

· 基础研究 ·

Omega-3 多不饱和脂肪酸通过调节钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶-2/腺苷酸活化蛋白激酶蛋白信号通路对大鼠骨骼肌衰老的抑制作用

王广玲^{1*}, 幸凡², 周雪念¹, 熊依宁¹

(¹ 江西省人民医院临床营养科, 南昌 330006; ² 宜春市袁州区妇幼保健院保健科, 江西 宜春 336000)

【摘要】目的 探讨 omega-3 多不饱和脂肪酸(n-3PUFAs)对 D-半乳糖(D-gal)诱导的大鼠骨骼肌衰老的延缓作用及其可能机制。**方法** 将 30 只老年雄性 Wistar 大鼠随机分为空白组(注射 0.9%生理盐水)、模型组(骨骼肌衰老大鼠模型)和 n-3PUFAs 组(骨骼肌衰老大鼠模型加 n-3PUFAs 饲料喂养),每组各 10 只。比较 3 组大鼠生长状况、体质量、比目鱼肌质量变化及四肢肌肉力量,分析 n-3PUFAs 对衰老肌肉萎缩大鼠肌肉再生的作用。采用 Western blot 分别检测钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶-2(CaMKK2)、腺苷酸活化蛋白激酶蛋白(AMPK)表达水平。采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。**结果** 与空白组大鼠[(466.04±33.83)g]比较,模型组[(403.33±25.37)g]和 n-3PUFAs 组[(435.72±27.32)g]大鼠体质量明显减轻;且 n-3PUFAs 组大鼠体质量较模型组大鼠增加,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠在饲养 1 个月[(2.40±0.50)和(1.07±0.15)s]和 2 个月[(7.33±0.76)和(1.33±0.32)s]后开始攀爬的时间明显延长;与模型组比较,n-3PUFAs 组大鼠在 1 个月[(1.76±0.32)和(2.40±0.50)s]和 2 个月[(4.07±0.61)和(7.33±0.76)s]后开始攀爬的所需时间明显缩短,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠骨骼肌细胞间隙增大,大鼠骨骼肌萎缩严重,肌纤维直径明显缩小,p21、p16 蛋白表达上调;与模型组比较,n-3PUFAs 组大鼠骨骼肌细胞间隙缩小,肌纤维直径增粗,p21、p16 蛋白表达下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与空白组比较,模型组大鼠中 CaMKK2、磷酸化的 p-AMPK 的相对蛋白表达明显下降;与模型组比较,n-3PUFAs 组大鼠中 CaMKK2、磷酸化的 p-AMPK 相对蛋白表达明显增加,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 AMPK 在 3 组中的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** n-3PUFAs 可延缓 D-半乳糖诱导的大鼠骨骼肌衰老,其机制可能与 CaMKK2/AMPK 信号通路关键蛋白水平上调有关。

【关键词】 衰老;Omega-3 多不饱和脂肪酸;骨骼肌;信号通路

【中图分类号】 R151

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2023.07.109

Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit skeletal muscle aging in rats by regulating calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2/adenosine monophosphate activated protein kinase signal pathway

Wang Guangling^{1*}, Xing Fan², Zhou Xuenian¹, Xiong Yining¹

(¹Department of Clinical Nutrition, Jiangxi Provincial People's Hospital, Nanchang 330006, China; ²Department of Healthcare, Maternal and Child Health Hospital of Yuanzhou District of Yichun City, Yichun 336000, Jiangxi Province, China)

【Abstract】Objective To investigate the delaying effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids (n-3PUFAs) on D-galactose (D-gal) induced skeletal muscle aging in rats and its possible mechanism. **Methods** Thirty elderly male Wistar rats were randomly divided into blank group (0.9% normal saline injection), model group (rat model of skeletal muscle aging) and n-3PUFAs group (aging model+n-3PUFAs feeding), with 10 rats in each group. The growth, body mass, mass of soleus muscle and strength of limb muscle were compared among the rats in each group to explore the effect of n-3PUFAs on muscle regeneration in aging muscle atrophy rats. Western blot was used to detect the expression levels of calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 (CaMKK2) and adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK). SPSS statistics 21.0 was adopted for statistical analysis. One-way analysis of variance was employed for multiple group comparison, and LSD-*t* test was performed for pairwise multiple comparisons. **Results** Compared with blank group of rats [(466.04±33.83)g], the body mass of model group [(403.33±25.37)g] and n-3PUFAs group [(435.72±27.32)g] reduced; compared with model group, the body mass of rats in the n-3PUFAs group increased, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with blank group, the time began to climb of model group rats were longer after 1 month [(2.40±0.50) vs (1.07±0.15)s] and 2 months [(7.33±0.76) vs (1.33±0.32)s]; compared with model group, the time required for n-3PUFAs group rats were shorter after 1 month [(1.76±0.32) vs (2.40±0.50)s] and 2 months [(4.07±0.61) vs (7.33±0.76)s], the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with blank group, the gap between skeletal muscle cells in the model group increased, the diameter of muscle fibers

