



母代运动抵抗高脂饮食导致子代小鼠 骨骼肌功能障碍的机制研究

石海旺, 李 婕, 于浩洋, 张福龙, 杨罗丹, 段 锐*

(华南师范大学 体育科学学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的:探究母代运动对子代小鼠长期高脂饮食导致骨骼肌功能障碍的保护效应及其机制。方法:雌性C57BL/6小鼠随机分为对照组(maternal control, M-Con)和运动组(maternal exercise, M-Ex)。M-Ex组小鼠孕前4周及孕期进行跑台运动;M-Con组在孕前及孕期均维持常规生活方式,在M-EX组小鼠训练时置于相同环境。M-Con组和M-Ex组与同龄野生型C57BL/6雄性小鼠交配后获得子代小鼠,子代小鼠正常饲养至3周龄后进行为期12周的高脂饮食(high-fat diet, HFD)干预。通过运动表现检测子代小鼠骨骼肌功能;利用组织化学染色分析子代小鼠骨骼肌纤维横截面积、脂质沉积、纤维化和纤维类型;利用蛋白质印迹(Western blot)检测子代小鼠骨骼肌mTOR、P70s6k、Fbx32、TNF- α 、TNFR1、AMPK和PGC-1 α 的蛋白质表达水平;利用实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测脂质合成相关基因和线粒体生物发生相关基因表达水平。结果:与正常饲养的野生型小鼠(Sham)相比,M-Con组子代小鼠(HFD.Con)长期高脂饮食后,运动表现显著下降,骨骼肌肌指数和纤维横截面积显著降低,骨骼肌脂质合成相关基因表达显著升高,骨骼肌异位脂质沉积与纤维化面积显著增加,血浆TNF- α 水平显著升高,骨骼肌TNF- α 及TNFR1蛋白表达显著上调,骨骼肌线粒体功能障碍,琥珀酸脱氢酶染色阳性纤维数量显著降低,AMPK、PGC-1 α 蛋白表达显著降低。与HFD.Con组相比,M-Ex组子代小鼠(HFD.Ex)骨骼肌AMPK、PGC-1 α 蛋白表达水平显著升高,线粒体生物发生相关基因表达及琥珀酸脱氢酶染色阳性纤维数量显著增加,脂质合成相关基因及TNF- α 和TNFR1蛋白表达水平显著下调,脂质沉积和纤维化面积显著降低,有效抵抗长期高脂饮食导致的骨骼肌功能障碍。结论:母代运动通过激活子代小鼠骨骼肌AMPK-PGC-1 α 信号通路,促进骨骼肌线粒体生物发生,降低子代小鼠长期高脂饮食导致的肥胖和骨骼肌脂质异位沉积,并抑制循环系统TNF- α 水平和骨骼肌TNFR1的蛋白表达,有效缓解子代小鼠肌萎缩和骨骼肌纤维化的发生,保护子代小鼠骨骼肌免受高脂饮食导致的功能障碍。

关键词:母代运动;运动表现;肥胖;高脂饮食;腺苷酸活化蛋白激酶;肿瘤坏死因子

中图分类号:G804.5

文献标识码:A

世界卫生组织将超重和肥胖定义为对健康构成风险的异常或过度脂肪积累(Jebeile et al., 2022)。久坐生活方式和高脂肪、精制碳水化合物饮食导致儿童青少年肥胖发生率急剧上升(Jia et al., 2023)。研究表明,1975—2016年,全球5~19岁儿童青少年肥胖患病率增加约7倍,女孩肥胖患病率达到5.6%,男孩肥胖患病率达到7.8%(Collaboration, 2017)。而在我国,截至2019年,6~17岁儿童青少年超重和肥胖患病率分别达到11.1%和7.9%(Pan et al., 2021)。

导致儿童肥胖的诱因很多,包括出生体重、父母身体质量指数、饮食习惯、身体活动水平和睡眠等(梁果等, 2023)。临床研究表明,肥胖诱导的异位脂质沉积导致骨骼肌功能障碍,包括胰岛素抵抗、氧化应激和炎症浸润,最终使儿童青少年身体活动水平下降(Dong et al., 2019),而

这与代谢性疾病发生风险和全因死亡率的增加密切相关(Kodama et al., 2009)。目前,关于儿童青少年肥胖症的治疗主要是基于家庭的肥胖行为干预措施,即以行为改变策略为基础,协调解决饮食、体育活动、久坐行为和睡眠问题(Jebeile et al., 2022)。但由于电子游戏设备的数量增多,屏幕暴露时间延长带来无意识饮食增加,加剧了儿童青少年的热量摄入和久坐行为,减少了身体活动时间和睡眠时间,因此治疗效果甚微(Robinson et al., 2017)。

收稿日期:2023-11-27; 修订日期:2024-02-02

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31971096)。

第一作者简介:石海旺(1995-),男,在读博士研究生,主要研究方向为运动代际遗传效应,E-mail:2020010070@m.scnu.edu.cn。

*通信作者简介:段锐(1975-),男,教授,博士,博士研究生导师,主要研究方向为运动代际遗传效应、运动与骨骼肌再生修复,E-mail:duanrui@m.scnu.edu.cn。

研究表明,母代规律的孕期运动对子代健康具有长期的积极效应(石海旺等, 2022; Kusuyama et al., 2020)。母代运动通过促进胎盘维生素D受体(vitamin D receptor, VDR)介导的超氧化物歧化酶3(superoxide dismutase 3, SOD3)的表达和分泌,激活胎儿肝脏腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)—异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, IDH)—十一-十一异位转移酶(ten-eleven translocation protein, TET)信号通路,提高后代肝脏糖脂代谢相关基因的表达(Kusuyama et al., 2021)。此外,棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)是机体产热耗能的重要器官,母代运动通过促进骨骼肌爱帕琳肽(Apelin, APLN)合成和分泌增加,上调子代PR结构域蛋白16(the positive regulatory domain containing 16, PRDM16)基因启动子区域去甲基化水平,增强BAT生成和白色脂肪(white adipose tissue, WAT)向棕(米)色脂肪转化(Son et al., 2020b)。然而,母代运动是否可以改善由于子代肥胖导致的骨骼肌功能障碍仍需进一步研究。本研究分别对对照组与运动组母鼠的子代小鼠进行长期高脂饮食喂养,发现母代小鼠运动促进子代小鼠骨骼肌线粒体生物发生和蛋白质合成,有效抑制骨骼肌中异位脂质沉积和炎症浸润导致的骨骼肌纤维化,降低子代小鼠由于长期高脂饮食导致的骨骼肌功能障碍。

1 研究对象与方法

1.1 动物分组与运动干预方案

健康雌性4周龄C57BL/6小鼠购自广东省医学实验

动物中心[合格证号:SCXK(粤)2016-0041]。动物分笼饲养,自由饮食饮水,环境温度为22~24℃,相对空气湿度为40%~70%,光照时间为12 h/d。小鼠适应性喂养1周后,随机分为母代对照组(maternal control, M-Con)和母代运动组(maternal exercise, M-Ex)。其中, M-Ex组小鼠在孕前和孕期进行跑台训练。孕前正式训练前,以10 m/min的速度进行1周的跑台适应性训练,每天运动20 min,隔天训练以适应跑台环境。正式训练为期4周,第一周以18 m/min的速度开始训练,每周增加2 m/min直至速度增加到24 m/min,小鼠每天训练50 min,每周训练6 d。每天的训练方案如下:5 m/min,热身5 min;18 m/min(20、22、24 m/min),训练40 min;5 m/min,放松5 min。然后, M-Con组和M-Ex组小鼠分别与同龄野生型雄性小鼠交配,通过阴道栓塞确定小鼠成功受孕。M-Ex组小鼠孕期进行强度递减的跑台训练(跑台速度以24 m/min开始,每天降低1 m/min)至孕期18~19 d(Kusuyama et al., 2021; Son et al., 2020b)。实验周期内, M-Con组置于与M-Ex组相同跑台但不进行运动训练,以排除环境影响。

在子代小鼠出生后3周龄时,各组随机选取雌性和雄性小鼠各5只进行12周的高脂饮食喂养,检测M-Con组子代小鼠(HFD.Con)与M-Ex组子代小鼠(HFD.Ex)的运动表现后取材进行指标检测。本研究所有实验程序和动物护理均经华南师范大学动物伦理使用委员会批准(批准编号:SCNU-SPT-2022-015),实验方案如图1所示。

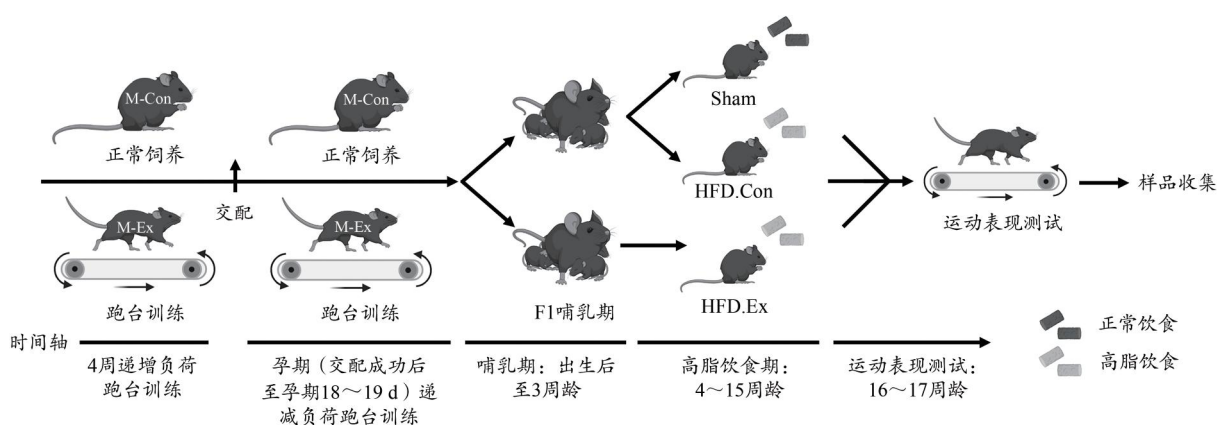


图1 实验方案

Figure 1. Schematic Overview of Experimental Design

1.2 骨骼肌功能测试

1.2.1 骨骼肌耐力测试

通过跑台测试子代小鼠的最大跑步距离和力竭时间。小鼠首先在跑台上进行5 m/min的适应性运动5 min,然后以10 m/min的速度运动,40 min后,以每10 min增加1 m/min的速度运动30 min,然后以每5 min增加

