

本文引用:关丫丫,梁银明,王辉,等.三磷酸核苷酶抑制因子1基因敲除对小鼠成纤维细胞中三磷酸核苷水平及脂肪细胞分化的影响[J].新乡医学院学报,2018,35(8):658-661. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.08.003.

【基础研究】

## 三磷酸核苷酶抑制因子1基因敲除对小鼠成纤维细胞中三磷酸核苷水平及脂肪细胞分化的影响

关丫丫<sup>1,2</sup>, 梁银明<sup>1,2</sup>, 王辉<sup>1,2</sup>, 叶建平<sup>1,2,3</sup>

(1.新乡医学院医学检验学院,河南 新乡 453003;2.河南省分子诊断与医学检验技术协同创新中心,河南 新乡 453003;3.美国路易斯安那州立大学 Pennington 生物医学中心,路易斯安那州 巴吞鲁日市 70808)

**摘要:** **目的** 探讨三磷酸核苷酶抑制因子1(ATPIF1)基因敲除对小鼠成纤维细胞中三磷酸核苷(ATP)水平及脂肪细胞分化的影响。**方法** 取5只ATPIF1基因敲除小鼠作为观察组,另取5只C57BL/6小鼠作为对照组。取各组小鼠耳组织,采用I型胶原酶和中性蛋白酶II的消化作用制备成纤维细胞并用高糖培养基培养,传代1~2次后,待细胞长满且接触抑制3d后,更换含白色脂肪细胞诱导剂I的细胞培养基诱导4d,再更换含白色脂肪细胞诱导剂II的细胞培养基诱导4d。在诱导前及诱导4,8d分别采用ATP检测试剂盒和三酰甘油(TG)检测试剂盒检测成纤维细胞中ATP和TG水平。**结果** 诱导前,对照组小鼠原代成纤维细胞中ATP水平明显低于观察组( $P<0.05$ );诱导4,8d,对照组与观察组小鼠原代成纤维细胞中ATP水平比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。诱导4,8d,对照组小鼠原代成纤维细胞中TG水平低于观察组( $P<0.05$ )。**结论** ATPIF1基因敲除可增加小鼠成纤维细胞中ATP水平,促进成纤维细胞向白色脂肪细胞分化,提高成熟白色脂肪细胞储存TG的能力。

**关键词:** ATP合酶抑制因子1;脂肪细胞分化;三磷酸核苷;三酰甘油

**中图分类号:** R589.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)08-0658-04

## Effect of adenosine triphosphate synthase inhibitory factor 1 gene knockout on ATP level and differentiation of adipocytes in fibroblasts of mice

GUAN Ya-ya<sup>1,2</sup>, LIANG Yin-ming<sup>1,2</sup>, WANG Hui<sup>1,2</sup>, YE Jian-ping<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University, Xinxiang 450003, Henan Province, China; 2. Henan Province Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratorial Medicine, Xinxiang 450003, Henan Province, China; 3. Biomedical Center of Pennington, Louisiana State University, Baton Rouge 70808, Louisiana, American)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effect of adenosine triphosphate inhibitory factor 1 (ATPIF1) gene knockout on the level of adenosine triphosphate (ATP) and the differentiation of adipocytes in fibroblasts of mice. **Methods** Five ATPIF1 gene knockout mice were chose as experimental group and five C57BL/6 mice were chose as control group. Their ears were cut off and digested with collagenase type I and neutral protease II to obtain the primary fibroblasts from the ears of mice, and the cells were cultured by high sugar medium. The fibroblasts were differentiated into white adipocytes after 1-2 time passages. After the cells were fulled of dish and contacted inhibition for three days, then the cell culture medium was replaced with the prepared white adipocytes reagent I for 4 days, then replaced with the prepared white adipocytes reagent II for 4 days. The ATP and triacylglycerol (TG) level in fibroblasts were detected by ATP assay kit and TG assay kit before induction and at 4, 8 days after induction. **Results** The ATP level in fibroblasts in the control group was significantly lower than that in the observation group ( $P<0.05$ ). At 4, 8 days after induction, there was no significant difference in the ATP level between the two groups ( $P>0.05$ ). The TG level in fibroblasts in the control group was lower than that in the observation group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The ATPIF1 gene knockout can increase the ATP level in fibroblasts of mice, promote the differentiation of fibroblasts into white adipocytes and improve the ability of storing TG in white adipocytes.

