



运动干预对肥胖大鼠睾丸自噬和凋亡的影响*

徐 瑞^{1,2)} 董 佳¹⁾ 曹友祥³⁾ 胡 慧¹⁾ 夏 秋¹⁾ 王鹏银¹⁾ 郁 丽¹⁾冯婉瑜¹⁾ 盛 蕾^{1)**}⁽¹⁾ 南京体育学院运动健康学院, 南京 210014; ⁽²⁾ 江苏省运动与健康工程协同创新中心, 南京 210014;⁽³⁾ 上海体育学院运动科学学院, 上海 200438)

摘要 目的 探讨肥胖对大鼠生精小管结构及自噬和凋亡相关蛋白质的影响, 并探讨运动对睾丸自噬和凋亡的影响及其调控机制。**方法** 将50只6周龄雄性SD大鼠随机分为标准饲养组(SD组, $n=20$)和高脂饲养组(HFD组, $n=30$)。HFD组喂养8周建立肥胖大鼠模型, 并随机筛选出20只肥胖大鼠进行运动干预。SD组和HFD组分别随机分为标准对照组(CC组)、标准运动组(CE组)、肥胖对照组(OC组)、肥胖运动组(OE组), 每组10只。其中CE组和OE组进行8周中等强度跑台运动干预, 60 min/d, 5 d/周, 其他两组维持原饲养条件。在最后一次运动结束48 h后, 将大鼠腹腔麻醉, 称重, 取大鼠左右两侧睾丸、称量睾丸重量并计算睾丸指数。制作睾丸石蜡切片, 利用HE染色法观察睾丸组织结构。采用蛋白质印迹法(Western blot)检测睾丸组织中p62、LC3II、LC3I、BCL-2、Bax和AMPK蛋白表达量并计算LC3II/LC3I比值, 采用免疫荧光检测睾丸中LC3和BCL-2蛋白表达位置。**结果** 与CC组相比, OC组大鼠睾丸指数降低, 生精小管直径显著降低($P<0.01$), 精子细胞减少, 睾丸组织中有脂滴沉积现象, 睾丸组织中p62和Bax蛋白表达显著升高($P<0.01$), AMPK、LC3II/LC3I比值和BCL-2蛋白表达显著降低($P<0.01$), 精子细胞上LC3蛋白数量明显减少。运动干预后, 与OC组相比, OE组大鼠睾丸指数升高, 生精小管直径($P<0.01$)和精原细胞数量($P<0.05$)显著升高, 生精小管结构改善, 睾丸组织中p62和Bax蛋白表达显著降低($P<0.01$), AMPK、LC3II/LC3I比值和BCL-2蛋白表达显著升高($P<0.01$), 大鼠精母细胞和精子细胞中BCL-2蛋白表达数量明显增加。所有大鼠睾丸组织中AMPK与p62、LC3II/LC3I、Bax蛋白表达为强相关。**结论** 高脂饮食诱导的肥胖会抑制大鼠睾丸组织中自噬过程、促进凋亡发生; 8周中等强度运动可能通过AMPK激活睾丸组织中的自噬并抑制凋亡, 矫正肥胖带来的精子发生过程的异常。

关键词 运动, 肥胖, 睾丸, 自噬, 凋亡, AMPK**中图分类号** R804.7**DOI:** 10.16476/j.pibb.2022.0428

肥胖是一种由行为、环境和遗传原因引起的代谢紊乱疾病, 除导致2型糖尿病、高血压、胰岛素抵抗等代谢紊乱疾病发生外, 也会对生殖功能产生不良影响。男性不育症随着肥胖和代谢综合征的增加而持续增加^[1-2]。肥胖会诱发精子质量下降、生殖细胞凋亡、精子DNA损伤、睾酮分泌不足等生殖功能相关问题的发生^[3-5]。随研究的深入发现, 高脂饮食诱导的肥胖^[6]、糖尿病^[7]等能量过剩条件可能通过自噬诱导精子缺陷和睾丸损伤的发生。自噬是依靠溶酶体的保守的自我消化过程, 通过清除蛋白质聚集体、受损细胞器和脂滴起到维持细胞内稳态的保护作用^[8], 在睾丸组织中广泛参与精子发生过程, 参与精子细胞顶体形成和鞭毛发育, 去除不必要的细胞质, 并通过改变细胞骨架重塑细

胞形状^[9]。特异性敲除生殖细胞中自噬相关基因ATG5、ATG7会导致小鼠出现精子数量降低, 生育能力下降的现象^[10-11]。当自噬不足以保护细胞免受应激损伤时, 细胞就会发生凋亡, 二者往往相伴出现。睾丸细胞中适当的凋亡能够清除异常及过量的生精细胞, 以保证精子的正常发育和成熟, 但过度的凋亡会导致少精或弱精^[12-13]。

脂肪过度堆积导致的脂毒性损伤可能会抑制非

* 江苏省教育厅自然科学基金(19KJB180018), 南京体育学院重点实验室项目(SYS202102)和江苏省教育厅高校大学生创新创业训练计划(202110330033Y)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 025-84755226, E-mail: 735888670@163.com

收稿日期: 2022-09-07, 接受日期: 2022-12-21

脂肪组织的自噬^[14]。肥胖和高脂饮食环境可能会通过抑制腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 磷酸化和激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 来抑制 UNC-51 样激酶 1 (ULK-51-like kinase 1, ULK1), 从而抑制自噬的发生。也有研究发现, 肥胖小鼠睾丸中自噬标志物微管相关轻链蛋白 3 (microtubule-associated protein 1-light chain 3, LC3) 生成及选择性自噬接头蛋白 1 (sequestosome-1, SQSTM1/p62) 降解减少^[15]。提示肥胖可能抑制睾丸自噬过程的各个阶段。肥胖诱发自噬过程出现障碍的同时也会诱导生殖细胞凋亡^[14]。肥胖会抑制抗凋亡的 B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma-2, BCL-2) 蛋白, 上调促凋亡的 BCL-2 相关 X (BCL 2-associated X, Bax) 蛋白和胱天蛋白酶 (cysteine specific proteinase, Caspase) 3 表达, 导致生殖细胞过度凋亡^[16-18], 并使睾丸组织中细胞数量减少^[19], 睾酮分泌随之受到抑制^[20]。

AMPK 作为一种能量感应激酶可被 ATP 消耗激活, 其在激活自噬、抑制凋亡过程中发挥重要的生物学调节效应。一方面, 磷酸化的 AMPK 可直接或间接磷酸化 ULK1 诱导自噬的启动^[21]。另一方面, AMPK 的激活已被证明可以防止高血糖或高脂肪诱导的血管内皮细胞和心肌细胞凋亡细胞死亡^[22-23]。在睾丸组织中, AMPK 抑制也被发现与睾丸间质细胞凋亡有关^[24]。运动在促进能量消耗、改善肥胖对雄性生殖功能的负面影响, 促进睾酮合成等方面的作用早被证实^[25]。而在这一过程中, 运动是否通过激活 AMPK 来逆转由于肥胖导致的睾丸自噬与凋亡异常, 继而使睾丸的结构和功能得到改善? 目前尚未可知。本研究通过高脂饮食喂养建立肥胖大鼠模型, 并对其进行 8 周中等强度运动干预, 观察运动和肥胖对大鼠生精小管结构及自噬和凋亡相关蛋白质的影响, 旨在为运动改善肥胖群体睾丸组织损伤、生殖功能障碍的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

清洁级 6 周龄 SD 雄性成年大鼠 50 只 (初始体重为 (220.6 ± 5.3) g), 购于浙江维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号为 SMCXK (浙) 2019-0001。适应性饲养 1 周后, 将大鼠随机分为

标准饲料 (SLACOM, P1101F-25) 饲养组 (SD, $n=20$) 和高脂饲料 (Research Diet, D12451, 能量配比为蛋白质 20%、碳水化合物 35%、脂肪 45%) 饲养组 (HFD, $n=30$)。所有大鼠分笼饲养于江苏省农业科学院动物研究所鼠动物房 (5 只/笼), 光照 12 h/d, 室温 (24 ± 4) °C, 相对湿度 (50 ± 10) %, 自由饮食。第 8 周末, 将 HFD 组体重超过标准饮食组 20%~30% (包含 20%) 者判定为肥胖大鼠 ($n=20$)^[26]。将 SD 组大鼠分为标准对照组 (CC, $n=10$) 和标准运动组 (CE, $n=10$), 将建模成功的肥胖大鼠分为肥胖对照组 (OC, $n=10$), 肥胖运动组 (OE, $n=10$), 所有大鼠维持原有饲养条件并对运动组大鼠施加运动干预。