1 m/min的速度继续运动至力竭,力竭判定标准为小鼠在跑台后部连续停留30 s或对外部刺激不敏感,分别记录小鼠的最大跑步距离和力竭时间(Ferreira et al., 2007)。

1.2.2 最大跑步速度测试

通过跑台运动测试子代小鼠的最大跑步速度。小鼠

首先在跑台上以5 m/min的速度适应性运动5 min,然后每3 min速度增加3 m/min,当速度达到28 m/min后,每1 min速度增加1 m/min至小鼠无法继续运动,记录小鼠上一速度为其最大跑步速度(Song et al., 2022)。

1.2.3 小鼠前肢握力测试

使用小动物数字握力测试计(Elecall Instruments, ELK-50)测量子代小鼠的前肢握力。待小鼠双侧前肢紧握抓力盘后,测试人员手持小鼠尾部向反方向缓慢匀速拉动,连续测试5次,记录最大握力值(N)与体重(g)进行标准化处理(Son et al., 2019)。

1.3 取材与指标检测

1.3.1 空腹血糖与血浆TNF- α 含量测试

子代小鼠禁食15 h后,使用灭菌剪刀在小鼠尾尖采集血样,通过血糖测试仪(江苏鱼跃生物科技, BGM580)测量小鼠空腹血糖水平。异氟烷吸入式麻醉小鼠后,眼眶取血收集小鼠血液样品,常温静置30 min后,使用低温离心机以3 500 r/min离心15 min后提取血浆。使用小鼠TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒(江莱生物技术有限公司, JL10484)和I-Mark酶标仪(Bio-Rad, 19684)(波长450 nm)检测小鼠血浆TNF- α 水平。

1.3.2 骨骼肌组织样本采集与处理

子代小鼠血液样品采集完成后,使其过量吸入异氟烷麻醉,以仰卧位固定于小鼠解剖台,打开腹腔使用预冷0.9%生理盐水进行灌流,分离小鼠左侧股四头肌、腓肠肌和胫骨前肌,滤纸吸干水分后迅速称重。然后,将小鼠股四头肌和腓肠肌组织样品置于液氮中,用于后续检测相关蛋白质和基因表达。胫骨前肌使用黄芪胶包埋后经液氮预冷的异戊烷进行梯度降温,冻存于-80℃冰箱,用于后续冰冻切片和免疫组织化学染色实验。

1.3.3 蛋白质印迹(Western blot)

称取小鼠股四头肌组织100 mg,加入1 mL含有蛋白酶/磷酸化蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,使用全自动组织匀浆仪(上海净信生物科技公司, JXFSTPRP-64)匀浆后,冰上静置5~10 min, 12 000 r/min离心15 min,分离蛋白上清液。利用BCA法进行蛋白质定量分析,并调整蛋白浓度。取适量蛋白上清加入5 \times SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(碧云天生物技术公司, P0015L)制备电泳样品。根据靶蛋白分子量配置8%~12% SDS聚丙烯酰胺凝胶,垂直电泳分离蛋白,使用湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)。PBS配制5%脱脂牛奶室温封闭1.5~2.0 h,经PBST冲洗后,4℃过夜孵育一抗抗体(Shi et al., 2023)。本研究使用抗体信息及稀释比例如下:mTOR(CST, 2972, 1:1 000)、p-mTOR(CST, 2971, 1:1 000)、Fbx32(Abcam, ab168372, 1:1 000)、TNF- α (CST, 3707, 1:1 000)、TNFR1(CST, 3736, 1:1 000)、AMPK(CST, 2532, 1:1 000)、p-AMPK^{Thr172}(CST, 2531,

1:1 000)、PGC-1 α (Proteintech, 66369-A-Ig, 1:4 000)、P70s6k(CST, 9202, 1:1 000)、p-P70s6k^{Thr389}(CST, 9234, 1:1 000)、 α -Tubulin(碧云天生物技术公司, AF2827, 1:500)、 β -Actin(Santa Cruz, SC-47778, 1:500)。次日复温后使用PBST洗膜3次,每次10 min。室温孵育辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗(碧云天生物技术公司, A0208, 1:10 000)1 h, PBST洗膜后使用增强型化学发光试剂(Cowin Bio, CW0049)和ChemiDoc Touch Imaging System(Bio-rad, 732BR2244)显影,通过Image Lab(Biorad 3.0)和Image J软件进行数据采集和分析。

1.3.4 实时荧光定量PCR(RT-PCR)

称取100 mg腓肠肌组织加入1 mL RNAiso Plus试剂(Takara, 9109)匀浆,分离上清后加入200 μ L氯仿充分混匀,室温静置5 min, 4℃以12 000 r/min离心10 min提取上清,加入600 μ L异丙醇轻柔混匀,室温静置10 min, 4℃以12 000 r/min离心10 min后弃上清,加入预冷75%乙醇1 mL清洗沉淀,4℃以7 500 r/min离心5 min后弃上清,打开EP管静置干燥RNA 15 min,加适量DEPC水充分溶解沉淀,随后测量RNA浓度。使用PrimeScript TM RT试剂盒(Takara, RR047A)进行去除基因组DNA和反转录反应得到cDNA,通过TB-Green Premix Ex Taq(Takara, RR420A)进行定量RT-PCR,以18s rRNA为内参基因,通过(2^{- $\Delta\Delta$ Ct})计算相对mRNA表达。本研究所用RT-PCR引物如表1所示,基因组位置及产物长度均通过UCSC In-Silico网站(<http://systemsbiology.cau.edu.cn/cgi-bin/hgPcr>)查询。

1.3.5 线粒体DNA含量检测

通过RT-PCR测量NADH脱氢酶亚基1(Nd1, For: 5'-CACTATTTCGGAGCTTTACG-3', Rev: 5'-TGTTTCTGCTAGGGTTGA-3')的基因表达表征线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)的拷贝数,通过核DNA脂蛋白脂肪酶(Lpl, For: 5'-GAAAGGGCTCTGCCTGAGTT-3', Rev: 5'-TAGGGCATCTGAGAGCGAGT-3')的基因表达表征基因组DNA,以Nd1与Lpl的比值表征mtDNA含量(Son et al., 2020a)。

1.3.6 免疫组织化学染色

制备小鼠胫骨前肌组织冰冻切片(8~10 μ m)并分别进行:1)苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, HE)染色观察小鼠骨骼肌组织形态学特征,并测量骨骼肌纤维横截面积;2)油红O(oil red)染色统计小鼠骨骼肌脂质异位沉积面积;3)天狼猩红(picrosirius red)染色测量小鼠骨骼肌组织纤维化区域面积;4)琥珀酸脱氢酶染色(succinate dehydrogenase staining, SDH)统计小鼠骨骼肌氧化型肌纤维占比。骨骼肌免疫组织化学染色结果均使用Image J软件进行数据采集和分析。

1.4 统计学分析

实验数据均以平均值±标准误($M \pm SEM$)表示,使用SPSS 23和GraphPad Prism 8.3软件进行统计分析和作图。小鼠体重增长趋势、摄食量、骨骼肌纤维横截面积频域分

布均采用双因素方差(two-way ANOVA)结合Tukey事后检验进行组间统计学比较,最大跑步速度采用Log-rank秩序检验,其他组间统计均使用单因素方差(one-way ANOVA)结合Bonferroni事后检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

表1 引物列表

Table 1 Primer Sequence of Target Genes

基因名称	5'-3'	引物序列	基因组位置	产物长度/bp
<i>Cebpa</i>	For	TTCGGGTCGCTGGATCTCTA	Chr7: 35120558-35120721	164
	Rev	TCAAGGAGAAACCACCACGG		
<i>Fabp4</i>	For	GGATTGGTCACCATCCGGT	Chr 3: 10205246-10206055	203
	Rev	CCAGCTTGTCACCATCTCGT		
<i>Adipoq</i>	For	ATCTGGAGGTGGGAGACCAA	Chr 16: 231574700-23157613	144
	Rev	GGGCTATGGGTAGTTGCACT		
<i>Nrf1</i>	For	GCACCTTTGGAGAATGTGGT	Chr 6: 30089923-30144621	165
	Rev	CTGAGCCTGGGTCAATTTGT		
<i>Nrf2</i>	For	GCCCTCAGCATGATGGACTT	Chr 2: 75505860-75535007	110
	Rev	AACTTGTACCGCCTCGTCTG		
<i>Cox7a1</i>	For	CAGCGTCATGGTCAGTCTGT	Chr 7: 30185135-30185349	112
	Rev	AGAAAACCGTGTGGCAGAGA		
<i>Ppargc1a</i>	For	CCATACACAACCGCAGTCGC	Chr 5: 51611591-52273316	168
	Rev	GTGGGAGGAGTTAGGCCTGC		
<i>Tfam</i>	For	CCAAAAAGACCTCGTTCAGC	Chr 10: 71061298-71074157	211
	Rev	CTTCAGCCATCTGCTCTTCC		
<i>Tfb1m</i>	For	CACCGAGGGCTTGAATGTT	Chr 17: 3569119-3608064	257
	Rev	TAGAACCCGCAGCTTTCTGG		
<i>Tfb2m</i>	For	TAAAGCTGGTGCCAGAGTGG	Chr 12: 48602720-48602939	220
	Rev	AGGAACACCTGCTGACCAAG		
<i>18s</i>	For	GTAACCCGTTGAACCCATT	Chr 17: 40158827-40158977	151
	Rev	CCATCCAATCGGTAGTAGCG		

2 结果

2.1 母代运动抑制子代小鼠高脂饮食导致的脂肪积累

为了阐明母代运动对子代小鼠长期高脂饮食干预的保护作用,研究记录了高脂饮食期间HFD.Con组及HFD.Ex组小鼠的体重增长趋势和摄食量。如图2a所示,与Sham组(普通饲料喂养的野生型同齡小鼠)相比,长期高脂饮食显著促进了HFD.Con组及HFD.Ex组小鼠的体重增长。其中,HFD.Con组雄性小鼠在高脂喂养5周后体重显著高于Sham组,HFD.Ex组雄性小鼠在高脂饮食9周后体重显著增加,并在高脂饮食期间体重始终低于HFD.Con组。HFD.Con组雌性小鼠在高脂饮食2周后体重显著高于Sham组和HFD.Ex组,并持续至高脂饮食结束,而HFD.Ex组雌性小鼠与Sham组体重增长趋势无差异,表明母代运动可以改善子代小鼠高脂饮食导致的肥胖进程,并且可能具有性别差异。此外,我们记录了子代小鼠的食物摄入量,发现HFD.Con组与HFD.Ex组摄食量无显著差异(图2b)。