收稿日期: 2022-11-16; 接受日期: 2023-03-17

基金项目: 江西省自然科学基金(20171BAB205040);江西省卫生健康委科技计划项目(20161008,202130018)

通信作者: 王广玲, E-mail: wg081977@126.com

decreased, and the expression of p21 and p16 proteins was upregulated; the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with model group, the gap between skeletal muscle cells in the n-3PUFAs group decreased, the diameter of muscle fibers increased, and the expression of p21 and p16 proteins were downregulated; the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with blank group, the relative protein expression of CaMKK2 and p-AMPK in the model group decreased; compared with model group, the expression of CaMKK2 and phosphorylated p-AMPK relative protein in n-3PUFAs group increased; the differences were statistically significant ($P<0.05$). The expression level of AMPK in the three groups had no significant difference ($P>0.05$). **Conclusion** n-3PUFAs can delay skeletal muscle aging induced by D-gal in rats, and its mechanism may be related to the up-regulation of key proteins in CaMKK2/AMPK signaling pathway.

【Key words】 aging; omega-3 polyunsaturated fatty acids; skeletal muscle; signaling pathway

This work was supported by the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (20171BAB205040) and the Project of Science and Technology Plan of Health Commission of Jiangxi Province (20161008, 202130018).

Corresponding author: Wang Guangling, E-mail: wg081977@126.com

随着我国老年人口的增加,与老年相关的疾病不断攀升,严重危害着老年人的身心健康。随着年龄增长,骨骼肌衰老,骨骼肌出现进行性的质量和力量丢失,导致肢体残疾,生活质量减低甚至死亡,给社会和家庭带来巨大的经济压力和精神压力^[1]。1998年 Rosenberg^[2]首次将骨骼肌随年龄增长进行性衰老现象诊断为肌肉衰减综合征。目前肌肉衰减综合征的临床治疗以运动、营养、药物治疗为主,实际上大部分患者并未获益,且药物(睾酮、雌激素、生长激素)因其较大的副作用,在临床上的应用受到限制^[3]。因此对于肌肉衰减综合征的治疗及干预亟需安全有效的措施。

多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)是人体所必需的脂肪酸,其中 omega-3 多不饱和脂肪酸(omega-3 polyunsaturated fatty acids, n-3PUFAs)在海洋鱼类及某些坚果中含量较为丰富,能够发挥抗肿瘤、抗炎、抗衰老等作用^[4,5]。有流行病学研究证实人类通过摄入富含 n-3PUFAs 的饮食方式能够有效降低神经系统、心血管疾病及免疫性疾病的风险^[6]。有研究报道老年脂肪酸氧化能力下降,可能是导致年龄相关的肌肉衰减、脂肪堆积的重要原因之一^[7]。n-3PUFAs 防治衰老相关慢性病的研究成果,提示 n-3 PUFAs 可能成为新型延缓衰老的功能因子^[8]。但是现有研究大多基于流行病学层面, n-3PUFAs 衰老过程中其抗骨骼肌减少的作用机制未见文献报道。本研究探讨 n-3PUFAs 对骨骼肌生物效应的影响及其相关机制,旨在为骨骼肌的抗衰老策略提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只22~24月龄老年雄性 Wistar 大鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,所有大鼠在同样环境下饲养,自然照明周期,清洁级饲养,动物房温度(22 ± 1)℃,动物饲料为无特定病原体级大鼠维持饲料。