本研究经南京体育学院实验动物伦理委员会批准, 符合 3R 标准, 批号为 2019-009。

1.2 运动干预

CE 和 OE 组大鼠进行为期 8 周的中等强度运动干预。正式运动前进行 3 d 适应性运动, 15 min/d, 适应性速度为 8 m/min。正式运动阶段进行 60%~70% $V \cdot O_{2max}$ 强度的跑速, 60 min/d, 5 d/周。实验期间, 运动速度参考 Leandro 等^[27] 改良测试 $V \cdot O_{2max}$ 测试方案及本研究团队前期 $V \cdot O_{2max}$ 测试结果^[28] 而定, 每 2 周调整一次跑速 (第 1~2 周 $v=11$ m/min, 第 3~4 周 $v=13$ m/min, 第 5~6 周 $v=14$ m/min, 第 7~8 周 $v=15$ m/min)。

1.3 实验取材

运动干预第 8 周末, 在最后一次运动 48 h 后, 所有大鼠经 20% 乌拉坦溶液进行腹腔注射麻醉 (1 ml/100 g 体重), 称量体重后腹主动脉取血, 剥离睾丸并称重。根据体重和睾丸重量计算睾丸指数: 睾丸指数 = $[(\text{睾丸质量/g}) / (\text{身体质量/g})] \times 100\%$ 。其中一侧睾丸置于 4% 多聚甲醛固定液中, 另侧睾丸在冰上剪碎分装至冻存管中, 放入液氮中冷冻, 取样结束后转移至 -80°C 冻存待用。

1.4 指标测试与方法

1.4.1 苏木精-伊红 (HE) 染色

将多聚甲醛固定的一侧睾丸石蜡包埋, 进行横向切片, 厚度为 5 μm 。石蜡切片经二甲苯脱蜡 2 次, 乙醇梯度脱水处理后至苏木精溶液染色, 染色后 1% 盐酸乙醇分化, 再至伊红溶液染色, 随后用乙醇溶液 (50%、70%、90%、100%) 分别冲洗 5 min。二甲苯透明 2 次后, 中性树胶封固。在显微镜 100 或 200 倍镜下每进行观察拍摄, 每组随机选择 5 只大鼠, 从每只大鼠中选取 4 个切片, 利用

显微镜选择视野内具有代表性的生精小管进行拍摄, 采用 ImageJ 软件测量生精小管直径 (单位: μm) 及精原细胞个数^[29]。共测量 20 个生精小管直径, 并在 20 个下视野计数精原细胞数量。

1.4.2 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测

取 20 mg 睾丸组织与 400 μl 加有蛋白酶抑制剂的裂解液于研磨管中, 充分裂解, 离心, 取上清液。BCA 法测定蛋白质浓度。配置浓度为 10% 和 12.5% 的 SDS-PAGE 胶, 上样量 8 μl , 电泳恒压 70 V, 约 60 min 后转恒压 90 V 继续电泳 75 min。湿转法 PVDF 膜转膜 75 min 后, 5% 脱脂牛奶封闭 60 min, 一抗按照 AMPK (Abcam, ab32047, 1 : 6 000)、p62 (Santa Cruz Biotechnology, sc-48402, 1 : 700)、GAPDH (CST, 5174T, 1 : 1 000)、BCL-2 (Proteintech, 60178-1-Ig, 1 : 8 000)、Bax (Proteintech, 50599-2-Ig, 1 : 10 000)、LC3 (Proteintech, 14600-1-AP, 1 : 2 000) 的比例进行稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日, 二抗室温孵育 60 min, 稀释比例为山羊抗小鼠 (HUBIO, HA1006, 1 : 1 000), 山羊抗兔 (HUBIO, HA1006, 1 : 1 000)。化学发光凝胶成像仪暗室中曝光显影。采用 ImageJ 软件对蛋白质条带进行灰度值分析, 以 GAPDH 为内参, 目的蛋白相对表达量=目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值。

1.4.3 免疫荧光染色

石蜡切片脱蜡通透后至柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复, PBS 清洗 3 遍后滴加山羊血清, 覆盖组织封闭 30 min。随后进行一抗孵育, 一抗稀释比例为 BCL-2 (Proteintech, 60178-1-Ig, 1 : 500)、LC3 (Proteintech, 14600-1-AP, 1 : 300), 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 次日复温 PBS 清洗, 避光二抗孵育 2 h, 稀释比列为山羊抗兔 (Abcam, ab150077, 1 : 500)、山羊抗小鼠 (Abcam, ab150116, 1 : 500) 稀释孵育 2 h。最后滴加含 DAPI 的抗荧光猝灭剂, 盖玻片轻盖封片。每组随机选择 5 张切片, 在显微镜 400 倍镜下每张切片随机选择 5 个非连续视野进行观察拍摄。使用 ImageJ 软件对 BCL-2 和 LC3 免疫荧光进行定位和半定量图像分析。

1.5 数据统计分析

所得数据运用 SPSS 22.0 和 R 语言进行整理分析, 采用 Shapiro-Wilk 法对各指标数值进行正态性检验, 符合正态分布的数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示。以高脂饮食和运动作为影响因素进行 2 (干预前后) $\times$ 2 (高脂饮食和运动干预) 双因素

方差分析, 对每个因素的主效应和交互作用进行 Bonferroni 检验; 蛋白质指标间的相关关系表示为 Pearson 相关系数, 相关系数 0.8 以上为极强相关, 0.6~0.8 为强相关, 0.4~0.6 为中等程度相关, 0.2~0.4 为弱相关, 0.2 以下为极弱相关或无相关。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠肥胖模型建立

大鼠基础体重为 (220.6 ± 5.3) g, 分别对 SD 组和 HFD 组进行标准饲料和高脂饲料喂养。喂养 2 周后 SD 组大鼠体重为 (349.79 ± 15.3) g, HFD 组大鼠体重为 (376.19 ± 14.13) g; 喂养 4 周后 SD 组大鼠体重为 (435.73 ± 30.84) g, HFD 组大鼠体重为 (529.58 ± 34.9) g; 喂养 6 周后 SD 组大鼠体重为 (487.49 ± 28.68) g, HFD 组大鼠体重为 (573.06 ± 51.29) g; 喂养 8 周后 SD 组大鼠体重为 (494.46 ± 28.04) g, HFD 组大鼠体重为 (641.68 ± 43.37) g (图 1)。在 8 周建模结束后, HFD 组的体重比 SD 组高 29.77% ($>20\%$), 表明肥胖建模成功。

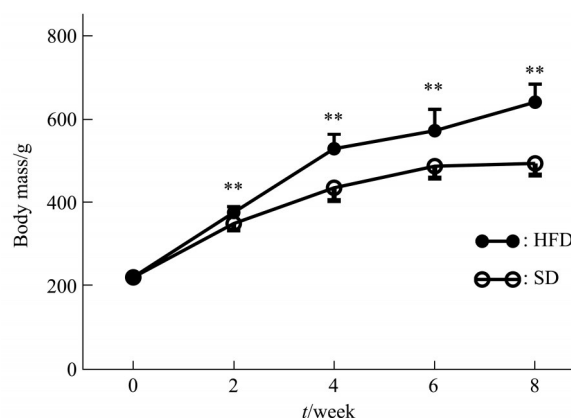


Fig. 1 The change of body mass during the establishment of obesity model

Body mass in the SD and HFD group after 2, 4, 6, 8-week raising. Data represent mean values $\pm$ SD. $n=20$ in SD group, $n=30$ in HFD group. ** $P < 0.01$ vs SD group.