**Key words:** ATP synthase inhibitory factor 1; adipocytes differentiation; adenosine triphosphate; triacylglycerol

DOI:10.7683/xyxyxb.2018.08.003

收稿日期:2018-02-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81370915);校特聘教授科研启动基金资助项目(编号:200/502008)。

作者简介:关丫丫(1990-),女,河南孟州人,硕士研究生在读,研究方向:能量代谢。

通信作者:叶建平(1963-),男,河南焦作人,硕士,教授,新乡医学院特聘教授,研究方向:能量代谢;E-mail: jianping.ye@pbrc.edu。

三磷酸核苷合酶抑制因子1 (adenosine triphosphate synthase inhibitory factor 1, ATPIF1) 是与三磷酸核苷(adenosine triphosphate, ATP)合酶相互作用的由细胞核编码产生的线粒体蛋白<sup>[1]</sup>。传统观点认为,ATPIF1与ATP合酶的F1区相互作用<sup>[2]</sup>,主要抑制ATP合酶的水解活性。但目前有研究表明,ATPIF1也能抑制ATP合酶的合成活性<sup>[1]</sup>。ATPIF1的活性在生理条件下受能量供需关系的动态调节<sup>[3]</sup>。在能量需求高的细胞如小鼠心肌细胞中,大部分ATPIF1处于失活状态。在牛心肌线粒体中,ATPIF1蛋白单体无活性,无法与ATP合酶F1区结合;当ATPIF1蛋白形成同源二聚体时被活化,产生抑制ATP合酶的作用<sup>[4]</sup>。目前,关于小鼠ATPIF1基因表达的研究较少,在能量代谢方面的表型研究更少。有研究显示,ATPIF1基因敲除小鼠的体质量和体脂量均降低,提示ATPIF1敲除可能对代谢产生影响<sup>[5]</sup>。此外,在肥胖和2型糖尿病患者骨骼肌中ATPIF1表达增加,提示ATPIF1可能影响脂质代谢<sup>[6]</sup>。还有研究表明,ATPIF1基因参与胰岛素分泌的负调控机制,抑制胰腺 $\beta$ 细胞对葡萄糖的反应<sup>[7]</sup>。在大多数人类常见肿瘤中,ATPIF1基因过表达,使氧化磷酸化转变为糖酵解,促进了肿瘤进展<sup>[8]</sup>。但ATPIF1基因敲除对脂肪细胞分化的影响还未见报道。本研究通过比较ATPIF1敲除小鼠和野生型小鼠白色脂肪细胞在体外分化的差异,探讨ATPIF1敲除对脂肪细胞分化的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 取5只ATPIF1基因敲除小鼠作为观察组,另取5只C57BL/6小鼠作为对照组,小鼠体质量22~24 g,所有小鼠均由新乡医学院动物实验中心提供,饲养于湿度40%~50%、温度(24.0±1.0)℃的独立通气笼系统,昼夜比为12 h:12 h。给小鼠喂食低脂饲料,其中粗脂肪含量≥4%,粗蛋白质含量≥20.5%,粗纤维含量≤5%。

**1.2 主要试剂与仪器** 达尔伯克改良伊戈尔培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)购自美国HyClone公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司,胰岛素干粉、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX)、地塞米松、吡格列酮和吡啶美辛购自美国Sigma公司, I型胶原酶购自美国Worthington公司,中性蛋白酶II购自瑞氏Roche公司,ATP检测试剂盒购自美国Thermo Fisher公司,低脂饲料购自上海普路腾生物科技有限公司,三酰甘油(triacylglycerol, TG)检测试剂盒购自南京建成公司。酶标仪购自美国Molecular Devices公司,4℃低温离心机购自美国Beckman

Coulter公司。

### 1.3 溶液配置

**1.3.1 消化液配制** 50 mL的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)中加入40 mg的I型胶原酶和125 mg中性蛋白酶II,放入37℃水浴器中过夜,待完全溶解后,用0.22  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的滤器过滤,分装后-20℃冻存备用。

**1.3.2 白色脂肪细胞诱导剂I配制** 50 mL 33  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 完全培养基中加入1.73  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素50  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IBMX 50  $\mu\text{L}$ 、1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松50  $\mu\text{L}$ 、2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 吡啶美辛5  $\mu\text{L}$ 、10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 吡格列酮5  $\mu\text{L}$ ,混匀后4℃冰箱保存。

**1.3.3 白色脂肪细胞诱导剂II配制** 50 mL 33  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 完全培养基中加入1.73  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素50  $\mu\text{L}$ ,混匀后4℃冰箱保存。