1.2 主要试剂

D-半乳糖(D-galactose)购自 MedChemExpress

(MCE)公司;蛋白质裂解缓冲液(protein lysis buffer, RIPA)、蛋白酶抑制剂(protease inhibitor, PMSF)购自北京索莱宝科技有限公司;封闭用脱脂奶粉购自赛默飞公司;增强化学发光试剂盒(enhanced chemiluminescent, ECL)、聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)购自碧云天生物有限公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)、抗体稀释液、电转及电泳缓冲液购于博士德生物工程有限公司;钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶2(calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2, CAMKK2)(ab96531)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)(ab80039)、磷酸化-腺苷酸活化蛋白激酶(p-adenosine monophosphate activated protein kinase, p-AMPK)(ab194920)、一抗及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)购自艾博抗公司。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立及分组 将大鼠随机分为3组:空白组、模型组和 n-3PUFAs 组,每组10只。模型组和 n-3PUFAs 组行腹部皮下注射5% D-半乳糖(125 mg/kg)建立骨骼肌衰老动物模型^[9];空白组腹部皮下注射0.9%生理盐水,造模给药连续进行8周。在造模第7天开始, n-3PUFAs 组连续给予 n-3PUFAs 2.0 mg/(g·d)饲料喂养7周,空白组和模型组给予等体积的米汤干预。最后一次喂养24 h后,腹腔麻醉,将所有大鼠脱颈处死,置于冰上迅速剥离大鼠股直肌和比目鱼肌,并用分析天平称取湿重,进行相关实验检测。

1.3.2 大鼠肌力行为学检测 所有大鼠适应性饲养1周,运用水平绳实验检测各组大鼠肌力行为学,首先将各组大鼠的前肢放置在水平绳让其握住,正常情况下普通大鼠的后肢会迅速抓住水平绳并在绳上爬行。若大鼠存在肌力下降情况,则前、后肢无力抓绳,后肢抓绳上绳的时间将延长。因此,通过观察大

鼠攀爬上绳的时间可间接判断肌肉力量的改变情况。

1.3.3 Western blot 使用 RIPA 裂解缓冲液提取 3 组大鼠股直肌中的总蛋白;采用蛋白浓度测定试剂盒(增强型)测定蛋白浓度,蛋白煮沸变性,以备后续实验。随后进行 SDS-PAGE 电泳,并将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h,用 CaMKK2(ab96531)抗体(1:5 000)、AMPK(ab80039)抗体(1:5 000)、p-AMPK(ab194920)抗体(1:2 000)在 4℃下过夜。次日 TBS-吐温 20 洗膜 3 次,每次 10 min,用二抗(1:8 000 稀释)在 37℃下孵育 2 h。最后用增强化学发光试剂盒显示蛋白条带;获得条带后使用 Image J 软件分析蛋白信号强度,计算蛋白水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 D-半乳糖构建衰老大鼠模型

通过计算衰老大鼠骨骼肌组织的质量来评价 D-半乳糖对构建衰老大鼠模型是否建立成功。结果显示,模型组比目鱼肌质量(0.334±0.015)g 显著低于空白组(0.412±0.021),差异有统计学意义(*P*=0.015)。说明 D-半乳糖诱导的衰老大鼠模型建模成功。

2.2 3 组大鼠体质量监测结果

3 组大鼠经过不同处理后,每周测定体质量并记录。结果显示,模型组大鼠脱毛明显,伴有精神萎靡,活动度明显下降,饮食一般,体质量增长速度缓慢,而 n-3PUFAs 组大鼠上述情况有明显改善。实验前,3 组大鼠体质量比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);实验结束后,3 组大鼠体质量增加明显;与空白组大鼠比较,模型组和 n-3PUFAs 组大鼠体质量增长较缓,差异有统计学意义(*P*<0.05);与模型组大鼠比较,n-3PUFAs 组大鼠体质量增加较大,差异有统计学意义(*P*<0.05;表 1)。

表 1 n-3PUFAs 对 D-半乳糖诱导的衰老大鼠体质量的影响

Table 1 Effect of n-3PUFAs on body mass of aging rats induced by D-galactose (n = 10, g, $\bar{x}\pm s$)		
Group	Before experiment	After experiment
Blank	241.53±12.76	466.04±33.83 ^{△△}
Model	244.67±14.41	403.33±25.37 ^{**△△}
n-3PUFAs	237.82±12.59	435.72±27.32 ^{***#△△}

n-3PUFAs: n-3 polyunsaturated fatty acids. Compared with blank group, **P*<0.05, ***P*<0.01; compared with model group, #*P*<0.05, ###*P*<0.01; compared with before experiment, [△]*P*<0.05, ^{△△}*P*<0.01.