2.2 运动干预对肥胖大鼠体重及睾丸指数的影响

8 周干预后, 与 CC 组相比较, OC 组大鼠体重升高, CE 组大鼠体重降低, 与 OC 组相比较, OE 组大鼠体重降低, 均具有统计学显著意义 (图 2a, $P < 0.01$)。双因素方差分析结果表明, 高脂饮食 ($F_{(1, 20)} = 40.395$, 偏 $\eta^2 = 0.669$, $P < 0.001$) 和运动 ($F_{(1, 20)} = 44.225$, 偏 $\eta^2 = 0.689$, $P < 0.001$) 分别对大

鼠体重影响的主效应效果显著,但二者对于体重的影响不存在交互作用 ($F_{(1,20)}=1.314$, 偏 $\eta^2=0.062$, $P=0.265$)。与CC组相比较,CE组大鼠睾丸指数增加 ($P<0.05$),OC组大鼠睾丸指数有降低趋势,但无显著性差异 ($P>0.05$) (图2b)。双因素方差分析结果高脂饮食 ($F_{(1,20)}=5.951$, 偏 $\eta^2=0.229$, $P=0.024$) 和运动 ($F_{(1,20)}=7.043$, 偏 $\eta^2=0.26$, $P=$

0.015) 对睾丸指数影响的主效应显著,但高脂饮食和运动对大鼠睾丸指数影响不存在交互作用 ($F_{(1,20)}=0.589$, 偏 $\eta^2=0.029$, $P=0.452$)。这表明运动与饮食对体重与睾丸指数均不存在交互作用,主效应分析显示运动与高脂饮食分别对体重与睾丸指数的影响具有统计学意义。

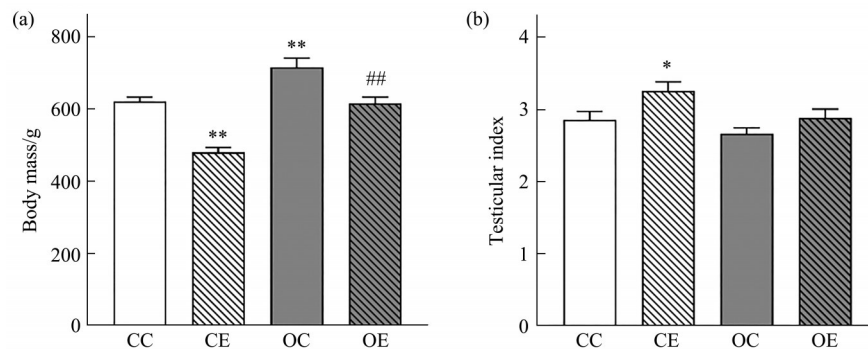


Fig. 2 Comparison of body mass and testis index in each group

(a) Body mass in the CC, CE, OC, and OE group. (b) Testis index in the CC, CE, OC, and OE group. Testis index = $\frac{\text{testis mass/g}}{\text{body mass/g}} \times 100\%$. Data represent mean values $\pm$ SEM. $n=10$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CC group, ## $P<0.01$ vs OC group.

2.3 运动干预对肥胖大鼠睾丸形态结构的影响

通过观察睾丸HE染色结果 (图3) 发现,与CC组相比,OC组睾丸组织各级生精细胞排列混乱,生精细胞层数和精原细胞数量降低,出现脂滴沉积,间质细胞和支持细胞数量有所减少,生精小管直径显著降低 (图4a, $P<0.05$)。运动干预后,与OC组相比较OE组大鼠生精细胞层数有所增加,细胞间脂滴沉积减少,间质细胞和支持细胞数量有所增加,生精小管直径和精原细胞数量显著升高

(图4, $P<0.05$)。双因素方差分析结果显示,高脂饮食 ($F_{(1,96)}=0.073$, 偏 $\eta^2=0.001$, $P<0.001$) 和运动 ($F_{(1,96)}=158.92$, 偏 $\eta^2=0.623$, $P<0.001$) 分别对于生精小管直径的主效应效果显著,但二者不存在交互作用 ($F_{(1,96)}=2.501$, 偏 $\eta^2=0.025$, $P=0.117$)。对于精原细胞数量而言 (图4b), 高脂饮食的主效应效果不显著 ($F_{(1,96)}=0.073$, 偏 $\eta^2=0.001$, $P=0.787$), 运动的主效应显著 ($F_{(1,96)}=158.92$, 偏 $\eta^2=0.623$, $P<0.001$), 二者对大鼠精原

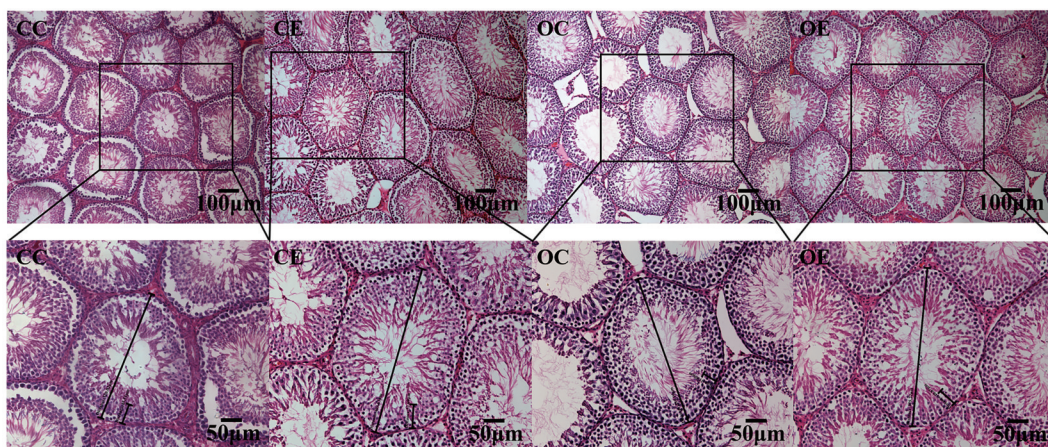


Fig. 3 HE staining in each group

Morphological changes of rat testicular tissue. $n=20$ shooting views of hematoxylin-eosin results.

细胞数量的影响不存在交互作用 ($F_{(1, 96)}=2.501$, 偏 $\eta^2=0.025$, $P=0.117$), 表明运动干预能够显著升

高肥胖大鼠生精小管直径和精原细胞数量。

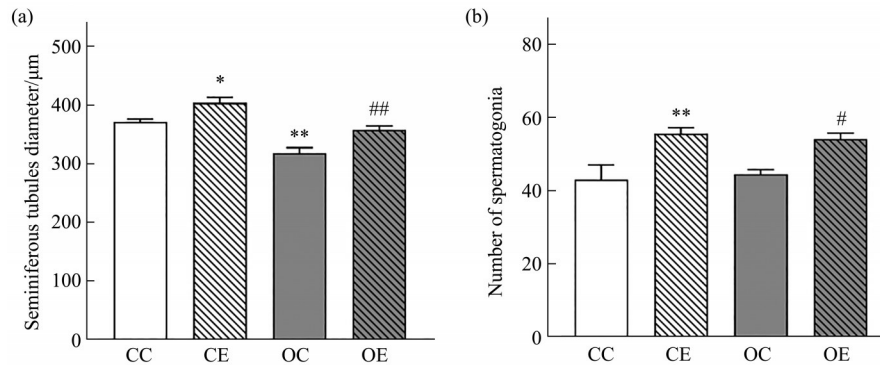


Fig. 4 Comparison of seminiferous tubules diameter and number of spermatogonia in each group

(a) Seminiferous tubules diameter in the CC, CE, OC, and OE group. (b) The number of spermatogonia in the CC, CE, OC, and OE group. Data represent mean values $\pm$ SEM. $n=20$ shooting views. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CC group, # $P<0.05$ vs OC group, ## $P<0.01$ vs OC group.

2.4 运动干预对肥胖大鼠睾丸组织p62和LC3蛋白表达的影响

与CC组相比, OC组睾丸中p62表达水平升高, LC3II/LC3I降低, CE组大鼠睾丸中p62表达水平降低, 与OC组相比, OE组大鼠睾丸中p62表达水平降低LC3II/LC3I升高, 均具有统计学显著意义(图5, $P<0.01$)。双因素方差分析结果表明, 高脂饮食对睾丸内p62 ($F_{(1, 20)}=54.36$, 偏 $\eta^2=0.731$, $P<0.001$) 和LC3 ($F_{(1, 20)}=19.445$, 偏 $\eta^2=0.493$, $P<0.001$) 蛋白表达的主效应均效果显著, 运动干预对睾丸内p62 ($F_{(1, 20)}=208.968$, 偏 $\eta^2=0.913$, $P<0.001$) 和LC3 ($F_{(1, 20)}=7.144$, 偏 $\eta^2=0.263$, $P=0.015$) 蛋白表达的主效应均显著, 高脂饮食和运动对睾丸内p62蛋白表达的影响具有交互作用 ($F_{(1, 20)}=26.407$, 偏 $\eta^2=0.569$, $P<0.001$), 但对LC3蛋白表达的影响不存在交互作用 ($F_{(1, 20)}=3.891$, 偏 $\eta^2=0.163$, $P=0.063$)。提示高脂饮食和运动干预两个因素对自噬相关蛋白质均有显著影响, 运动干预能够显著下调肥胖大鼠睾丸p62蛋白表达, 提高LC3II/LC3I蛋白表达。