检测子代小鼠腹腔脂肪指数发现,与Sham组雄性小鼠相比,HFD.Con组与HFD.Ex组雄性小鼠分别增加

267.9% ($P < 0.001$)和136.5% ($P < 0.01$);与Sham组雌性小鼠相比,HFD.Con组与HFD.Ex组雌性小鼠分别增加262.8% ($P < 0.001$)和152.5% ($P < 0.01$)。此外,与HFD.Con组相比,HFD.Ex组雄性和雌性小鼠腹腔脂肪指数分别降低35.7% ($P < 0.01$)和30.4% ($P < 0.05$)(图2c)。

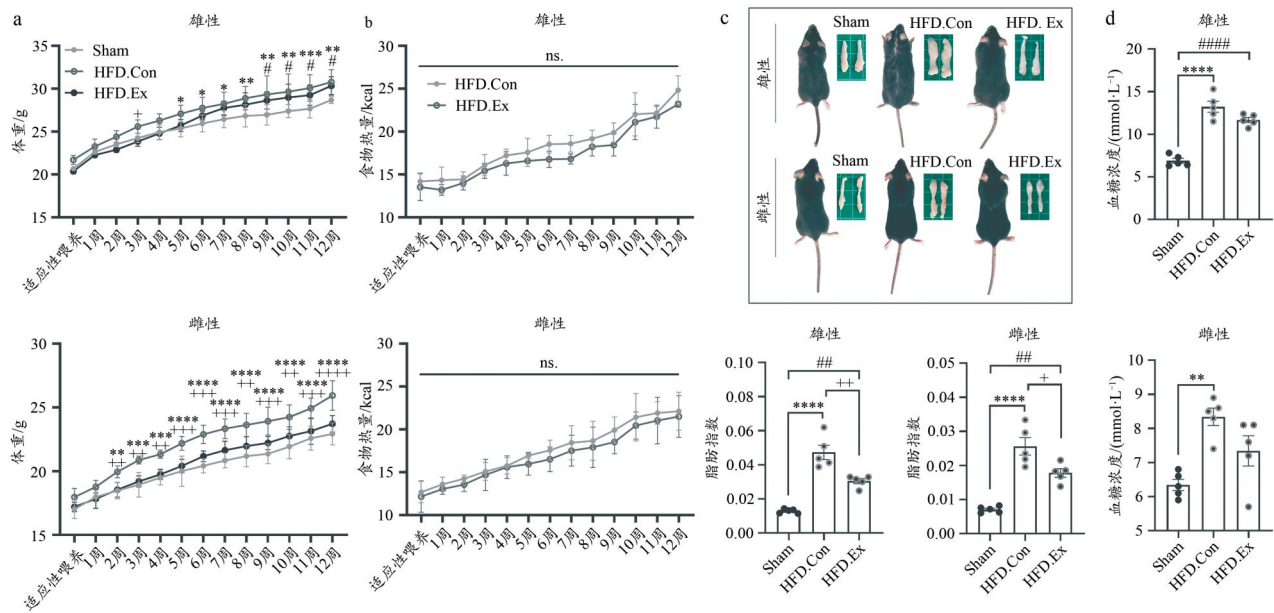
异常空腹血糖水平(impaired fasting glucose, IFG)是代谢综合征前期的重要表征指标(Rooney et al., 2023)。禁食15 h后通过采集小鼠尾尖血液测量空腹血糖结果显示,小鼠长期高脂饮食导致空腹血糖水平显著升高。其中,与Sham组雄性小鼠相比,HFD.Con组雄性小鼠空腹血糖升高92.2% ($P < 0.0001$),HFD.Ex组雄性小鼠升高69.5% ($P < 0.0001$);与Sham组雌性小鼠相比,HFD.Con组雌性小鼠升高31.5% ($P < 0.01$),HFD.Ex组雌性小鼠无显著性差异($P > 0.05$,图2d)。

2.2 母代运动显著降低高脂饮食导致的子代小鼠骨骼肌功能障碍

运动表现测试结果显示,长期高脂饮食导致子代小鼠最大跑步距离(图3a)、力竭时间(图3b)、前肢最大握力

(图3c)及最大跑步速度(图3d)均出现不同程度下降。其中,与Sham组相比,HFD.Con组雄性小鼠最大跑步距离、力竭时间、前肢握力及最大跑步速度分别下降33.0%($P<0.01$)、20.1%($P<0.01$)、17.9%($P<0.001$)及34.5%($P<0.05$),HFD.Con组雌性小鼠分别下降31.1%($P<0.001$)、18.8%($P<0.001$)、19.1%($P<0.001$)及13.5%($P<0.05$)。HFD.Ex组雄性和雌性小鼠上述指标与Sham组相比虽有

下降趋势,但均无统计学意义。此外,HFD.Ex组小鼠与HFD.Con组小鼠相比,雄性小鼠最大跑步距离、力竭时间、前肢握力、最大跑步速度分别提高32.4%($P<0.05$)、18.0%($P<0.05$)、13.4%($P<0.05$)和31.6%($P<0.05$);雌性小鼠分别提高24.0%($P<0.05$)、13.0%($P<0.05$)、15.3%($P<0.01$)和9.3%($P<0.05$)。综上所述,母代运动显著降低长期高脂饮食导致的子代小鼠骨骼肌功能障碍。



a. 长期高脂饮食对子代小鼠体重的影响;b. HFD.Con组与HFD.Ex组小鼠食物摄入量;c. 小鼠腹腔脂肪示意图及腹腔脂肪指数;d. 小鼠空腹血糖水平。各组雄性、雌性小鼠 $n=5$ 。*表示Sham组与HFD.Con组间的比较,#表示Sham组与HFD.Ex组间的比较,+表示HFD.Con组与HFD.Ex组间的比较;* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$,ns.表示无显著性差异;#和+的显著性差异同*下同。

图2 母代运动对子代小鼠长期高脂饮食体重增长及空腹血糖的影响

Figure 2. Effect of Maternal Exercise on Obesity and Fasting Glucose in Offspring under High Fat Diet

2.3 母代运动缓解子代小鼠高脂饮食导致的骨骼肌萎缩

12周高脂饮食干预结束后,与Sham组相比,HFD.Con组雄性小鼠胫骨前肌(图4a)、腓肠肌(图4b)和股四头肌(图4c)肌指数分别下降29.1%($P<0.0001$)、20.3%($P<0.0001$)和20.2%($P<0.001$),雌性小鼠分别下降10.1%($P<0.05$)、9.5%($P<0.01$)和12.6%($P<0.01$)。与Sham组相比,HFD.Ex组雄性小鼠胫骨前肌、腓肠肌和股四头肌肌指数分别下降10.9%($P<0.05$)、8.9%($P<0.05$)和11.7%($P<0.05$),而雌性小鼠与Sham组相比均无显著差异。与HFD.Con组相比,HFD.Ex组雄性小鼠胫骨前肌和腓肠肌肌指数分别升高25.7%($P<0.01$)和14.2%($P<0.01$),股四头肌肌指数无显著差异,雌性小鼠胫骨前肌、腓肠肌和股四头肌肌指数分别升高11.8%($P<0.05$)、10.5%($P<0.01$)和10.1%($P<0.05$)。

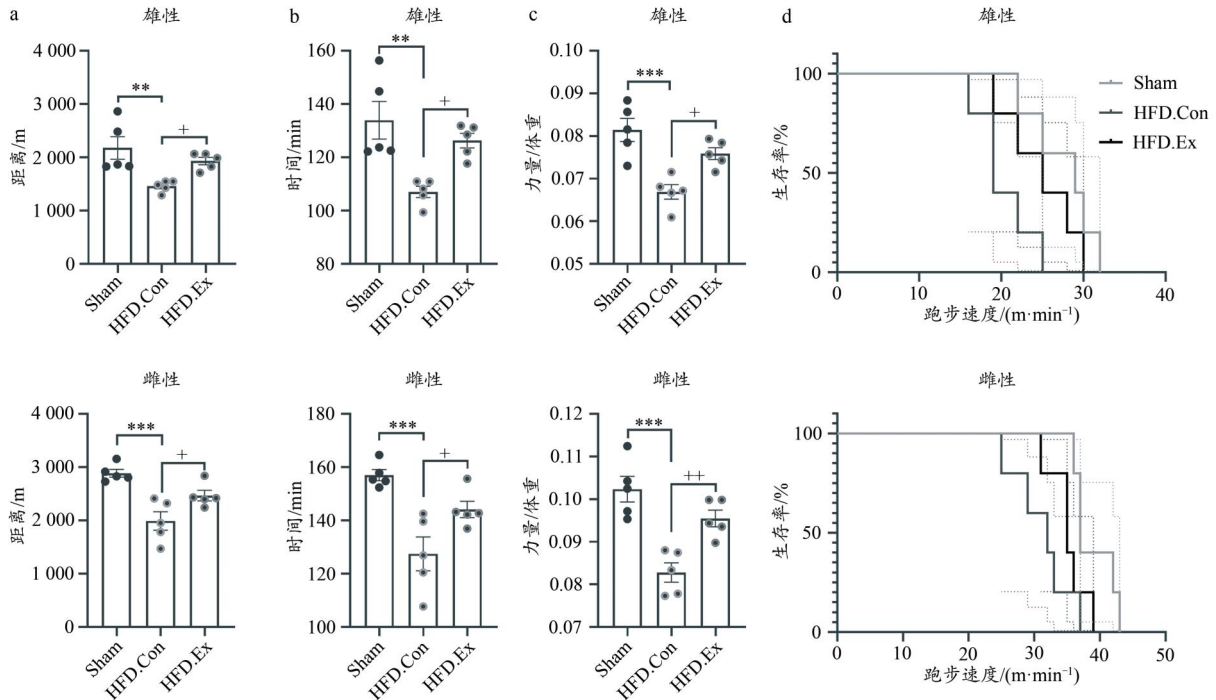
小鼠胫骨前肌HE染色结果显示,高脂饮食导致HFD.Con组小鼠骨骼肌细胞核部分外溢,骨骼肌纤维间隙增加、排列破坏(如图4d中黑色箭头所示)。与HFD.Con组相比,HFD.Ex组骨骼肌细胞形态、骨骼肌纤维间隙和细