2.3 n-3PUFAs 对 D-半乳糖诱导的衰老大鼠四肢肌力的影响

空白组各月末检测开始攀爬的所需时间接近,组内各月末间的数据比较无显著差异。与空白组比较,造模 1 个月后模型组大鼠开始攀爬的时间明显延长[(2.40±0.50)和(1.07±0.15)s],造模 2 个月后更为显著[(7.33±0.76)和(1.33±0.32)s],差异有统计学意义(*P*<0.05),间接反映了 D 半乳糖可诱导大鼠骨骼肌肌力下降。与模型组比较,n-3PUFAs 组大鼠同时期开始攀爬的所需时间明显缩短[1 个月:(1.76±0.32)和(2.40±0.50)s;2 个月:(4.07±0.61)和(7.33±0.76)s],提示 n-3PUFAs 干预处理后,大鼠的肌力逐渐得到恢复(图 1)。

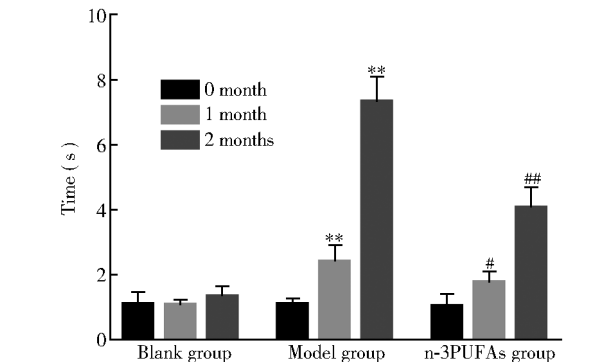


图 1 n-3PUFAs 对 D-半乳糖诱导的衰老大鼠四肢肌力的影响

Figure 1 Effect of n-3PUFAs on limb muscle strength of aging rats induced by D-galactose
n-3 PUFAs: omega-3 polyunsaturated fatty acids. Compared with blank group, **P*<0.05, ***P*<0.01; compared with model group, #*P*<0.05, ###*P*<0.01.

2.4 n-3PUFAs 对 D-半乳糖诱导的衰老大鼠骨骼肌形态学和衰老相关标志物的影响

3 组大鼠经过不同的处理后,通过 HE 染色观察各组大鼠骨骼肌的萎缩情况,结果显示,与空白组比较,模型组中大鼠骨骼肌细胞形状大小不一、细胞间隙增大,骨骼肌萎缩最为严重,肌纤维直径明显缩小;而 n-3PUFAs 组大鼠骨骼肌细胞大小逐渐均一化、细胞间隙缩小、细胞间隙结缔组织减少且排列紧密,肌纤维直径增粗。采用 Western blot 检测衰老相关标志物 p21、p16 的表达水平,结果显示,与空白组比较,模型组大鼠中 p21、p16 蛋白表达升高;与模型组比较,n-3PUFAs 组大鼠中 p21、p16 蛋白表达降低,差异均有统计学意义(*P*<0.01;图 2)。

2.5 n-3PUFAs 对 D-半乳糖诱导的衰老大鼠骨骼肌 CaMKK2 及 AMPK 蛋白表达的影响

3 组大鼠经过不同处理后,采用 Western blot 检测 CaMKK2/AMPK 信号通路蛋白 CaMKK2、AMPK、p-AMPK 表达水平。结果显示,与空白组比较,模型组大鼠 CaMKK2、p-AMPK 的相对蛋白表达明显下降,

差异有统计学意义 ($P<0.01$) ; 与模型组比较, n-3PUFAs 组大鼠中 CaMKK2、p-AMPK 相对蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) ; 而 AMPK 在 3 组中的表达无显著差异 ($P>0.05$; 图 3)。

3 讨论

衰老是一个与时间有关的多方面过程, 其中生理完整性的逐渐丧失会导致功能障碍和生活质量下降^[10]。随着世界老龄化人口的日益加剧, 如何安全有效地延缓衰老成为关注的焦点^[11]。衰老的自由基学说认为自由基引起的氧化损伤是引起机体老化及多种老年病的主要因素^[12]。存在于细胞膜的不饱和脂肪酸受到自由基的启动产生过氧化脂质, 过氧化脂