如图6所示, 利用免疫荧光技术对睾丸组织中LC3蛋白进行定位后发现, LC3主要表达于生精小管内的精母细胞, 精子细胞以及精子等生精细胞中, 睾丸间质细胞中较少。与CC组相比较, OC组LC3蛋白数量减少; 与OC组相比较, OE组大鼠睾丸LC3蛋白表达数量增加, 且在精子位置表现出明显增加。说明运动干预主要提高肥胖大鼠精子细胞位置中的自噬活性。

2.5 运动干预对肥胖大鼠睾丸组织BCL-2和Bax蛋白表达的影响

与CC组相比较, OC组大鼠睾丸中BCL-2蛋白表达水平降低, Bax蛋白表达水平升高, 与OC组相比较, OE组大鼠睾丸组织中BCL-2蛋白表达水平升高, Bax蛋白表达水平降低, 均具有统计学显著意义(图7a~c, $P<0.01$)。双因素方差分析结果表明, 高脂饮食对BCL-2 ($F_{(1, 20)}=4.362$, 偏 $\eta^2=0.179$, $P=0.049$) 和Bax ($F_{(1, 20)}=84.486$, 偏 $\eta^2=0.809$, $P=0.001$) 蛋白表达影响的主效应显著, 运动干预对BCL-2 ($F_{(1, 20)}=15.913$, 偏 $\eta^2=0.443$, $P=0.001$) 和Bax ($F_{(1, 20)}=15.873$, 偏 $\eta^2=0.442$, $P=0.001$) 蛋白表达影响的主效应显著, 且二者对BCL-2 ($F_{(1, 20)}=11.627$, 偏 $\eta^2=0.368$, $P=0.003$) 和Bax ($F_{(1, 20)}=13.512$, 偏 $\eta^2=0.442$, $P=0.001$) 蛋白表达的影响均存在交互作用。提示高脂饮食和运动干预对于BCL-2和Bax蛋白均有显著影响, 运动干预能够显著升高肥胖大鼠睾丸BCL-2蛋白表达, 下调Bax蛋白表达。

如图8所示, 利用免疫荧光技术对睾丸组织中BCL-2蛋白进行定位后发现, BCL-2蛋白主要表达于生精小管中生精细胞中。与CC组相比较, 高脂饮食干预后OC组生精小管内BCL-2蛋白表达数量降低; 与OC组相比较, OE组大鼠睾丸生精小管中BCL-2蛋白表达数量增加, 尤其是在精母细胞和精子细胞中, 增加效果明显。说明运动干预抑制肥胖大鼠睾丸精母细胞和精子细胞中的凋亡过程。

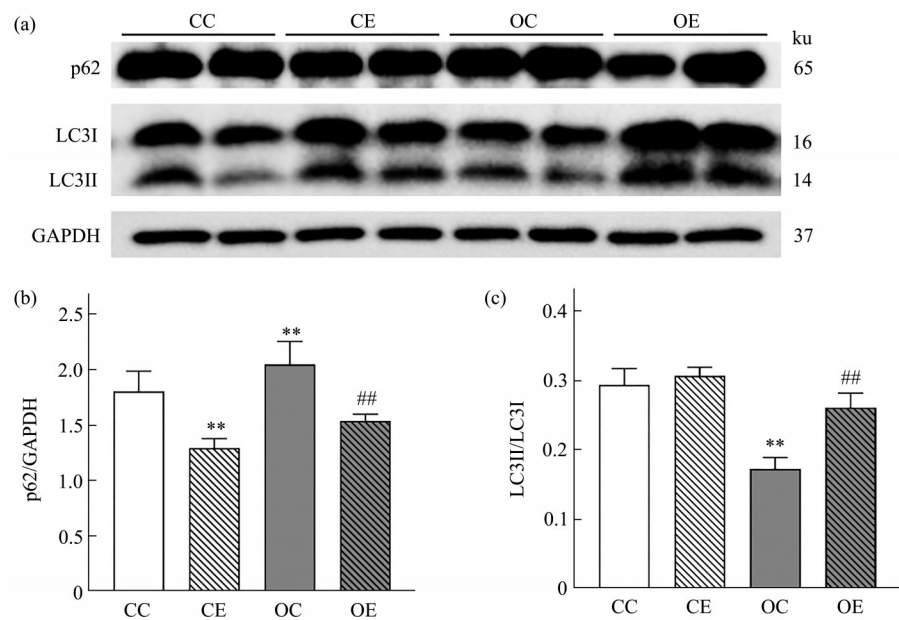


Fig. 5 Comparison of p62 and LC3II/LC3I in each group

(a) Electrophoretic band for p62, LC3I, LC3II, and GAPDH. (b) The protein levels of p62 in each group. (c) The protein levels of LC3II/LC3I in each group. Data represent mean values $\pm$ SEM. $n=6$ times Western blot results. ** $P < 0.01$ vs CC group, ## $P < 0.01$ vs OC group.

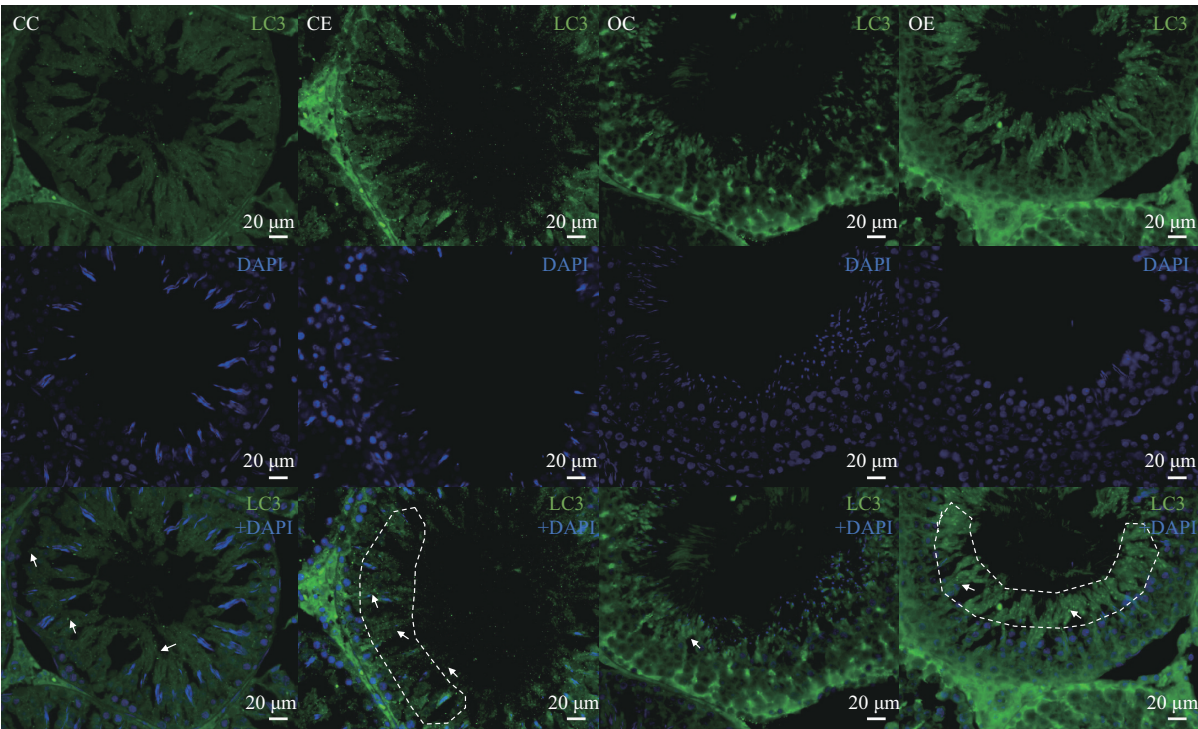


Fig. 6 Immunofluorescence of LC3 protein in testicular tissue in each group

Autophagy of LC3 determined by immunofluorescence in the testicular tissue in CC, CE, OC, and OE group. $n=25$ shooting views of immunofluorescence results.