胞核外溢情况均有所改善。骨骼肌纤维横截面积统计结果显示(图4e、4f),与Sham组相比,HFD.Con组胫骨前肌平均纤维横截面积显著下降,其中雄性小鼠降低26.8%($P<0.01$),雌性小鼠降低26.0%($P<0.001$),子代小鼠纤维横截面积均集中于 $1\ 000\sim 2\ 000\ \mu\text{m}^2$ 之间。HFD.Ex组与Sham组相比无显著差异,与HFD.Con组相比,雄性和雌性小鼠平均纤维横截面积分别增加23.3%($P<0.05$)和24.1%($P<0.01$),子代小鼠纤维横截面积均集中于 $2\ 000\sim 3\ 000\ \mu\text{m}^2$ 之间。

骨骼肌质量取决于骨骼肌蛋白质合成与降解之间的动态平衡(Sartori et al., 2021)。本研究利用Western blot检测了骨骼肌蛋白质合成标志物mTOR及其下游P70s6k的蛋白质磷酸化水平,以及骨骼肌蛋白质降解标志物Fbx32的表达水平,以探究母代运动对子代小鼠骨骼肌蛋白质合成和降解的影响。实验结果显示(图5),与Sham组相比,长期高脂饮食导致HFD.Con组小鼠骨骼肌mTOR(雄性: $P<0.05$,雌性: $P<0.01$)及P70s6k(雄性: $P<0.01$,雌性: $P<0.05$)蛋白质磷酸化水平显著降低。同时,肌萎

缩标志物 Fbx32 的蛋白表达显著增加(雄性: $P < 0.001$, 雌性: $P < 0.05$)。HFD.Ex 组 mTOR 及 P70s6k 蛋白质磷酸化水平及 Fbx32 表达水平与 Sham 组相比均无显著差异, 而与 HFD.Con 组相比, mTOR (雄性: $P < 0.05$, 雌性: $P < 0.01$) 及 P70s6k (雄性: $P < 0.001$, 雌性: $P < 0.01$) 蛋白质磷

酸化水平显著升高, Fbx32 表达显著降低(雄性: $P < 0.01$, 雌性: $P < 0.001$)。上述实验结果表明, 母代运动抵抗子代小鼠长期高脂饮食导致的骨骼肌蛋白质合成能力下降, 延缓骨骼肌萎缩进程。



a. 小鼠最大跑步距离; b. 小鼠力竭时间; c. 小鼠前肢最大握力; d. 小鼠最大跑步速度。

图3 母代运动降低长期高脂饮食导致的子代小鼠骨骼肌功能障碍

Figure 3. Maternal Exercise Protects Offspring from High Fat Diet Induced Skeletal Muscle Dysfunction

2.4 母代运动降低子代小鼠高脂饮食导致的脂肪异位沉积和骨骼肌纤维化

油红O染色结果显示, 与Sham组相比, HFD.Con组雄性与雌性小鼠胫骨前肌脂质沉积面积均显著增加(雄性: $P < 0.0001$, 雌性: $P < 0.0001$), 而HFD.Ex组雄性与雌性小鼠脂质沉积面积虽显著高于Sham组(雄性: $P < 0.0001$, 雌性: $P < 0.0001$), 但与HFD.Con组相比, 雄性和雌性小鼠脂质沉积面积分别降低48.6% ($P < 0.0001$) 和56.0% ($P < 0.0001$) (图6a、6b)。此外, RT-PCR检测骨骼肌中脂质合成相关基因 *Cebpa*、*Fabp4* 和 *Adipoq* 的表达结果显示(图6c), HFD.Con组与Sham组相比, 雄性和雌性小鼠 *Cebpa* (雄性: $P < 0.001$, 雌性 $P < 0.01$)、*Fabp4* (雄性: $P < 0.01$, 雌性 $P < 0.001$) 和 *Adipoq* (雄性: $P < 0.001$, 雌性 $P < 0.01$) 的基因表达均显著升高。HFD.Ex组与Sham组相比无显著差异; 与HFD.Con组相比, 雄性和雌性小鼠 *Cebpa* (雄性: $P < 0.01$, 雌性 $P < 0.01$)、*Fabp4* (雄性: $P < 0.01$, 雌性 $P < 0.001$) 和 *Adipoq* (雄性: $P < 0.001$, 雌性 $P < 0.01$) 的基因表达显著降低。

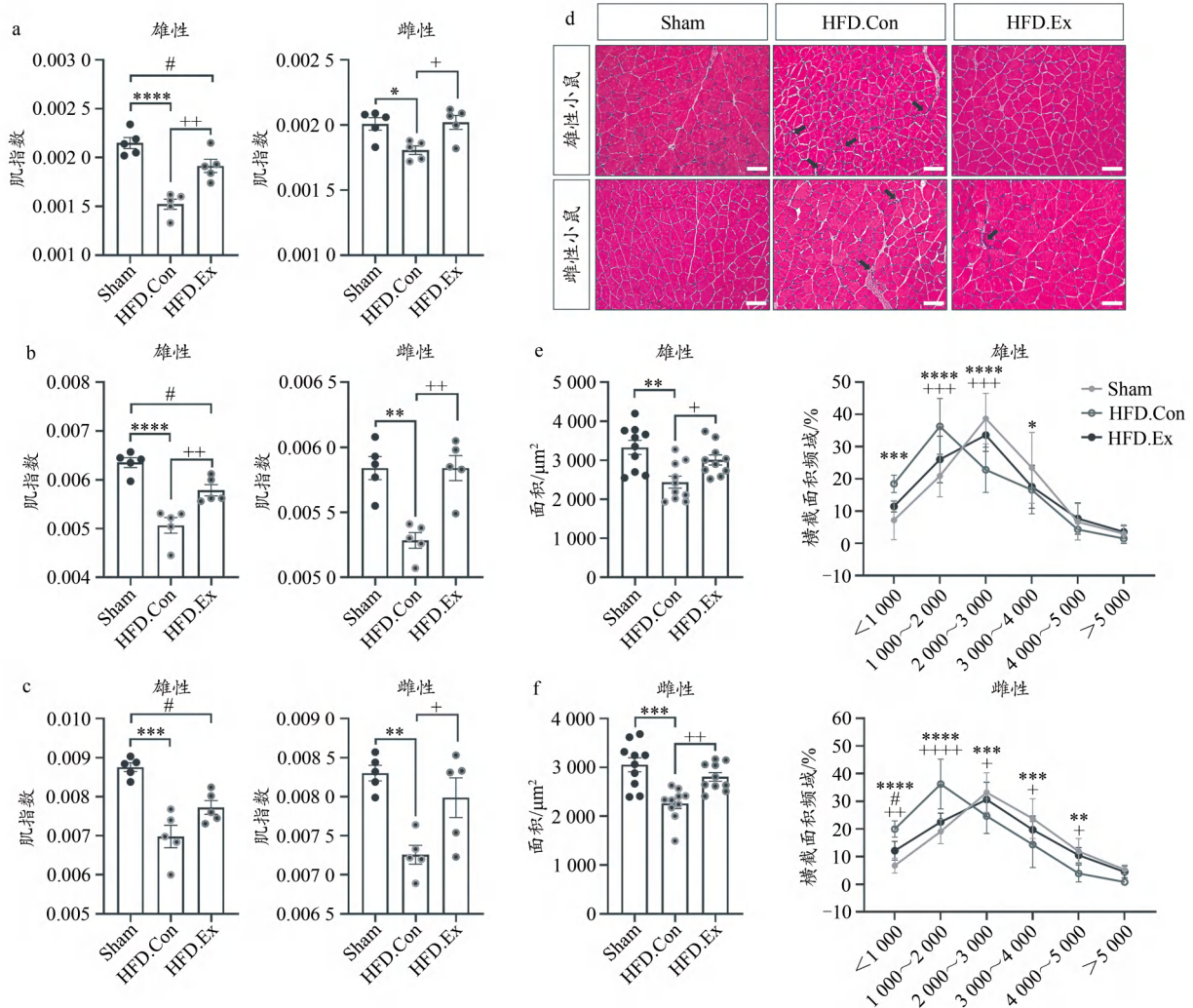
脂肪组织导致的慢性低度炎症是肥胖患者代谢疾病

和器官组织并发症的潜在原因(Kawai et al., 2021), 为了进一步探究母代运动对子代小鼠骨骼肌的保护作用, 我们检测了子代小鼠血浆中TNF- α 的含量。结果显示, 与Sham组相比, HFD.Con组雄性和雌性小鼠血浆TNF- α 含量分别升高38.2% ($P < 0.01$) 和36.1% ($P < 0.001$); HFD.Ex组雄性和雌性小鼠与Sham组相比均无显著差异, 但与HFD.Con组雌性小鼠相比, HFD.Ex组雌性小鼠血浆TNF- α 含量降低19.8% ($P < 0.01$) (图6d)。此外, 我们通过Western blot检测了长期高脂饮食对子代小鼠骨骼肌TNF- α 及其受体TNFR1表达水平的影响(图6e)。结果显示, 与Sham组相比, HFD.Con组雄性小鼠骨骼肌TNF- α 及其受体TNFR1蛋白表达分别升高22.1% ($P < 0.0001$) 和32.1% ($P < 0.001$), 雌性小鼠蛋白表达分别升高23.1% ($P < 0.01$) 和23.3% ($P < 0.05$)。HFD.Ex组雄性小鼠与Sham组相比无显著差异, 雌性小鼠与Sham组相比TNF- α 及其受体TNFR1蛋白表达分别降低40.1% ($P < 0.001$) 和62.4% ($P < 0.001$)。HFD.Ex组雄性小鼠与HFD.Con组相比, TNF- α 及其受体TNFR1蛋白表达分别降低24.5% ($P < 0.0001$) 和32.3% ($P < 0.001$), 雌性小鼠分别降低53.9%

($P < 0.0001$)和71.2%($P < 0.0001$)。

炎症浸润是导致骨骼肌纤维化和功能障碍的主要原因(van den Hoek et al., 2021),天狼猩红染色结果显示,长期高脂饮食导致子代小鼠骨骼肌纤维化面积显著增加(图6f,黑色虚线),而HFD.Ex组纤维化程度与HFD.Con组相比有所改善。统计纤维化面积发现,与Sham组相比,HFD.Con组雄性和雌性小鼠纤维化面积分别增加274.4%