质经过分解产生丙二醛, 通过与蛋白质、肽类或脂类聚合、交联, 形成老年色素或脂褐质积累在细胞组织中, 导致机体衰老^[13]。已有研究报道 n-3PUFAs 对于心血管疾病、神经退行性疾病、糖尿病和癌症等增龄性慢性病具有防治作用, 提示了 n-3PUFAs 对健康老龄化的潜在促进作用^[14]。

目前, 在进行衰老和抗衰老的研究方面, 动物模型的建立非常重要。D-半乳糖诱导的衰老模型因其时间短、耗时短、副作用最少及在整个实验周期中存活率较高而最受欢迎^[15]。已有研究结果报道体质量、肌肉力量及器官系数可间接反映机体的衰老程度^[16]。本研究应用 D-半乳糖诱导制成 Wistar 大鼠骨骼肌衰老模型, 结果显示, 与空白组比较, 模型组脱毛明显、活动度

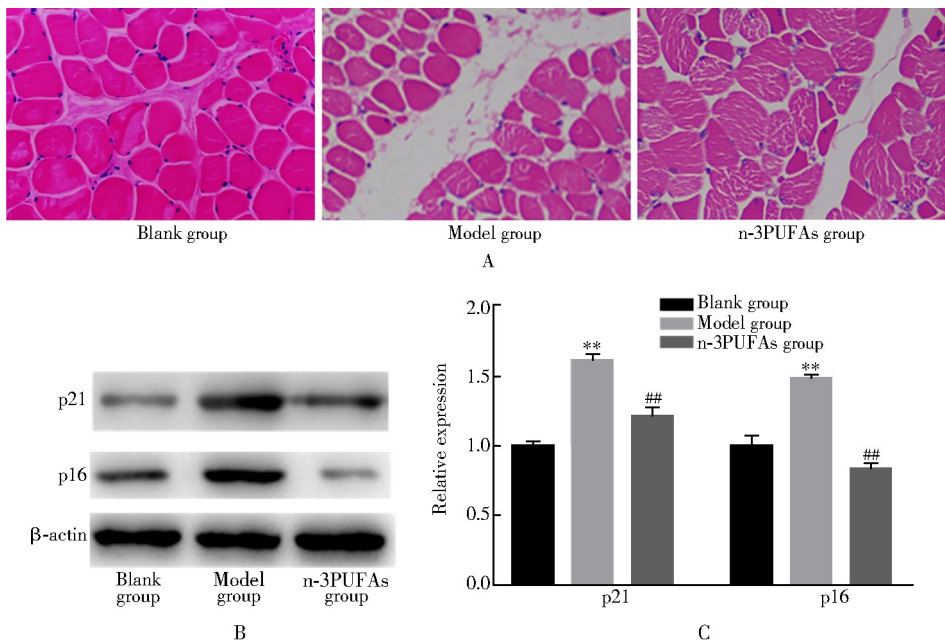


图 2 n-3PUFAs 对 D-半乳糖诱导的衰老大鼠骨骼肌形态学和衰老相关标志物的影响

Figure 2 Effects of n-3PUFAs on skeletal muscle morphology and aging related markers in aging rats induced by D-galactose A: morphological changes of skeletal muscle of rats in each group (HE $\times 200$); B: Western blot detection of p21 and p16 protein expression level; C: relative expression levels of each protein. n-3PUFAs: omega-3 polyunsaturated fatty acids. Compared with blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