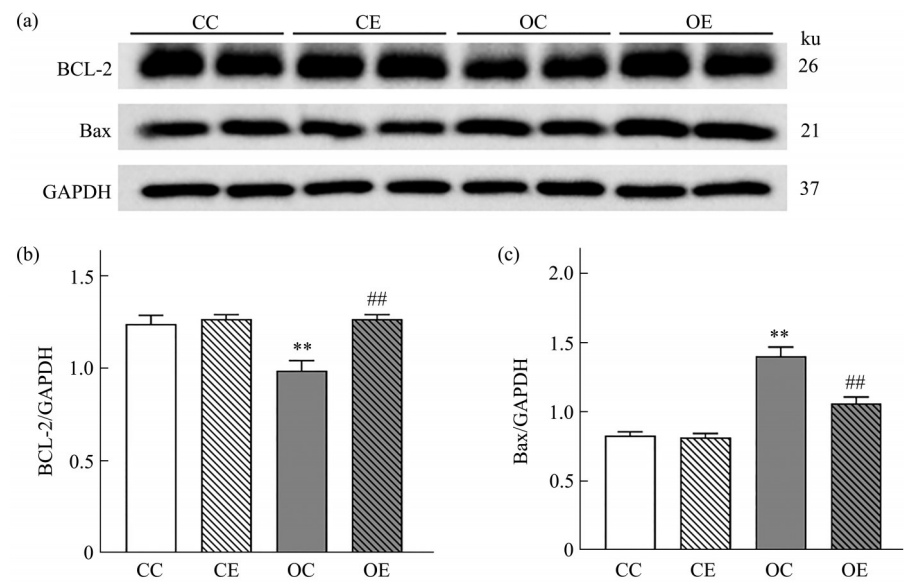


Fig. 7 Comparison of BCL-2 and Bax in each group

(a) Electrophoretic band for BCL-2 and Bax. (b) The protein levels of BCL-2 in each group. (c) the protein levels of Bax in each group. Data represent mean values $\pm$ SEM. $n=6$ times Western blot results. $**P<0.01$ vs CC group, $^{##}P<0.01$ vs OC group.

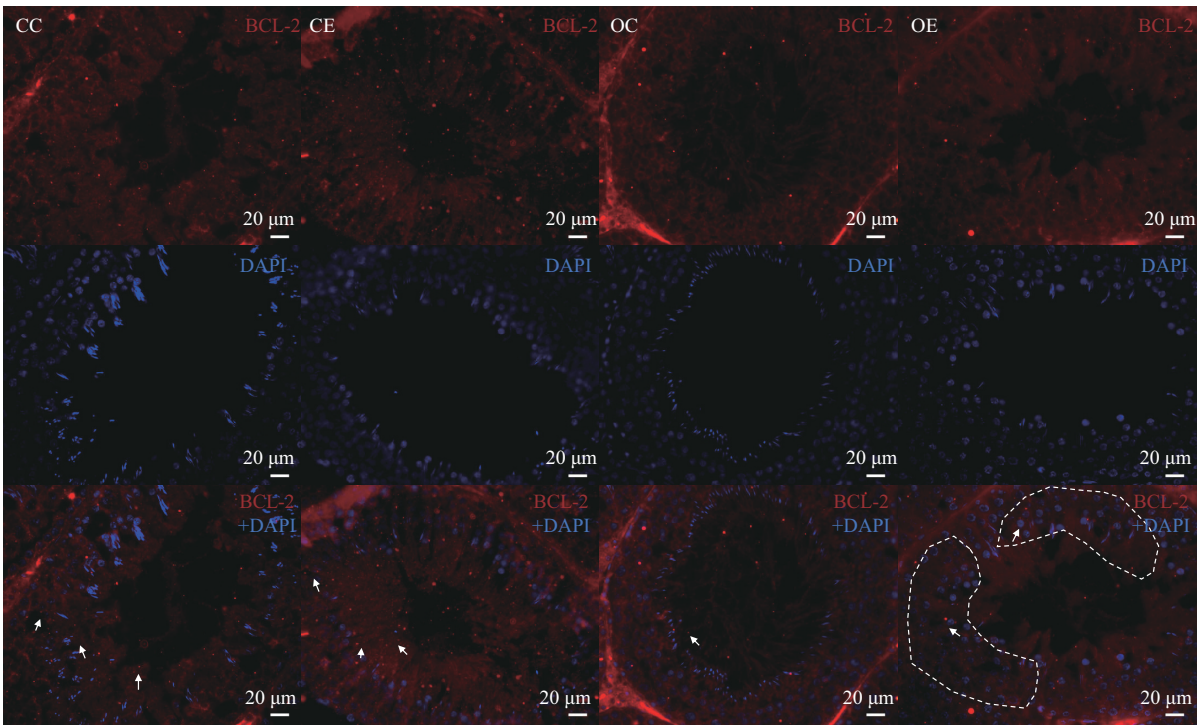


Fig. 8 Immunofluorescence of BCL-2 protein in testicular tissue in each group

Apoptosis of BCL-2 determined by immunofluorescence in the testicular tissue in CC, CE, OC, and OE group. $n=25$ shooting views of immunofluorescence results.

2.6 运动干预对肥胖大鼠睾丸组织AMPK蛋白表达的影响

与CC组相比较, OC组大鼠睾丸组织中AMPK表达水平显著降低, 与OC组相比较, OE组AMPK蛋白表达水平显著升高, 均具有统计学显著意义(图9a, b, $P<0.01$)。双因素方差分析结果表明, 高脂饮食($F_{(1, 20)}=237.192$, 偏 $\eta^2=0.922$, $P<0.001$)和运动($F_{(1, 20)}=95.644$, 偏 $\eta^2=0.827$, $P<0.001$)干预对睾丸内AMPK蛋白表达的主效应效果均显著, 且二者对睾丸内AMPK蛋白表达的影响具有交互作用($F_{(1, 20)}=0.456$, 偏 $\eta^2=0.182$, $P=0.048$)。

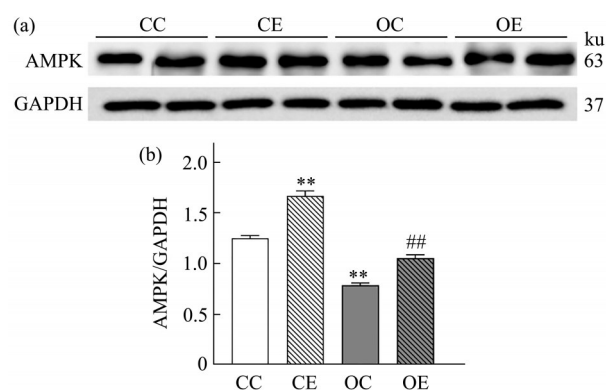


Fig. 9 Comparison of AMPK in each group

(a) Electrophoretic band for AMPK. (b) The protein levels of AMPK in each group. Data represent mean values $\pm$ SEM. $n=6$ times Western blot results. ** $P<0.01$ vs CC group, ## $P<0.01$ vs OC group.

2.7 睾丸组织AMPK与自噬和凋亡相关蛋白变化关系

由大鼠睾丸组织中AMPK与自噬和凋亡相关蛋白质的相关关系图(图10)可知, 饼状图中颜色面积越大, 相关度越高。图中以颜色表示相关性, 红色为负相关, 蓝色为正相关。通过对所有大鼠睾丸组织中AMPK与p62、LC3II/LC3I、BCL-2和Bax蛋白表达的相关性分析, 发现AMPK与p62、LC3II/LC3I、Bax蛋白表达均为强相关($P<0.001$)。

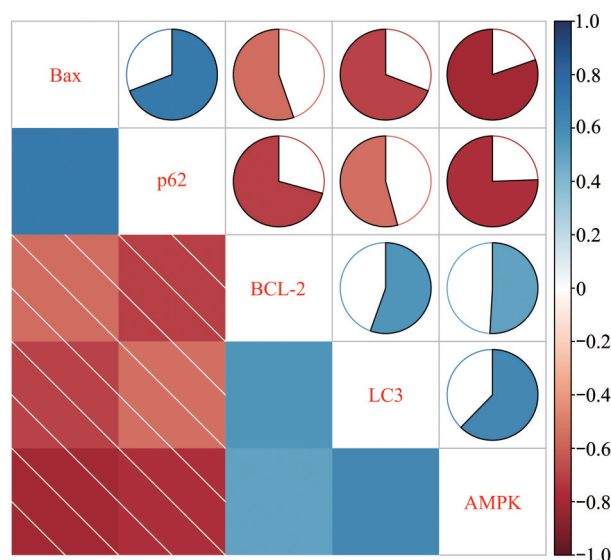


Fig. 10 The correlation between AMPK and Bax, p62, BCL-2, and LC3 in the testicular tissue

The color of red represents a negative correlation and the blue represents a positive correlation; the larger the color area in the pie chart, the higher the correlation.