**1.4 细胞收集与培养** 异氟烷麻醉并处死2组小鼠,剪下耳组织,体积分数75%乙醇消毒3次, PBS将耳组织上残留的乙醇冲洗干净,在超净工作台内将耳组织剪成1 mm左右的碎块,将碎块收集到15 mL离心管中,加入3 mL消化液;37℃水浴器中消化2 h,在此期间每5 min摇晃离心管1次,使组织碎块与消化液充分接触。加入3 mL完全DMEM终止消化作用,1 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液;再加入1 mL完全DMEM重悬细胞,1 500  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清液。最后,加入1 mL完全DMEM重悬细胞沉淀,将细胞悬液移入10 cm的细胞培养皿中培养。细胞传代1~2次后,待细胞长满再接触抑制3 d左右,更换含白色脂肪细胞诱导剂I的细胞培养基诱导4 d,再更换含白色脂肪细胞诱导剂II的培养基诱导4 d。在诱导前及诱导4、8 d分别检测成纤维细胞内ATP和TG水平。

**1.5 成纤维细胞中ATP水平检测** 将6孔细胞培养板置于冰上,用预冷的PBS洗2次,每孔中加入细胞裂解液120  $\mu\text{L}$ ,用细胞刮收集成纤维细胞至1.5 mL的小离心管中,冰上放置30 min,用组织破碎仪将细胞充分破碎,4℃12 000  $\times g$ 离心10 min,取上清液。如果细胞裂解后TG较多,离心以后可以看到上层漂浮有大量的油脂,小心去除油脂,取上层清液,必要时重复离心1~2次,直至上层清液中没有油脂层。采用ATP检测试剂盒测定成纤维细胞中ATP水平,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

**1.6 成纤维细胞中TG水平检测** 在6孔细胞培养板的每个孔中加入500  $\mu\text{L}$ 胰蛋白酶消化液,放置37℃细胞培养箱30 s,小心吸出胰蛋白酶消化液, PBS洗2次,缓慢清洗不要使细胞脱落,加入100  $\mu\text{L}$

体积分数 2% TritonX-100 稀释液,冰上放置 30 min,用组织破碎仪将细胞充分破碎;采用 TG 检测试剂盒检测成纤维细胞中 TG 水平,操作步骤严格按照说明书进行。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较采用双尾、非配对  $t$  检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

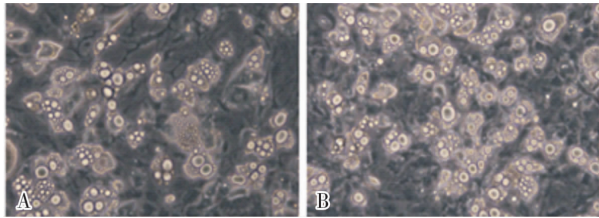
2 结果

**2.1 2 组小鼠成纤维细胞中 ATP 水平比较** 结果见表 1。诱导前,对照组小鼠原代成纤维细胞中 ATP 水平明显低于观察组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );诱导 4、8 d,对照组与观察组小鼠原代成纤维细胞中 ATP 水平比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 2 组小鼠原代成纤维细胞中 ATP 水平比较  
Tab.1 Comparison of the ATP level in fibroblasts of mice between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ATP/( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		
		诱导前	诱导 4 d	诱导 8 d
对照组	5	11.98 ± 3.87	9.31 ± 1.44	7.22 ± 0.94
观察组	5	19.21 ± 5.26	10.11 ± 0.70	5.99 ± 0.41
$t$		2.470	0.241	1.700
$P$		0.003	0.240	0.221

**2.2 2 组小鼠成纤维细胞诱导过程中 TG 水平比较** 结果见图 1 和表 2。诱导 4、8 d,对照组小鼠成纤维细胞中 TG 水平低于观察组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A:对照组;B:观察组。  
图 1 诱导 8 d 2 组小鼠成纤维细胞向脂肪细胞分化情况 (荧光倒置显微镜, ×20)

Fig.1 Differentiation of fibroblasts into white adipocytes at 8 days after intervened of mice in the two groups (fluorescence inversion microscope system, ×20)

表 2 2 组小鼠成纤维细胞诱导过程中 TG 水平比较  
Tab.2 Comparison of the TG level in fibroblasts of mice between the two groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TG/( $\text{mmol} \cdot \text{gprot}^{-1}$ )	
		诱导 4 d	诱导 8 d
对照组	5	0.12 ± 0.01	2.05 ± 0.30
观察组	5	0.20 ± 0.02	2.58 ± 0.54
$t$		4.940	3.990
$P$		0.002	0.030