($P < 0.0001$)和250.1%($P < 0.0001$),HFD.Ex组雄性和雌性小鼠纤维化面积分别增加84.1%($P < 0.05$)和85.7%($P < 0.05$)。HFD.Ex组与HFD.Con组相比,雄性和雌性小鼠纤维化面积分别减少50.8%($P < 0.0001$)和46.6%($P < 0.0001$)(图6g)。这些数据表明,母体运动可显著降低子代小鼠长期高脂饮食导致的骨骼肌脂质沉积和炎症浸润,改善骨骼肌纤维化。



a. 小鼠胫骨前肌肌指数;b. 小鼠腓肠肌肌指数;c. 小鼠股四头肌肌指数;d. 小鼠胫骨前肌HE染色示意图,比例尺=200 μm;e. 雄性小鼠胫骨前肌平均纤维横截面积及纤维横截面积频域分布;f. 雌性小鼠胫骨前肌平均纤维横截面积及纤维横截面积频域分布。

图4 母代运动抵抗子代小鼠高脂饮食导致的骨骼肌萎缩

Figure 4. Maternal Exercise Againsts Offspring from High Fat Diet Induced Muscle Atrophy

注:HE染色中每个样品随机选取2个视野进行面积统计,油红O染色、天狼猩红染色及琥珀酸脱氢酶染色同。

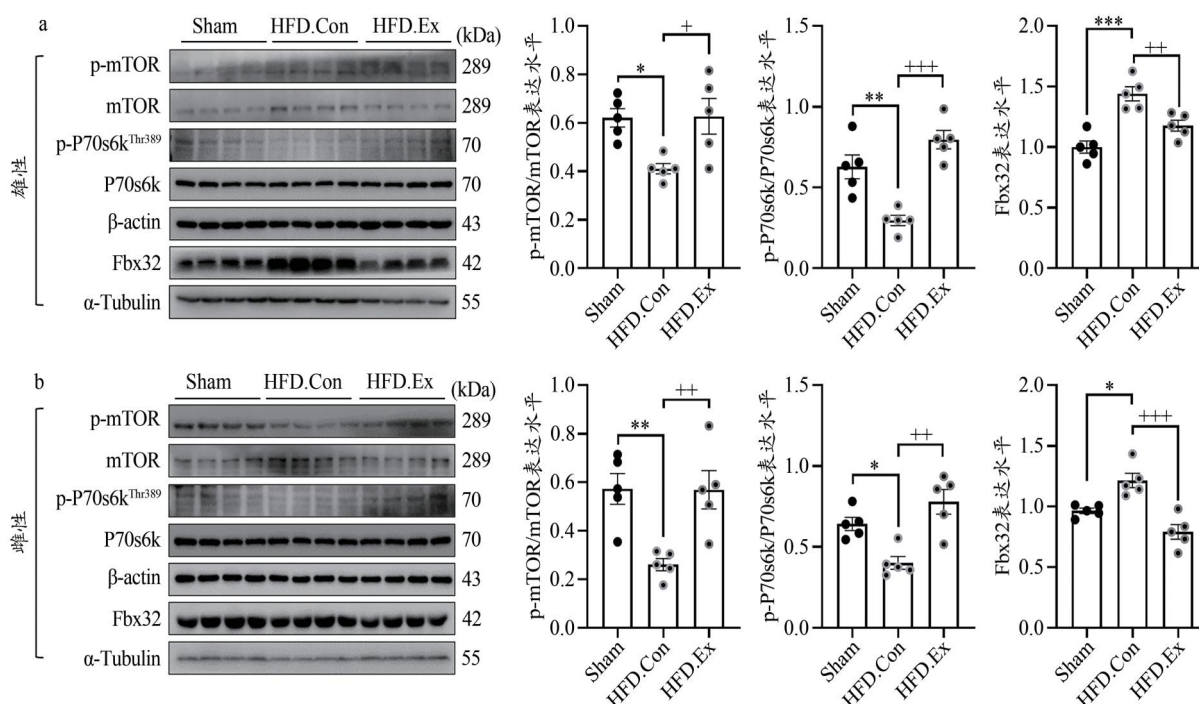
2.5 母代运动提高子代小鼠骨骼肌线粒体生物发生和氧化磷酸化

线粒体功能障碍是肥胖导致骨骼肌萎缩和纤维化的共同致病机制(Deng et al., 2021)。RT-PCR检测mtDNA拷贝数和线粒体呼吸链相关基因的表达,结果显示,与Sham组相比,HFD.Con组雄性mtDNA拷贝数降低41.2%($P < 0.01$),雌性无显著差异,HFD.Ex组雄性和雌性小鼠mtDNA拷贝数分别升高54.8%($P < 0.001$)和73.8%($P <$

0.0001)。与HFD.Con组相比,HFD.Ex组雄性和雌性小鼠mtDNA拷贝数分别升高163.5%($P < 0.0001$)和145.5%($P < 0.0001$)(图7a)。与Sham组相比,HFD.Con组雄性小鼠线粒体呼吸链相关基因*Nrf2*和*Cox7a1*表达分别降低63.7%($P < 0.01$)和55.1%($P < 0.05$),雌性小鼠无显著性差异;HFD.Ex组雄性小鼠*Nrf1*、*Nrf2*表达分别升高84.0%($P < 0.01$)、88.9%($P < 0.01$),*Cox7a1*表达无显著性差异,雌性小鼠*Nrf1*、*Nrf2*和*Cox7a1*表达分别升高61.3%($P <$

0.05)、61.8% ($P < 0.01$) 和 92.6% ($P < 0.001$)。HFD.Ex 组与 HFD.Con 组相比, 雄性小鼠 *Nrf1*、*Nrf2* 和 *Cox7a1* 表达分别升高 191.6% ($P < 0.001$)、420.0% ($P < 0.0001$) 和 194.6%

($P < 0.001$), 雌性小鼠表达分别升高 210.3% ($P < 0.001$)、129.8% ($P < 0.001$) 和 157.1% ($P < 0.0001$) (图 7b)。



a. 雄性小鼠骨骼肌 p-mTOR/mTOR、p-P70s6k/P706k 及 Fbx32 的 Western blot 代表图及统计结果; b. 雌性小鼠骨骼肌 p-mTOR/mTOR、p-P70s6k/P706k 及 Fbx32 的 Western blot 代表图及统计结果。

图 5 母代运动调控子代小鼠骨骼肌蛋白质合成与降解标志蛋白质的表达

Figure 5. Maternal Exercise Regulates the Expression of Biomarkers for Protein Synthesis and Degradation in Offspring Skeletal Muscle

利用 RT-PCR 检测与线粒体生物发生相关基因的表达, 结果显示 (图 7c), 与 Sham 组相比, HFD.Con 组雄性和雌性小鼠线粒体生物发生相关基因表达均无显著变化; HFD.Ex 组雄性小鼠骨骼肌 *Ppargc1a*、*Tfam*、*Tfb1m* 和 *Tfb2m* 的表达分别升高 102.3% ($P < 0.01$)、77.3% ($P < 0.01$)、140.8% ($P < 0.01$) 和 94.4% ($P < 0.05$), 雌性小鼠分别升高 211.8% ($P < 0.001$)、163.7% ($P < 0.001$)、235.2% ($P < 0.001$) 和 233.1% ($P < 0.001$)。HFD.Ex 组与 HFD.Con 组相比, 雄性小鼠骨骼肌 *Ppargc1a*、*Tfam*、*Tfb1m* 和 *Tfb2m* 的表达分别升高 136.4% ($P < 0.01$)、91.1% ($P < 0.01$)、175.2% ($P < 0.01$) 和 149.8% ($P < 0.01$), 雌性小鼠分别升高 265.3% ($P < 0.001$)、215.2% ($P < 0.001$)、253.0% ($P < 0.001$) 和 323.4% ($P < 0.001$)。

骨骼肌琥珀酸脱氢酶染色结果显示 (图 7d、7e), 与 Sham 组相比, HFD.Con 组雄性和雌性小鼠阳性肌纤维 (深色) 数量分别减少 12.5% ($P < 0.01$) 和 6.5% ($P < 0.05$), HFD.Ex 组雄性小鼠无显著差异, 雌性小鼠增加 7.6% ($P < 0.05$)。HFD.Ex 组与 HFD.Con 组相比, 雄性和雌性小鼠阳性肌纤维数量分别增加 21.4% ($P < 0.0001$) 和 15.1% ($P < 0.0001$)。

AMPK 是感知能量状态并促进葡萄糖和脂肪酸代谢

的关键激酶, AMPK 磷酸化上调其下游效应蛋白 PGC-1 α 蛋白表达, 调控线粒体生物发生、脂肪酸氧化和骨骼肌纤维类型转换 (Gurd et al., 2023)。因此, 本研究利用 Western blot 检测了小鼠骨骼肌 AMPK 和 PGC-1 α 的蛋白表达 (图 7f、7g)。结果发现, 与 Sham 组相比, HFD.Con 组雄性小鼠 p-AMPK^{Thr172}/AMPK 和 PGC-1 α 的表达分别下降 23.5% ($P < 0.001$) 和 33.7% ($P < 0.05$), 雌性小鼠分别下降 33.1% ($P < 0.0001$) 和 25.6% ($P < 0.05$)。HFD.Ex 组与 Sham 组相比, p-AMPK^{Thr172}/AMPK 和 PGC-1 α 的表达无差异。HFD.Ex 组与 HFD.Con 组相比, 雄性小鼠 p-AMPK^{Thr172}/AMPK 和 PGC-1 α 的表达分别升高 15.9% ($P < 0.01$) 和 126.8% ($P < 0.01$), 雌性小鼠分别升高 36.7% ($P < 0.001$) 和 25.8% ($P < 0.001$)。综上所述, 母代运动提高子代小鼠骨骼肌 AMPK-PGC-1 α 信号通路激活水平与线粒体生物发生, 抵抗子代小鼠长期高脂饮食导致的骨骼肌功能障碍。

3 讨论

肥胖与缺乏身体活动及过量摄入高热量的适口性食物相关 (Bouchard et al., 2015)。儿童青少年自发性身体活动匮乏, 繁重的学业压力导致身体活动时间被进一步侵占, 这加剧了肥胖环境下骨骼肌的功能障碍。运动训