3 讨论

高脂饮食和静坐少动的生活行为是导致肥胖发生的主要因素, 过度的脂肪堆积导致机体出现能量失衡, 在诱发代谢相关疾病的同时导致生殖功能障碍。运动作为促进脂肪分解的最佳手段之一, 对肥胖哺乳动物生殖功能的改善也有积极的作用, 而这一过程可能通过细胞自噬和凋亡介导^[30-31], 但机制尚不明确。本研究通过对肥胖大鼠进行8周中等强度运动干预, 通过观察生精小管结构, 并检测运动激活自噬与凋亡过程相关的蛋白质, 探究运动对肥胖大鼠睾丸组织的影响及其可能机制。

肥胖或高脂饮食环境状态下, 脂肪堆积会导致生殖器官、肝脏、骨骼肌等非脂肪组织的损伤从而导致其功能障碍^[32-34]。在本实验中, 高脂饮食诱导的肥胖大鼠在体重显著增加的同时, 睾丸指数降低, 睾丸组织中出现脂滴沉积, 生精小管中精子数量明显减少。自噬虽有清除损伤细胞和消除脂滴的

作用,但在营养过剩等正能量平衡条件下随AMPK的抑制、mTORC1的激活而受到抑制,导致自噬过程无法启动。本研究结果表明,肥胖大鼠睾丸组织在出现脂滴沉积、精子数量减少等现象的同时,LC3II/LC3I比值显著降低,p62蛋白水平明显升高,同时AMPK蛋白表达受到抑制。在自噬发生过程中,LC3I需要不断脂化形成LC3II,促进自噬体膜的形成,因此一般以LC3I向LC3II转化的比例作为判断自噬活性的标志^[35]。张欣等^[36]对大鼠进行高脂高糖饮食干预后也发现,附睾组织中自噬相关蛋白LC3表达水平降低,p62蛋白表达水平增高,自噬过程受到抑制。此外,本研究利用免疫荧光手段对睾丸组织中LC3蛋白表达位置进行检测发现,肥胖大鼠睾丸组织中LC3蛋白的减少主要发生在生精细胞中,尤其是在生精细胞和精子中出现明显的减少。提示高脂饮食带来的肥胖通过抑制生精细胞中的自噬活性来影响睾丸的功能。

激活自噬能够改善能量过剩条件下的睾丸组织损伤。冯劲宜等^[37]发现经腹腔注射脂联素治疗的糖尿病小鼠睾丸p62 mRNA表达水平降低,LC3 mRNA表达水平升高,且生精小管形态有所改善,生精细胞及支持细胞数目明显增加。Gamberi等^[38]通过细胞实验验证了脂联素可通过激活AMPK诱导骨骼肌细胞的自噬、抑制凋亡,促进肌细胞存活。本研究对肥胖大鼠进行8周中等强度运动干预后,大鼠体重显著降低、睾丸指数升高的同时,睾丸组织中脂滴沉积现象明显减少,生精细胞层数和精子数量增加,大鼠睾丸组织内AMPK和LC3II/LC3I比值升高,p62蛋白表达降低。夏俊等^[39]对肥胖大鼠进行10周游泳运动干预后发现,游泳运动使大鼠睾丸组织内自噬标志物LC3II表达增多,p62累积减少,与本研究结果相一致。本研究通过免疫荧光定位还观察到,运动对于睾丸LC3蛋白影响作用显著,在运动干预后正常饮食和高脂饮食的大鼠睾丸组织中LC3蛋白含量在精子和精原细胞位置均表现出明显增加,同时HE染色结果也显示在运动刺激下生精小管中精原细胞数量会出现增加,提示运动后精原细胞的变化可能是由于自噬过程介导。而AMPK可能是运动激活自噬的关键因子,在本研究中,睾丸组织中AMPK的表达水平受运动干预影响显著,在运动刺激下正常饮食和高

脂饮食诱导的肥胖大鼠睾丸组织中AMPK蛋白表达水平均出现明显升高,且与自噬相关蛋白均呈强相关。谢凌坚等^[40]报道了6周高强度间歇运动能显著增加野生型小鼠骨骼肌细胞中AMPK α 2的磷酸化水平,LC3II/LC3I比值显著增加,p62表达显著减少,但在AMPK α 2基因敲除的小鼠中自噬活性未明显增加,说明AMPK在运动激活自噬的过程中发挥重要作用,而在睾丸组织中运动也可能通过AMPK诱导睾丸组织自噬的发生。

自噬与细胞凋亡存在交互作用,肥胖在抑制睾丸组织自噬的同时也会诱导生殖细胞凋亡。在超重及肥胖男性不育患者中,精子早期凋亡率明显增高且身体质量指数(BMI)与精子活动率呈负相关性^[41]。Zhu等^[42]发现肥胖男性中BCL-2/Bax比值在基因与蛋白质表达均出现下调。在动物实验也发现,8周高脂饮食后大鼠睾丸生精小管直径、生精细胞及间质细胞计数降低的同时,BCL-2表达减少,Bax表达升高^[43]。在本研究中也观察到,肥胖导致大鼠生精小管直径减少,各级生精细胞排列混乱的同时,睾丸组织内Bax表达增加,BCL-2表达减少,从免疫荧光检测结果来看,凋亡的发生位置主要在生精细胞中。说明肥胖通过激活凋亡信号通路促进生精细胞中凋亡相关因子的表达,导致生精障碍,从而影响生殖功能。

运动在改善肥胖哺乳动物细胞凋亡中发挥积极作用早有报道。前期研究发现,运动能够改善由于肥胖导致的骨骼肌和海马体中的细胞凋亡^[44-45]。对肥胖小鼠进行8周的中等强度跑台运动可使睾丸曲细精管结构得到改善,Bax表达下调,BCL-2表达上升^[46]。在本研究中,运动干预使肥胖大鼠睾丸组织内BCL-2蛋白表达上调,Bax蛋白表达下降,说明运动可抑制由肥胖导致的睾丸细胞凋亡现象。同时,本研究还发现,运动干预对于睾丸细胞的凋亡的抑制作用主要针对肥胖大鼠,运动干预后正常饮食大鼠睾丸中凋亡相关蛋白质表达水平未发生显著变化,而肥胖大鼠睾丸组织中的凋亡现象则得到明显抑制,因此猜测运动干预主要在肥胖或高脂饮食环境下对于生殖器官的凋亡起到矫正作用。在睾丸组织中,AMPK除参与启动自噬过程外,也可能参与运动调控凋亡的过程,在本研究中AMPK与Bax呈强相关。Mu等^[47]对肥胖诱导的精

子生成障碍的小鼠模型注射重鸢尾素后,发现鸢尾素可激活 AMPK α 信号通路以减少睾丸细胞的凋亡,当特异性敲除 AMPK α 后,鸢尾素抑制睾丸凋亡的作用消除。推测运动刺激后 AMPK 可能在睾丸细胞自噬和凋亡过程中同时发挥作用,但其机制有待进一步探究。

4 结 论

高脂饮食诱导的肥胖可导致大鼠睾丸组织形态结构的改变,并伴随自噬活性降低,凋亡增加。而8周中等强度运动干预可有效提高肥胖大鼠睾丸组织自噬水平并抑制细胞凋亡,改善生精小管结构,且这一过程可能通过运动激活 AMPK 介导。