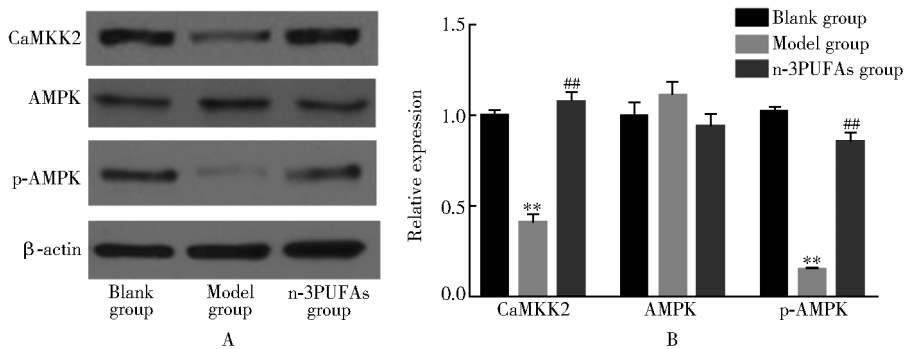


图 3 Western blot 检测 CaMKK2、AMPK 及 p-AMPK 蛋白表达水平

Figure 3 Western blot detection of CaMKK2, AMPK and p-AMPK protein expression levels

A: Western blot detection of CaMKK2, AMPK and p-AMPK protein expression level; B: relative expression levels of each protein. CaMKK2: calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2; AMPK: adenosine monophosphate activated protein kinase; p-AMPK: p-adenosine monophosphate activated protein kinase; n-3PUFAs: omega-3 polyunsaturated fatty acids. Compared with blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; compared with model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

下降、体质量减轻,开始攀爬的时间明显延长;而与模型组比较,大鼠的体质量、肌肉力量有明显改善。并且 HE 染色提示,经过 n-3PUFAs 处理后大鼠骨骼肌的萎缩情况明显改善,衰老相关标志物 p21、p16 蛋白表达下调,提示 n-3PUFAs 可降低骨骼肌衰老过程中骨骼肌损伤,能够改善 D-半乳糖诱导的大鼠骨骼肌的衰老。

关于 n-3PUFAs 对于骨骼肌衰老的保护作用可能涉及多种机制,但目前尚未完全阐明。多项研究证实,AMPK 通路不仅处于能量代谢的枢纽,同时也参与对老化过程的调节,在多种器官和组织的脂代谢中发挥非常重要的作用^[17]。AMPK 是一个异源三聚体蛋白,由一个催化亚基 α 和两个调节亚基 β 和 γ 组成,是重要的细胞内能量状态的传感器之一,依赖于体内单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)/三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)比例的升高发挥作用^[18]。AMPK 参与糖、脂、蛋白质代谢、细胞生长与凋亡、骨骼肌等多个方面的调控^[19]。CaMKK2/AMPK 途径是 AMPK 数条通路途径中重要的通路分支,有研究证实通过干预这条通路能够明显改善肝脏脂肪变性和肝损伤^[20]。CaMKK2 受细胞内 Ca^{2+} 浓度调控,通过磷酸化激活 AMPK,而 AMPK 的磷酸化则进一步抑制脂肪合成相关蛋白的表达,进而促进物质代谢和脂肪酸氧化^[21]。在哺乳动物细胞中 CaMKK2 超表达能够提高 AMPK 的活性;反之,药物抑制 CaMKK2 或用反义 RNA 干扰抑制 CaMKK2 表达,则使 AMPK 的活性几乎完全丧失^[22]。研究 n-3PUFAs 是否通过 CaMKK2/AMPK 通路影响骨骼肌衰老,结果显示,与空白组比较,模型组大鼠中 CaMKK2、p-AMPK 的蛋白表达明显下调;给予 n-3PUFAs 处理后, CaMKK2、p-AMPK 蛋白表达逐步恢复。说明在衰老过程中,大鼠骨骼肌发生了 CaMKK2/AMPK 信号通路的活化,引起了 CaMKK2 与 p-AMPK 表达,进而发挥了延缓骨骼肌衰老的作用。

综上,D-半乳糖可诱导大鼠产生衰老模型, n-3PUFAs 干预可缓解 D-半乳糖诱导的大鼠骨骼肌衰老,其作用机制可能与 CaMKK2/AMPK 信号通路关键蛋白的激活有关。

【参考文献】

[1] Englund DA, Zhang X, Aversa Z, *et al.* Skeletal muscle aging, cellular senescence, and senotherapeutics: current knowledge and future directions [J]. *Mech Ageing Dev*, 2021, 200: 111595. DOI: 10.1016/j.mad.2021.111595.

[2] Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance[J]. *Clin Geriatr Med*, 2011, 27(3): 337–339. DOI: 10.1016/j.cger.2011.03.003.