练是促进机体健康的重要手段,是预防和治疗多种疾病的有效策略(Qiu et al., 2023)。越来越多的研究表明,妊娠期运动有益于孕妇健康和新生儿发育(Barakat et al., 2015; Gustafsson et al., 2016)。但是,母代运动对子代高脂饮食导致骨骼肌功能障碍的保护作用和分子机制尚不

清楚。本研究发现,母代运动显著上调子代小鼠骨骼肌线粒体生物发生和氧化磷酸化,降低长期高脂饮食导致的骨骼肌炎症浸润和骨骼肌纤维化,提高子代小鼠身体活动水平并改善内脏脂肪和骨骼肌脂质沉积。

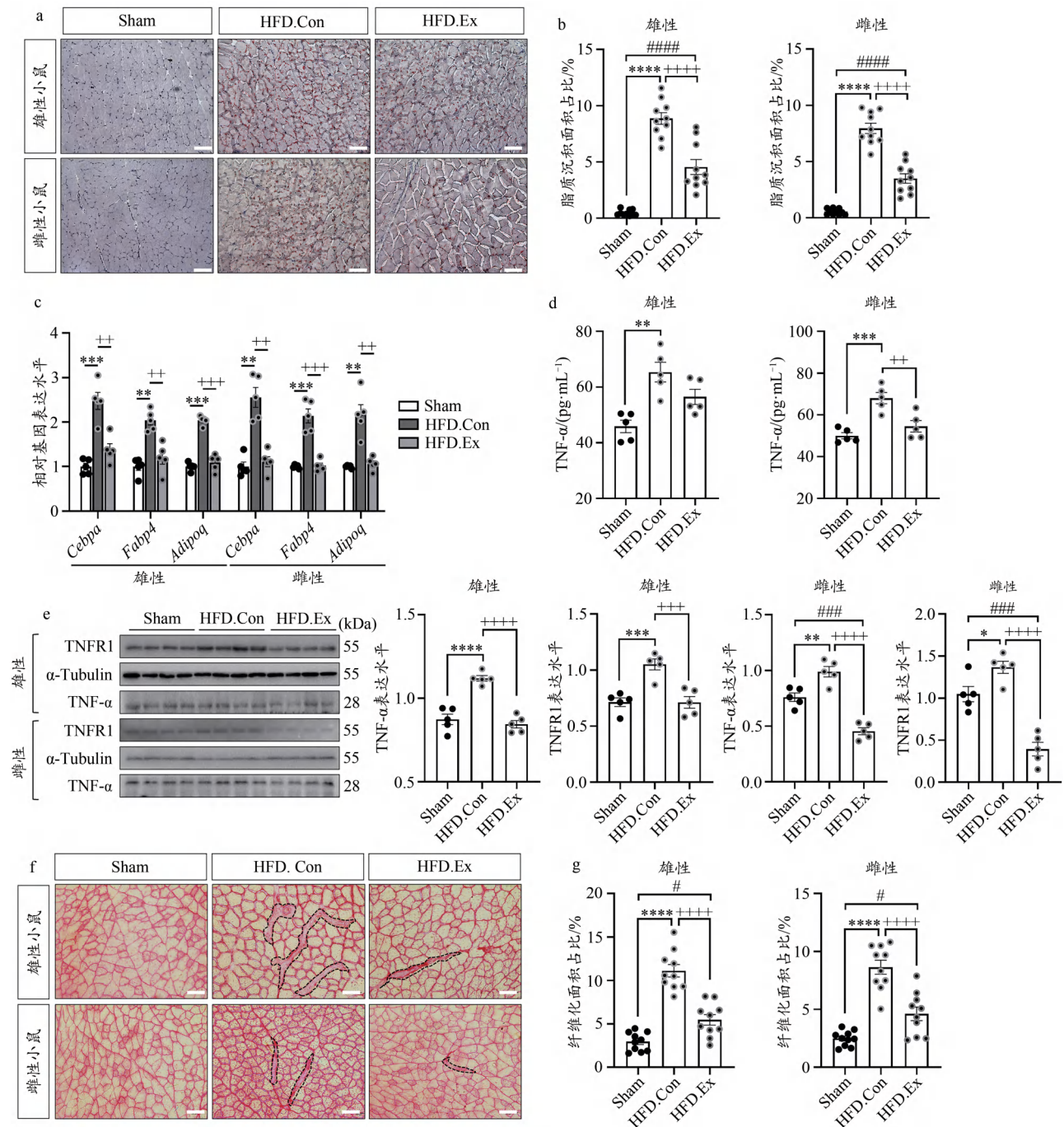


图6 母代运动降低子代小鼠长期高脂饮食导致的异位脂质沉积和骨骼肌纤维化

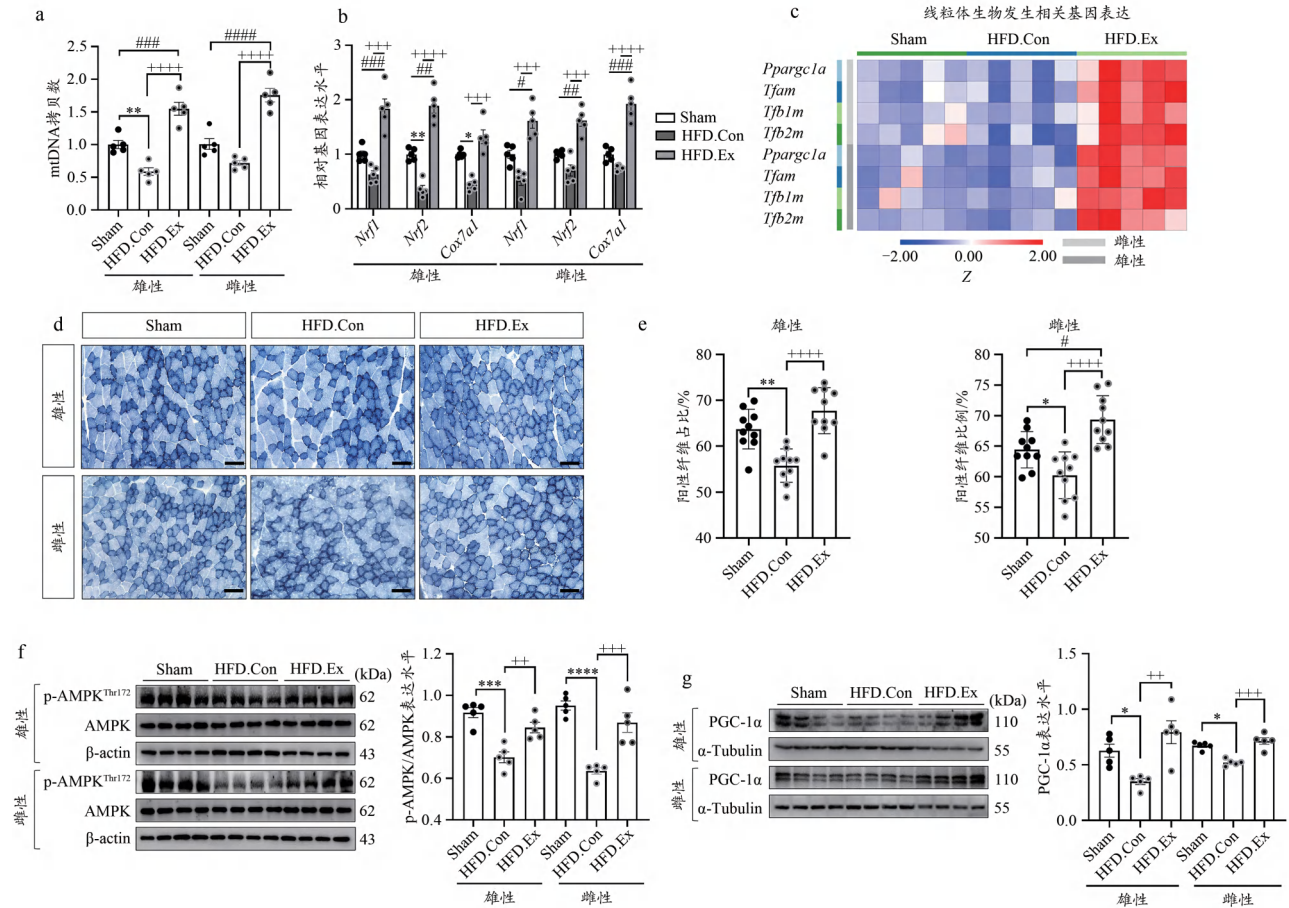
Figure 6. Maternal Exercise Reduces Lipid Deposition and Fibrosis Induced by High Fat Diet in Offspring

长期久坐的生活方式导致约25%的育龄妇女超重或肥胖,而母亲肥胖将影响胎儿骨骼肌发育,使其罹患代谢

性疾病的风险显著升高(Friedman, 2018)。针对孕期女性的流行病学研究显示,怀孕期间减少久坐行为可以降低

低新生儿肥胖的发生率 (Patel et al., 2017), 怀孕期间进行中等强度的运动可以降低新生儿产后 6 个月至幼儿期患肥胖症的风险 (Mourtakos et al., 2015), 怀孕期间进行规律的有氧运动并结合健康的饮食习惯可以减少新生儿出生后 48 h 的皮下脂肪厚度 (van Poppel et al., 2019)。然而, 也有研究表明, 久坐不动的母亲在怀孕期间突然开始进行有氧运动可能会对胎儿发育产生不良影响 (Chiavarioli et al., 2018), 这种现象可能是生活方式的改变影响了胎儿发育的宫内环境, 使其出生后出现“追赶型”增长, 导

致体重快速增加和脂肪积累 (Isganaitis et al., 2009), 正如饥荒期间的孕期妇女, 由于营养缺乏导致其后代罹患肥胖和代谢性疾病的风险显著高于同龄非饥荒时期出生的后代 (Gluckman et al., 2001)。本研究采用孕前递增强度的跑台训练结合孕期递减强度的跑台运动, 避免了生活习惯的突然改变导致的消极影响, 有效地降低了子代小鼠出生后长期高脂饮食导致的肥胖, 并显著抑制了骨骼肌中脂质生成相关基因的表达和异位脂质沉积。



a. 小鼠骨骼肌 mtDNA 拷贝数; b. 小鼠骨骼肌线粒体呼吸链相关基因表达水平; c. 小鼠骨骼肌线粒体生物发生相关基因表达水平; d. 小鼠骨骼肌琥珀酸脱氢酶染色示意图 (比例尺=200 μm); e. 小鼠骨骼肌阳性纤维占比; f. 小鼠骨骼肌 p-AMPK^{Thr172}/AMPK Western blot 代表图及统计结果; g. 小鼠骨骼肌 PGC-1α Western blot 代表图及统计结果。