参 考 文 献

- [1] Hammiche F, Laven J S, Twigt J M, *et al.* Body mass index and central adiposity are associated with sperm quality in men of subfertile couples. *Hum Reprod*, 2012, **27**(8): 2365-2372
- [2] Leisegang K, Henkel R, Agarwal A. Obesity and metabolic syndrome associated with systemic inflammation and the impact on the male reproductive system. *Am J Reprod Immunol*, 2019, **82**(5): e13178
- [3] Davidson L M, Millar K, Jones C, *et al.* Deleterious effects of obesity upon the hormonal and molecular mechanisms controlling spermatogenesis and male fertility. *Hum Fertil*, 2015, **18**(3): 184-193
- [4] 陈明明, 兰晓煦, 李承勇, 等. 营养性肥胖对青春期雄性大鼠睾丸生精细胞凋亡的影响. *中华男科学杂志*, 2011, **17**(4): 342-347
Chen M, Lan X X, Li C Y, *et al.* *National Journal of Andrology*, 2011, **17**(4): 342-347
- [5] Demirci T, Sahin E. The effect of chronic stress and obesity on sperm quality and testis histology in male rats; a morphometric and immunohistochemical study. *Histol Histopathol*, 2019, **34**(3): 287-302
- [6] Mu Y, Yan W J, Yin T L, *et al.* Diet-induced obesity impairs spermatogenesis: a potential role for autophagy. *Sci Rep*, 2017, **7**: 43475
- [7] 张欣, 马小茹. 自噬与糖尿病睾丸损伤相关性研究进展. *化工时刊*, 2021, **35**(12): 31-35
Zhang X, Ma X R. *Chemical Industry Times*, 2021, **35**(12): 31-35
- [8] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011, **147**(4): 728-741
- [9] Shang Y, Wang H, Jia P, *et al.* Autophagy regulates spermatid differentiation *via* degradation of PDLIM1. *Autophagy*, 2016, **12**(9): 1575-1592
- [10] Huang Q, Liu Y, Zhang S, *et al.* Autophagy core protein ATG5 is required for elongating spermatid development, sperm individualization and normal fertility in male mice. *Autophagy*, 2021, **17**(7): 1753-1767
- [11] Wang H, Wan H, Li X, *et al.* Atg7 is required for acrosome biogenesis during spermatogenesis in mice. *Cell Res*, 2014, **24**(7): 852-869
- [12] Jaiswal M K, Agrawal V, Katara G K, *et al.* Male fertility and apoptosis in normal spermatogenesis are regulated by vacuolar-ATPase isoform a2. *J Reprod Immunol*, 2015, **112**: 38-45
- [13] Moustafa M H, Sharma R K, Thornton J, *et al.* Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*, 2004, **19**(1): 129-138
- [14] Namkoong S, Cho C S, Semple I, *et al.* Autophagy dysregulation and obesity-associated pathologies. *Mol Cells*, 2018, **41**(1): 3-10
- [15] Yoshizaki T, Kusunoki C, Kondo M, *et al.* Autophagy regulates inflammation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, **417**(1): 352-357
- [16] Yan W J, Mu Y, Yu N, *et al.* Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist Reprod Genet*, 2015, **32**(7): 1097-1104
- [17] Wang H, Cai Y, Shao Y, *et al.* Fish oil ameliorates high-fat diet induced male mouse reproductive dysfunction *via* modifying the rhythmic expression of testosterone synthesis related genes. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(5): 1325
- [18] Suleiman J B, Mohamed M, Abu Bakar A B, *et al.* Therapeutic effects of bee bread on obesity-induced testicular-derived oxidative stress, inflammation, and apoptosis in high-fat diet obese rat model. *Antioxidants (Basel)*, 2022, **11**(2): 255
- [19] Miao X L, Gao G M, Jiang L, *et al.* Asiatic acid attenuates high-fat diet-induced impaired spermatogenesis. *Exp Ther Med*, 2018, **15**(3): 2397-2403
- [20] Katib A. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent European J Urol*, 2015, **68**(1): 79-85
- [21] Alers S, Löffler A S, Wesselborg S, *et al.* Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 2012, **32**(1): 2-11
- [22] 卢婷. AMPK 调控钙内流对高糖诱导的内皮细胞凋亡的影响及其机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2016
Lu T. The Effect and Mechanism of AMPK Regulate Calcium Influx on Endothelial Cell Apoptosis Induced by High Glucose [D]. Chongqing: The Third Military Medical University, 2016
- [23] 尧青, 李勇, 陈晓, 等. 姜黄素对糖尿病大鼠心肌自噬、凋亡及 AMPK-mTOR 信号通路的影响. *中国医院药学杂志*, 2022, **42**(10): 1004-1008
Yao Q, Li Y, Chen X, *et al.* *Chin Hosp Pharm*, 2022, **42**(10): 1004-1008
- [24] 叶小云, 陈亮. 雷公藤甲素介导 AMPK/Akt/mTOR 通路对小鼠 TM3 睾丸间质细胞活性的影响. *中华男科学杂志*, 2019, **25**(9): 787-791
Ye X Y, Chen L. *National Journal of Andrology*, 2019, **25**(9): 787-791
- [25] 衣雪洁, 张士城, 徐思彤, 等. 不同负荷运动对肥胖雄性小鼠睾丸组织氧化应激与生殖功能的影响//中国体育科学学会. 第十

- 一届全国体育科学大会论文摘要汇编. 北京: 中国体育科学学会, 2019: 2383-2384
- Yi X J, Zhang S C, Xu S T, *et al.* Different Intensity of Exercise on Oxidative Stress and Reproductive Function in Testicular Tissue of Obese Male Mice. The 11th National Convention on Sport Science of China Abstracts, 2019: 2383-2384
- [26] Doulberis M, Papaefthymiou A, Polyzos S A, *et al.* Rodent models of obesity. *Minerva Endocrinol*, 2020, **45**(3): 243-263
- [27] Leandro C G, Levada A C, Hirabara S M, *et al.* A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. *J Strength Cond Res*, 2007, **21**(3): 751-756
- [28] 梁春瑜, 严翊, 徐瑞, 等. 不同运动方式对肥胖大鼠脂肪组织 BMP-4 和 BMP-7 及其相关产热调控蛋白表达的影响. 北京体育大学学报, 2020, **43**(7): 116-126
- Liang C Y, Yan Y, Xu R, *et al.* *Journal of Beijing Sport University*, 2020, **43**(7): 116-126
- [29] Matuszewska J, Ziarniak K, Dudek M, *et al.* Effects of short-term exposure to high-fat diet on histology of male and female gonads in rats. *Acta Histochem*, 2020, **122**(5): 151558
- [30] 张博雅. 运动、饮食干预对肥胖小鼠肝脏细胞自噬的影响. 辽宁体育科技, 2021, **43**(5): 62-66
- Zhang B Y. *Liaoning Sport Science and Technology*, 2021, **43**(5): 62-66
- [31] 崔敬. 增龄和不同热量饮食对大鼠肾脏自噬的影响[D]. 北京: 中国人民解放军军医进修学院, 2011
- Cui J. The Effects of Age and Different Calorie Diet on the Function of Autophagy in Rat Kidneys [D]. Beijing: Chinese PLA General Hospital & Postgraduate Medical School, 2011
- [32] Tao T, Xu H. Autophagy and obesity-related reproductive dysfunction. *Adv Exp Med Biol*, 2020, **1207**: 463-466
- [33] Lelliott C, Vidal-Puig A J. Lipotoxicity, an imbalance between lipogenesis *de novo* and fatty acid oxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2004, **28 Suppl 4**: S22-S28
- [34] Michalakakis K, Mintziori G, Kaprara A, *et al.* The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review. *Metabolism*, 2013, **62**(4): 457-478
- [35] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000, **19**(21): 5720-5728
- [36] 张欣, 马小茹, 薛晶文, 等. 灵芝孢子保护糖尿病模型大鼠附睾及对自噬的影响. 中国组织工程研究, 2022, **26**(29): 4632-4637
- Zhang X, Ma X R, Xue J W, *et al.* *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2022, **26**(29): 4632-4637
- [37] 冯劲宜, 郭志新, 石文姣, 等. 重组球形脂联素通过调节自噬及内质网应激对糖尿病小鼠睾丸的保护作用. 解放军医学杂志, 2019, **44**(11): 912-918
- Feng J Y, Guo Z X, Shi W J, *et al.* *Med J Chin PLA*, 2019, **44**(11): 912-918
- [38] Gamberi T, Modesti A, Magherini F, *et al.* Activation of autophagy by globular adiponectin is required for muscle differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 2016, **1863**(4): 694-702
- [39] 夏俊, 李宁川, 宣磊, 等. 有氧运动对高脂诱导肥胖大鼠睾丸组织自噬水平及炎症因子影响研究. 四川体育科学, 2021, **40**(6): 22-25
- Xia J, Li N C, Xuan L, *et al.* Effect of aerobic exercise on autophagy level and inflammatory factors in rat testis induced by high fat, *Sichuan Sports Science*, 2021, **40**(6): 22-25
- [40] 谢凌坚, 张珊, 刘素娟, 等. AMPK α 2 在高强度间歇运动激活小鼠骨骼肌细胞自噬过程中的作用. 中国运动医学杂志, 2018, **37**(4): 309-314
- Xie L J, Zhang S, Liu S J, *et al.* *Chin J Sports Med*, 2018, **37**(4): 309-314
- [41] 白双勇, 王剑松, 赵庆华. 超重及肥胖男性不育患者精子早期凋亡研究. 中国男科学杂志, 2015, **29**(3): 10-13+18
- Bai S Y, Wang J S, Zhao Q H. *Chinese Journal of Andrology*, 2015, **29**(3): 10-13+18
- [42] Zhu G, Zhang Y, Dong J, *et al.* Association between body mass index and male sperm apoptosis and apoptosis-related factors. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2021, **14**: 1043-1051
- [43] 穆杨, 闫文杰, 尹太郎, 等. 高脂饮食诱导大鼠生精功能障碍. 医学研究杂志, 2015, **44**(12): 88-91
- Mu Y, Yan W J, Yin T L, *et al.* High-fat diet induces spermatogenesis dysfunction in male rats. *J Med Res*, 2015, **44**(12): 88-91
- [44] Nakandakari S C B R, Muñoz V R, Kuga G K, *et al.* Short-term high-fat diet modulates several inflammatory, ER stress, and apoptosis markers in the hippocampus of young mice. *Brain Behav Immun*, 2019, **79**: 284-293
- [45] Heo J W, Yoo S Z, No M H, *et al.* Exercise training attenuates obesity-induced skeletal muscle remodeling and mitochondria-mediated apoptosis in the skeletal muscle. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, **15**(10): 2301
- [46] 黄婉婷. 运动、饮食干预对肥胖雄性小鼠睾丸生精细胞凋亡的影响[D]. 沈阳: 沈阳体育学院, 2017
- Huang W T. Effects of Diet and Exercise Interventions for Obesity Male Mice Testicular Sperm Cells Apoptosis [D]. Shenyang: Shenyang Sport University, 2017
- [47] Mu Y, Dai H G, Luo L B, *et al.* Irisin alleviates obesity-related spermatogenesis dysfunction via the regulation of the AMPK α pathway. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, **19**(1): 135