[3] Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, *et al.* Sarcopenia: revised

European consensus on definition and diagnosis[J]. *Age Ageing*, 2019, 48(1): 16–31. DOI: 10.1093/ageing/afy169.

[4] Freitas HR, Isaac AR, Malcher-Lopes R, *et al.* Polyunsaturated fatty acids and endocannabinoids in health and disease[J]. *Nutr Neurosci*, 2018, 21(10): 695–714. DOI: 10.1080/1028415X.2017.1347373.

[5] Coltell O, Sorlí JV, Asensio EM, *et al.* Genome-wide association study for serum Omega-3 and Omega-6 polyunsaturated fatty acids: exploratory analysis of the sex-specific effects and dietary modulation in Mediterranean subjects with metabolic syndrome[J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 310. DOI: 10.3390/nu12020310.

[6] Innes JK, Calder PC. Marine Omega-3 (N-3) fatty acids for cardiovascular health: an update for 2020 [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4): 1362. DOI: 10.3390/ijms21041362.

[7] Freitas HR, Ferreira GDC, Trevenzoli IH, *et al.* Fatty acids, antioxidants and physical activity in brain aging[J]. *Nutrients*, 2017, 9(11): 1263. DOI: 10.3390/nu9111263.

[8] Román GC, Jackson RE, Gadhia R, *et al.* Mediterranean diet: the role of long-chain ω -3 fatty acids in fish; polyphenols in fruits, vegetables, cereals, coffee, tea, cacao and wine; probiotics and vitamins in prevention of stroke, age-related cognitive decline, and Alzheimer disease[J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2019, 175(10): 724–741. DOI: 10.1016/j.neurol.2019.08.005.

[9] 刘丰彬, 沈梅. 运动训练和补肽抗大鼠骨骼肌衰老机制的初步研究[J]. *中国应用生理学杂志*, 2014, 30(2): 142–146. DOI: 10.13459/j.cnki.cjap.2014.02.013.

[10] Mohamad Kamal NS, Safuan S, Shamsuddin S, *et al.* Aging of the cells: insight into cellular senescence and detection methods[J]. *Eur J Cell Biol*, 2020, 99(6): 151108. DOI: 10.1016/j.ejcb.2020.151108.

[11] Viña J. The free radical theory of frailty: mechanisms and opportunities for interventions to promote successful aging[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 134: 690–694. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.045.

[12] Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 124: 420–430. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016.

[13] Politano CA, López-Berroa J. Omega-3 fatty acids and fecundation, pregnancy and breast feeding[J]. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 2020, 42(3): 160–164. DOI: 10.1055/s-0040-1708090.

[14] Zhu Y, Ferrara A, Forman MR. Omega 3 polyunsaturated fatty acids and healthy ageing[J]. *BMJ*, 2018, 363: k4263. DOI: 10.1136/bmj.k4263.

[15] Ge Y, Zhou M, Chen C, *et al.* Role of AMPK mediated pathways in autophagy and aging[J]. *Biochimie*, 2022, 195: 100–113. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.11.008.

[16] Trefts E, Shaw RJ. AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time[J]. *Mol Cell*, 2021, 81(18): 3677–3690. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.015.

[17] Hsu SK, Cheng KC, Mgbeahurike MO, *et al.* New insight into the effects of metformin on diabetic retinopathy, aging and cancer: nonapoptotic cell death, immunosuppression, and effects beyond the AMPK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9453. DOI: 10.3390/ijms22179453.

[18] Yeo EJ. Hypoxia and aging[J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(6): 1–15. DOI: 10.1038/s12276-019-0233-3.

[19] Saikia R, Joseph J. AMPK: a key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2021, 99(11): 1539–1551. DOI: 10.1007/s00109-021-02125-8.

[20] Jadeja RN, Chu X, Wood C, *et al.* M3 muscarinic receptor activation reduces hepatocyte lipid accumulation via CaMKK β /AMPK pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 169: 113613. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.08.015.

[21] Green MF, Anderson KA, Means AR. Characterization of the CaMKK β -AMPK signaling complex[J]. *Cell Signal*, 2011, 23(12): 2005–2012. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.07.014.

[22] Peng IC, Chen Z, Sun W, *et al.* Glucagon regulates ACC activity in adipocytes through the CaMKK β /AMPK pathway[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(12): E1560–E1568. DOI: 10.1152/ajpendo.00504.2011.