图 7 母代运动提高子代骨骼肌线粒体生物发生和氧化磷酸化

Figure 7. Maternal Exercise Elevates Mitochondrial Biogenesis and Oxidative Phosphorylation in Offspring

脂蛋白参与各种代谢和生理信号级联过程, 并调节胰岛素信号、葡萄糖摄取和脂肪酸氧化等能量产生和代谢过程 (Ahima et al., 2008)。白色脂肪组织是主要的脂肪储存库, 也是系统分泌脂肪因子和细胞因子的主要内分泌器官 (Reyes-Farias et al., 2021)。肥胖和超重使 WAT 表型转换, 导致脂肪细胞局部分泌炎症因子并扩散至循环系统, 引发免疫细胞浸润进而破坏脂肪组织和远端组织器官的正常功能 (Hotamisligil, 2017)。已有大量研究表明, 过量摄入高脂/高热量饮食后, 脂肪增加导致持续性的

低度炎症, 且目前并无有效的解决方案, 这种与肥胖相关的慢性低度炎症及代谢改变被称为代谢性炎症 (metaflammation) (Hotamisligil, 2006)。同时, 由于脂肪组织的全身性分布, WAT 导致的炎性环境通过释放细胞因子引起全身性炎症 (Oliveros et al., 2014), 并最终可能导致胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 和 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 等代谢性疾病的发生。Hotamisligil 等 (1993) 首次报道在肥胖动物脂肪组织中 TNF-α 的基因和蛋白表达显著上调, 人类或实验动物注射 TNF-α

会损害胰岛素敏感性(Kuroda et al., 2020),使用 siRNA 转染特异性沉默脂肪组织中的 TNF- α 可提高机体胰岛素敏感性和葡萄糖耐受性(Tardelli et al., 2016),这些结果均表明促炎性脂肪因子 TNF- α 在肥胖导致代谢功能障碍中的重要作用。目前已鉴定出两种受体介导 TNF- α 的相互作用,即 TNFR1,也称为 CD120a 和 p55(其分子量为 55 kDa),以及 TNFR2,也称为 CD120b 和 p75(其分子量为 75 kDa)(Loetscher et al., 1990)。TNFR1 和 TNFR2 在细胞膜上以可溶性形式存在,并独立参与细胞内信号调控(Ruiz et al., 2021)。其中, TNFR1 是一种死亡受体(death receptor, DR),在其细胞质部分含有死亡结构域(death domain, DD)。DD 可使 DR 与同样含有 DD 的胞质蛋白相互作用,激活中性粒细胞迁移,并调节趋化因子和粘附分子的表达,从而促进炎症反应并参与细胞毒性(Dostert et al., 2019),而 TNFR2 主要与细胞增殖、活化和存活有关(Tartaglia et al., 1991)。本研究首次发现,母代运动可以抑制子代小鼠长期高脂饮食导致的循环系统 TNF- α 含量的显著增加,并抑制骨骼肌 TNF- α 及 TNFR1 的蛋白表达,有效降低了高脂饮食导致的骨骼肌炎症浸润和纤维化发生。

AMPK 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,调控机体对葡萄糖和脂肪酸的摄取、氧化和分解代谢途径,并参与脂肪酸、甾醇、蛋白质合成和其他合成代谢过程,在能量稳态中起着关键作用(Herzig et al., 2018)。运动上调 AMPK 表达促进机体健康已经得到广泛认可(Spaulling et al., 2022)。有研究表明,母代运动可以促进胎盘 SOD3 的分泌, SOD3 在宫内发育时期激活胎儿肝脏 AMPK-IDH-TET 信号通路,增加子代肝脏中葡萄糖代谢相关基因启动子区域的 DNA 去甲基化水平,上调肝脏糖脂代谢相关基因的表达,并对维持子代出生后代代谢稳态具有长期的健康效应(Kusuyama et al., 2021)。孕期有氧运动可以促进母亲骨骼肌和胎盘 APLN 的分泌增加, APLN 可以促进子代发育过程中骨骼肌的 AMPK 表达升高,进而促进三羧酸循环过程中产物 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate, α -KG)的含量, α -KG 是 DNA 去甲基化酶的辅助激活因子,介导胎儿骨骼肌发育过程中 PGC-1 α 基因启动子的去甲基化,并最终上调子代骨骼肌 PGC-1 α 的表达(Son et al., 2020a);另一方面,母代运动通过促进胎盘分泌 APLN 上调胎儿发育过程中 Prdm16 基因的 DNA 去甲基化,上调其基因表达并促进 BAT 发育和白色脂肪米色化进程(Son et al., 2020b)。在骨骼肌中存在两种亚型的 PGC-1 α , 全长 PGC-1 α 1 主要介导线粒体生物发生(Theilen et al., 2017),较短的 PGC-1 α 4 主要介导血管生成和肌肉肥大(Ruas et al., 2012)。长期有氧运动可以促进骨骼肌中 PGC-1 α 的表达增加,促进线粒体生物发生和氧化型纤维生成(Lin et al., 2002; Wende et al., 2007)。肥胖和

T2DM 等代谢性疾病显著抑制 AMPK 和 PGC-1 α 表达,导致骨骼肌再生修复能力下降和纤维化增加,严重影响骨骼肌健康(Sato et al., 2003; Steinberg et al., 2006)。本研究发现,长期高脂饮食导致子代小鼠骨骼肌 mtDNA 相对数量显著降低,线粒体呼吸链和生物发生相关基因表达显著下降,而母代运动可以抵抗子代小鼠高脂饮食导致的骨骼肌线粒体生物功能障碍,这可能与母代运动促进子代骨骼肌 AMPK-PGC-1 α 信号通路的激活有关。

本研究发现,母代运动可改善子代小鼠长期高脂饮食导致的骨骼肌功能障碍,但遗憾的是并未深入探究其表观遗传调控机制。基于已有研究基础,我们将在后续工作中根据哺乳动物表观遗传重编程的发生时期(配子重编程和胚胎重编程)开展运动干预,并结合 DNA 甲基化测序深入探究母代运动促进子代骨骼肌健康的表观遗传调控机制,为未来制定母婴健康干预策略提供新的理论视角。

4 结论

母代运动可以激活子代小鼠骨骼肌 AMPK-PGC-1 α 信号通路,促进骨骼肌线粒体生物发生,降低长期高脂饮食导致的肥胖和骨骼肌脂质异位沉积,并抑制循环系统 TNF- α 水平和骨骼肌 TNFR1 的蛋白表达,有效缓解子代小鼠肌萎缩和骨骼肌纤维化,保护子代小鼠免受高脂饮食导致的骨骼肌功能障碍。

参考文献:

- 梁果,王丽娟,周玉兰,等,2023.睡眠时长与中国6~19岁儿童青少年肥胖风险的关系:基于系统综述与Meta分析[J].中国体育科技, 59(7):61-70.
- 石海旺,段锐,2022.从表观遗传学角度看母代运动对子代的健康效应[J].成都体育学院学报, 48(1): 8-13.
- AHIMA R S, LAZAR M A, 2008. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance[J]. Mol Endocrinol, 22(5): 1023-1031.
- BARAKAT R, PERALES M, GARATACHEA N, et al., 2015. Exercise during pregnancy. A narrative review asking: What do we know?[J]. Br J Sports Med, 49(21): 1377-1381.
- BOUCHARD C, BLAIR S N, KATZMARZYK P T, 2015. Less sitting, more physical activity, or higher fitness?[J]. Mayo Clin Proc, 90(11): 1533-1540.
- CHIAVAROLI V, HOPKINS S A, DERRAIK J G B, et al., 2018. Exercise in pregnancy: 1-year and 7-year follow-ups of mothers and offspring after a randomized controlled trial[J/OL]. Sci Rep, 8(1): 12915[2023-11-18]. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30925-5>.
- COLLABORATION N C D R F, 2017. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: A pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults [J]. Lancet, 390(10113):2627-2642.
- DENG Y, XIE M D, LI Q, et al., 2021. Targeting mitochondria-

