 14 Delclos KB, Bucci TJ, Lomax LG, Latendresse JR, Warbritton A, Weisa CC, *et al.* Effects of dietary genistein exposure during development on male and female CD (Sprague-Dawley) rats. *Reprod Toxicol* 2001; 15(6): 647-63.
- 15 李媛媛, 蔡生力, 刘红. 实时荧光定量PCR检测凡纳滨对虾和罗氏沼虾卵黄蛋白原mRNA在卵巢和胰腺腺中的表达. 水产学报(Li Yuanyuan, Cai Shengli, Liu Hong. Quantitative analysis of vitellogenin mRNA expression in *Litopenaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Fisheries of China) 2012; 36(11): 1667-74.
- 16 Teede HJ, Dalais FS, Kotsopoulos D, Liang YL, Davis S, McGrath BP. Dietary soy has both beneficial and potentially adverse cardiovascular effects: a placebo controlled study in men and postmenopausal women. *J Clin Endocr Metab* 2001; 86(7): 3053-60.
- 17 祝春梅. 大豆异黄酮对大鼠下丘脑-垂体-脾脏ER α 、NGF、IL-2、AR表达的影响. 四川农业大学(Zhu Chunmei. Effect of soybean isoflavone on ER α , NGF, IL2 and AR in hypothalamus-pituitary-spleen of rats. Sichuan Agricultural University), 2008.
- 18 Lieber RL, Ward SR. Skeletal muscle design to meet functional demands. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366: 1466-76.
- 19 Mula J, Lee JD, Liu F, Yang L, Peterson CA. Automated image analysis of skeletal muscle fiber cross-sectional area. *J Appl Physiol* 2013; 114(1): 148-55.
- 20 Kostrominova TY, Reiner DS, Haas RH, Ingermanson R, McDonough PM. Automated methods for the analysis of skeletal muscle fiber size and metabolic type. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013; 306(3): 275-332.
- 21 Nowak KJ, Ravenscroft G, Laing NG. Skeletal muscle α -actin diseases (actinopathies): pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 2013; 125(1): 19-32.
- 22 陈晓林. 大豆异黄酮干预肥胖大鼠睾酮合成与分泌相关因子的研究. 四川农业大学(Chen Xiaolin. Effect of soybean isoflavone on ER α , NGF, IL2 and AR in hypothalamus-pituitary-spleen of rats. Sichuan Agricultural University), 2008.
- 23 Srinivas-Shankar U, Roberts SA, Connolly MJ, O'Connell MD, Adams JE, Oldham JA, *et al.* Effects of testosterone on muscle strength, physical function, body composition, and quality of life in intermediate-frail and frail elderly men: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocr Metab* 2010; 95(2): 639-50.
- 24 洪楷. 睾酮对骨骼系统、肌肉和脂肪的影响. 国际生殖健康(Hong Kai. Effects of testosterone on body composition: bone, muscles and lipid metabolism. Journal of International Reproductive Health) 2011; 30(1): 26-8.
- 25 朱泽远, 周维仁, 乐国伟. 异黄酮植物雌激素对动物生长的影响及其作用机制. 兽药与饲料添加剂(Zhu Zheyuan, Zhou Weiren, Le Guowei. Effect of isoflavone phytoestrogens on animal growth and its mechanism of action. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives) 2003; 8(5): 25-7.
- 26 于新凯, 田野. 周跑台训练对大鼠骨骼肌 α -actin基因表达的影响. 中国运动医学杂志(Yu Xinkai, Tian Ye. Effects of treadmill training for one week on α -actin gene expression of rat skeletal muscle. Chinese Journal of Sports Medicine) 2001; 20(1): 16-18.
- 27 Somik C, Ma K. Circadian clock regulation of skeletal muscle growth and repair. *F1000Res* 2016; 5: 1549.