Effects of Exercise on Autophagy and Apoptosis in Testis Tissue of Obese Rats*

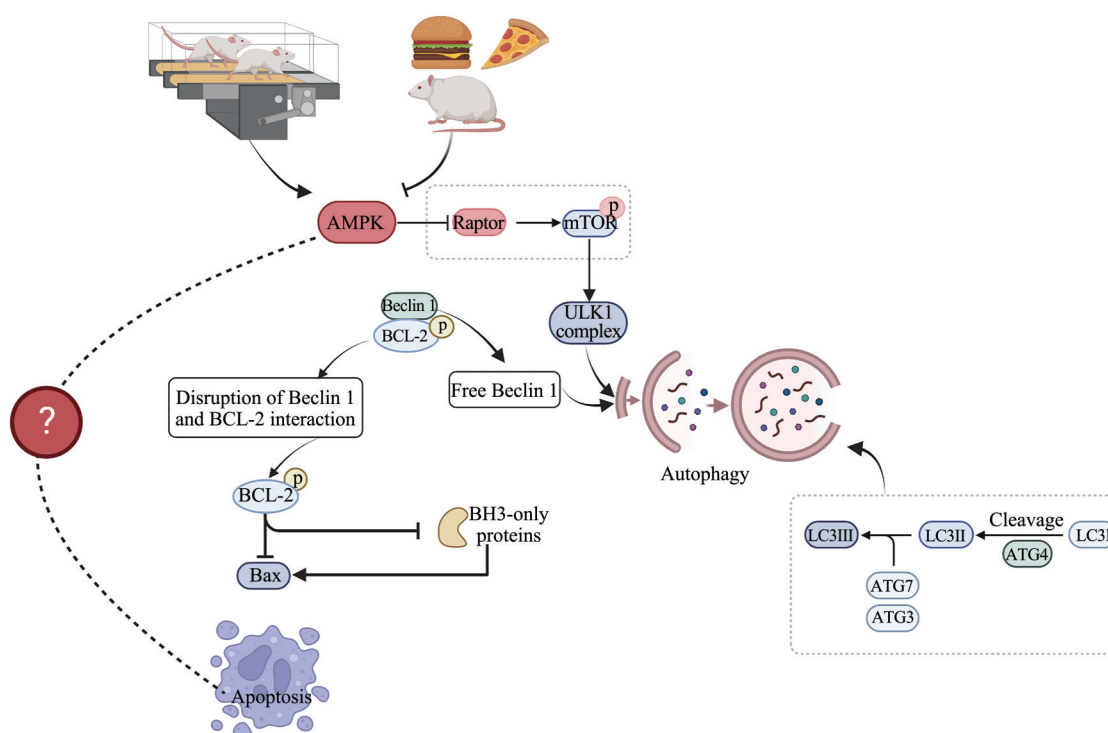
XU Rui^{1,2)}, DONG Jia¹⁾, CAO You-Xiang³⁾, HU Hui¹⁾, XIA Qiu¹⁾, WANG Peng-Yin¹⁾,
YU Li¹⁾, FENG Wan-Yu¹⁾, SHENG Lei¹⁾**

⁽¹⁾School of Sports and Health, Nanjing Sport Institute, Nanjing 210014, China;

⁽²⁾Sports and Health Engineering Collaborative Innovation Center of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China;

⁽³⁾School of Kinesiology, Shanghai University of Sport, Shanghai 200438, China)

Graphical abstract



Abstract Objective To investigate the effects of obesity on the structure of seminiferous tubules, autophagy and apoptosis-related proteins in testes tissue, and the effect of exercise on autophagy and apoptosis in testis and regulatory mechanism. **Methods** Fifty 6-week-old SD male rats were randomly divided into the standard diet group (SD, $n=20$) and the high-fat diet group (HFD, $n=30$). HFD group was fed 8 weeks to establish an obesity model of rats, and 20 rats were randomly selected to exercise intervention. Rats in SD and HFD groups were

* This work was supported by grants from the Natural Science Fund for Colleges and Universities of Jiangsu Province (19KJB180018), Key Laboratory of Nanjing Sport Institute (SYS202102), Jiangsu Provincial Department of Education College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (202110330033Y).

** Corresponding author.

Tel: 86-25-84755226, E-mail: 735888670@163.com

Received: September 7, 2022 Accepted: December 21, 2022

randomly divided into normal diet control group (CC), normal diet+exercise group (CE), high-fat diet control group (OC), and high-fat diet+exercise group (OE), 10 rats in each group. The rats in the CE and OE groups underwent moderate intensity treadmill training for 60 min/d, 5 d/week. CC and OC groups maintained the same feeding conditions. After 48 h of the last exercise, the rats were anesthetized intraperitoneally and weighed, the testes were taken from both sides of the rats, weighed and the testicular index was calculated. Paraffin sections of the testes were prepared to discover the testicular tissue structure by HE staining. Western blot was used to detect the protein expression of p62, LC3II, LC3I, BCL-2, Bax, and AMPK in testicular tissue, and the ratio of LC3II/LC3I was calculated. Immunofluorescence was used to detect LC3 and BCL-2 protein expression positions in the testis. **Results** The testicular index was reduced; HE staining revealed a significant decrease in the diameter of the seminiferous tubules ($P<0.01$), spermatocytes, and lipid droplet deposition in the testicular tissue; the protein expression of p62 and Bax were significantly increased ($P<0.01$), AMPK, LC3II/LC3I ratio, and BCL-2 were significantly decreased ($P<0.01$), and the number of LC3 proteins on sperm cells were significantly reduced in the testis tissue of rats in the OC group compared with the CC group. After exercise intervention, the testicular index was increased in the OE group; HE staining showed that the diameter of seminiferous tubules ($P<0.01$) and the number of spermatogonia ($P<0.05$) were significantly increased, and the structure of seminiferous tubules was improved; the protein expression of p62 and Bax were significantly decreased ($P<0.01$), AMPK, LC3II/LC3I ratio, and BCL-2 were significantly increased ($P<0.01$); the level of BCL-2 proteins on spermatocytes and sperm cells increased significantly in the OE group compared with OC group. AMPK was strongly correlated with p62, LC3II/LC3I, and Bax in all rat testicular tissue. **Conclusion** High-fat diet-induced obesity inhibits autophagy and promotes apoptosis in rat testes; 8 weeks of moderate-intensity exercise may activate autophagy and inhibit apoptosis in testis tissue *via* AMPK, correcting the adverse changes in spermatogenesis caused by obesity.

Key words exercise, obesity, testes, autophagy, apoptosis, AMPK

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0428