- inflammation circuit by β -Hydroxybutyrate mitigates HFpEF [J]. *Circ Res*, 128(2): 232-245.
- DONG Y, LAU P W C, DONG B, et al., 2019. Trends in physical fitness, growth, and nutritional status of Chinese children and adolescents: A retrospective analysis of 1.5 million students from six successive national surveys between 1985 and 2014 [J]. *Lancet Child Adolesc Health*, 3(12): 871-880.
- DOSTERT C, GRUSDAT M, LETELLIER E, et al., 2019. The TNF family of ligands and receptors: Communication modules in the immune system and beyond [J]. *Physiol Rev*, 99(1): 115-160.
- FERREIRA J C, ROLIM N P, BARTHOLOMEU J B, et al., 2007. Maximal lactate steady state in running mice: Effect of exercise training [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(8): 760-765.
- FRIEDMAN J E, 2018. Developmental programming of obesity and diabetes in mouse, monkey, and man in 2018: Where are we headed? [J]. *Diabetes*, 67(11): 2137-2151.
- GLUCKMAN P, PINAL C, 2001. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine [J/OL]. *Lancet*, 357(9270): 1798 [2023-11-18]. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04910-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04910-2).
- GURD B J, MENEZES E S, ARHEN B B, et al., 2023. Impacts of altered exercise volume, intensity, and duration on the activation of AMPK and CaMKII and increases in PGC-1 α mRNA [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 143: 17-27.
- GUSTAFSSON M K, STAFNE S N, ROMUNDSTAD P R, et al., 2016. The effects of an exercise programme during pregnancy on health-related quality of life in pregnant women: A Norwegian randomised controlled trial [J]. *BJOG*, 123(7): 1152-1160.
- HERZIG S, SHAW R J, 2018. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(2): 121-135.
- HOTAMISLIGIL G S, 2006. Inflammation and metabolic disorders [J]. *Nature*, 444(7121): 860-867.
- HOTAMISLIGIL G S, 2017. Foundations of immunometabolism and implications for metabolic health and disease [J]. *Immunity*, 47(3): 406-420.
- HOTAMISLIGIL G S, SHARGILL N S, SPIEGELMAN B M, 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : Direct role in obesity-linked insulin resistance [J]. *Science*, 259(5091): 87-91.
- ISGANAITIS E, JIMENEZ-CHILLARON J, WOO M, et al., 2009. Accelerated postnatal growth increases lipogenic gene expression and adipocyte size in low-birth weight mice [J]. *Diabetes*, 58(5): 1192-1200.
- JEBEILE H, KELLY A S, O'MALLEY G, et al., 2022. Obesity in children and adolescents: Epidemiology, causes, assessment, and management [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 10(5): 351-365.
- JIA P, SHI Y Y, JIANG Q, et al., 2023. Environmental determinants of childhood obesity: A Meta-analysis [J]. *Lancet Glob Health*, 11 (Suppl 1): S7.
- KODAMA S, SAITO K, TANAKA S, et al., 2009. Cardiorespiratory fitness as a quantitative predictor of all-cause mortality and cardiovascular events in healthy men and women: A Meta-analysis [J]. *JAMA*, 301(19): 2024-2035.
- KURODA M, NISHIGUCHI M, UGAWA N, et al., 2020. Interferon regulatory factor 7 mediates obesity-associated MCP-1 transcription [J/OL]. *PLoS One*, 15(5): e0233390 [2023-11-18]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233390>.
- KUSUYAMA J, ALVES-WAGNER A B, CONLIN R H, et al., 2021. Placental superoxide dismutase 3 mediates benefits of maternal exercise on offspring health [J]. *Cell Metab*, 33(5): 939-956.
- KUSUYAMA J, ALVES-WAGNER A B, MAKAREWICZ N S, et al., 2020. Effects of maternal and paternal exercise on offspring metabolism [J]. *Nat Metab*, 2(9): 858-872.
- LIN J D, WU H, TARR P T, et al., 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres [J]. *Nature*, 418(6899): 797-801.
- LOETSCHER H, SCHLAEGER E J, LAHM H W, et al., 1990. Purification and partial amino acid sequence analysis of two distinct tumor necrosis factor receptors from HL60 cells [J]. *J Biol Chem*, 265 (33): 20131-20138.
- MOURTAKOS S P, TAMBALIS K D, PANAGIOTAKOS D B, et al., 2015. Maternal lifestyle characteristics during pregnancy, and the risk of obesity in the offspring: A study of 5, 125 children [J/OL]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 15: 66 [2023-11-18]. <https://doi.org/10.1186/s12884-015-0498-z>.
- OLIVEROS E, SOMERS V K, SOCHOR O, et al., 2014. The concept of normal weight obesity [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 56(4): 426-433.
- PAN X F, WANG L, PAN A, 2021. Epidemiology and determinants of obesity in China [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 9(6): 373-392.
- PATEL N, GODFREY K M, PASUPATHY D, et al., 2017. Infant adiposity following a randomised controlled trial of a behavioural intervention in obese pregnancy [J]. *Int J Obes (Lond)*, 41(7): 1018-1026.
- QIU Y, FERNANDEZ-GARCIA B, LEHMANN H I, et al., 2023. Exercise sustains the hallmarks of health [J]. *J Sport Health Sci*, 12(1): 8-35.
- REYES-FARIAS M, FOS-DOMENECH J, SERRA D, et al., 2021. White adipose tissue dysfunction in obesity and aging [J/OL]. *Biochem Pharmacol*, 192: 114723 [2023-11-18]. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114723>.
- ROBINSON T N, BANDA J A, HALE L, et al., 2017. Screen media exposure and obesity in children and adolescents [J]. *Pediatrics*, 140 (Suppl 2): S97-S101.
- ROONEY M R, FANG M, OGURTSOVA K, et al., 2023. Global prevalence of prediabetes [J]. *Diabetes Care*, 46(7): 1388-1394.
- RUAS J L, WHITE J P, RAO R R, et al., 2012. A PGC-1 α isoform induced by resistance training regulates skeletal muscle hypertrophy [J]. *Cell*, 151(6): 1319-1331.
- RUIZ A, PALACIOS Y, GARCIA I, et al., 2021. Transmembrane TNF and Its receptors TNFR1 and TNFR2 in mycobacterial infections [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 22(11): 5461 [2023-11-18]. <https://doi.org/10.3390/ijms22115461>.
- SARTORI R, ROMANELLO V, SANDRI M, 2021. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: Implications in health and disease [J/OL]. *Nat Commun*, 12(1): 330 [2023-11-18]. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20123-1>.
- SATO K, LI Y, FOSTER W, et al., 2003. Improvement of muscle healing through enhancement of muscle regeneration and prevention of fibrosis [J]. *Muscle Nerve*, 28(3): 365-372.
- SHI H W, LI F, ZHANG F L, et al., 2023. An electrical stimulation

- intervention protocol to prevent disuse atrophy and muscle strength decline: An experimental study in rat[J/OL]. *J Neuroeng Rehabil*, 20(1): 84[2023-11-18]. <https://doi.org/10.1186/s12984-023-01208-6>.
- SON J S, CHAE S A, WANG H, et al., 2020a. Maternal inactivity programs skeletal muscle dysfunction in offspring mice by attenuating Apelin signaling and mitochondrial biogenesis [J/OL]. *Cell Rep*, 33(9): 108461[2023-11-18]. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108461>.
- SON J S, LIU X, TIAN Q, et al., 2019. Exercise prevents the adverse effects of maternal obesity on placental vascularization and fetal growth[J]. *J Physiol*, 597(13): 3333-3347.
- SON J S, ZHAO L, CHEN Y, et al., 2020b. Maternal exercise via exerkine apelin enhances brown adipogenesis and prevents metabolic dysfunction in offspring mice[J/OL]. *Sci Adv*, 6(16): eaaz0359[2023-11-18]. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aaz0359>.
- SONG M Y, HAN C Y, MOON Y J, et al., 2022. Sirt6 reprograms myofibers to oxidative type through CREB-dependent Sox6 suppression[J/OL]. *Nat Commun*, 13(1): 1808[2023-11-18]. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29472-5>.
- SPAULDING H R, YAN Z, 2022. AMPK and the adaptation to exercise[J]. *Annu Rev Physiol*, 84: 209-227.
- STEINBERG G R, MICHELL B J, VAN DENDEREN B J, et al., 2006. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling [J]. *Cell Metab*, 4(6): 465-474.
- TARDELLI M, ZEYDA K, MORENO-VIEDMA V, et al., 2016. Osteopontin is a key player for local adipose tissue macrophage proliferation in obesity[J]. *Mol Metab*, 5(11): 1131-1137.
- TARTAGLIA L A, WEBER R F, FIGARI I S, et al., 1991. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(20): 9292-9296.
- THEILEN N T, KUNKEL G H, TYAGI S C, 2017. The role of exercise and TFAM in preventing skeletal muscle atrophy [J]. *J Cell Physiol*, 23(9)2: 2348-2358.
- VAN DEN HOEK A M, DE JONG J, WORMS N, et al., 2021. Diet and exercise reduce pre-existing NASH and fibrosis and have additional beneficial effects on the vasculature, adipose tissue and skeletal muscle via organ-crosstalk [J/OL]. *Metabolism*, 124: 154873[2023-11-18]. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154873>.
- VAN POPPEL M N M, SIMMONS D, DEVLIEGER R, et al., 2019. A reduction in sedentary behaviour in obese women during pregnancy reduces neonatal adiposity: The DALI randomised controlled trial[J]. *Diabetologia*, 62(6): 915-925.
- WENDE A R, SCHAEFFER P J, PARKER G J, et al., 2007. A role for the transcriptional coactivator PGC-1 α in muscle refueling [J]. *J Biol Chem*, 282(50): 36642-36651.

Mechanistic Study of Maternal Exercise Mitigating High-Fat Diet Induced Skeletal Muscle Dysfunction in Offspring Mice

SHI Haiwang, LI Jie, YU Haoyang, ZHANG Fulong, YANG Luodan, DUAN Rui*

School of Physical Education and Sports Science, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective: To investigate the protective effects and underlying mechanisms of maternal exercise on skeletal muscle dysfunction induced by long-term high-fat diet (HFD) in offspring mice. Methods: Female C57BL/6 mice were randomly divided into maternal con group (M-Con) and maternal exercise group (M-Ex). The M-Ex group underwent treadmill exercise for 4 weeks before and during pregnancy, while the M-Con group maintained a regular lifestyle. Both groups were kept in the same environment during the training period. Offspring mice were obtained by mating M-Con and the M-Ex females with age-matched wild-type C57BL/6 males. After normal rearing until 3 weeks of age, the offspring were subjected to a 12-week HFD intervention. Skeletal muscle function in offspring was assessed by exercise performance tests, and the cross-sectional area (CSA), lipid deposition, fibrosis and fiber type of skeletal muscle fibers were analyzed by histochemical staining. The protein expression of mTOR, P70s6k, Fbx32, TNF- α , TNFR1, AMPK and PGC-1 α in skeletal muscle was detected by Western blot, and the expression of genes related to lipid synthesis and mitochondrial biogenesis was detected by RT-PCR. Results: Compared to wild-type mice with normal diet (Sham), offspring from the M-Con group (HFD.Con) showed significantly reduced exercise performance, decreased skeletal muscle index and fiber CSA, increased expression of lipid synthesis-related genes, elevated ectopic lipid deposition and fibrosis in skeletal muscle, and higher plasma TNF- α level after long-term HFD. Moreover, skeletal muscle TNF- α and TNFR1 protein levels were upregulated, the mitochondrial function was impaired, the number of SDH-stained positive fibers was reduced, and AMPK and PGC-1 α protein expression level were significantly downregulated. Compared with the HFD.Con group, offspring mice (HFD.Ex) from the M-Ex group showed significantly increased expression of AMPK and PGC-1 α proteins in skeletal muscle, along with higher levels of mitochondrial biogenesis-related genes and SDH-staining positive fibers. Additionally, the expression of lipid synthesis-related genes and TNF- α and TNFR1 proteins was significantly downregulated, reducing lipid deposition and fibrosis, thereby resisting skeletal muscle dysfunction caused by a long-term high-fat diet. Conclusions: Maternal exercise activates AMPK/PGC-1 α signaling pathway in offspring skeletal muscle, promoting mitochondrial biogenesis, reducing obesity and ectopic lipid deposition induced by long-term HFD, and inhibiting serum TNF- α levels and skeletal muscle TNFR1 protein expression. These effects effectively alleviate muscle atrophy and fibrosis in offspring, protecting skeletal muscle against metabolic dysfunction.

Keywords: *maternal exercise; exercise performance; obesity; high fat diet; AMPK; TNF- α*