3 讨论

ATPIF1 是线粒体 ATP 合酶的内生性抑制蛋白,其与 ATP 合酶结合以后,可以抑制 ATP 合酶的合成和水解作用<sup>[9-12]</sup>。NAKAMURA 等<sup>[13]</sup>研究了 ATPIF1 基因敲除纯合子小鼠在正常饮食条件下的生长发育情况,结果发现,ATPIF1 基因敲除纯合子小鼠的体质量和体脂量与野生型小鼠相比无明显差异,线粒体超微结构、自噬、代谢产物以及细胞内 ATP 水平也无明显变化。而欧洲条件性基因突变鼠组织培育了 ATPIF1 基因敲除小鼠,正常饮食后发现该小鼠在脂肪组织、代谢稳态、生长发育及体型上是有改变的<sup>[1]</sup>。由于 ATPIF1 基因敲除的表型还不清楚,而且关于 ATPIF1 基因敲除对脂肪细胞分化的影响还未见报道。因此,本研究将 ATPIF1 基因敲除小鼠的原代成纤维细胞诱导为脂肪细胞,观察 ATPIF1 基因敲除对脂肪细胞分化过程中成纤维细胞中 ATP 水平的影响以及对脂肪细胞分化的影响。

ATPIF1 基因是 ATP 合酶的双向抑制剂,可以抑制 ATP 合酶的合成和水解 ATP 的功能。ATPIF1 可选择性抑制 ATP 合酶的水解活性,比如在心脏缺血时,ATPIF1 抑制 ATP 合酶的水解活性,维持心肌细胞内 ATP 水平,保护心脏<sup>[14]</sup>。在转基因小鼠中,神经元和肝细胞中表达活化型 ATPIF1 (H49K 突变蛋白),抑制 ATP 合酶的合成活性,使细胞内 ATP 水平降低<sup>[15-16]</sup>。本研究结果表明,ATPIF1 基因敲除提高了成纤维细胞中线粒体的活性,促进了成纤维细胞内 ATP 的合成,而 ATP 的增加也促进了脂肪细胞的分化。ATP 是细胞生理活动所需能量的直接来源,成纤维细胞被诱导为脂肪细胞的过程需要消耗 ATP。随着诱导的进展,脂肪细胞数目逐渐增多,储存 TG 的量逐渐增加,导致线粒体的数量和合成的 ATP 减少。在脂肪细胞诱导过程中,ATPIF1 基因敲除小鼠成纤维细胞中高水平的 ATP 逐渐降低,促进了脂肪细胞分化。

综上所述,ATPIF1 基因敲除促进了成纤维细胞中 ATP 的合成,并且促使成纤维细胞分化为脂肪细胞,储存更多的 TG。本实验通过成纤维细胞诱导为脂肪细胞,首次验证了 ATPIF1 基因敲除对脂肪细胞分化的影响。

参考文献:

[1] GARCIA-BERMEDEZ J, CUEZVA J M. The ATPase inhibitory factor 1 (IF<sub>1</sub>): a master regulator of energy metabolism and of cell survival[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857 (8): 1167-1182.  
[2] CAMPANELLA M, PARKER N, TAN C H, et al. IF<sub>1</sub>: setting the pace of the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase[J]. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34 (7): 343-350.

[3] GARCIA-BERMUDE J, SANCHEZ-ARAGO M, SOLDEVILLA B, et al. PKA phosphorylates the ATPase inhibitory factor 1 and inactivates its capacity to bind and inhibit the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase[J]. *Cell Rep*, 2015, 12(12):2143-2155.

[4] CABEZON E, ARECHAGA I, JONATHAN P, et al. Dimerization of bovine F<sub>1</sub>-ATPase by binding the inhibitor protein, IF<sub>1</sub> [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(37):28353-28355.

[5] KOSCIELNY G, YAIKHOM G, IYER V, et al. The international mouse phenotyping consortium web portal, a unified point of access for knockout mice and related phenotyping data[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42:D802-D809.

[6] FORMENTINI L, RYAN A J, GALVEZ-SANTISTEBAN M, et al. Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human skeletal muscle; contribution to dyslipidaemia and insulin resistance[J]. *Diabetologia*, 2017, 60(10):2052-2065.

[7] KAHANCOVA A, SKLENAR F, JEZEK P, et al. Regulation of glucose-stimulated insulin secretion by ATPase inhibitory factor 1 (IF<sub>1</sub>) [J]. *FEBS Letters*, 2018, 592(6):999-1009.

[8] GARCIA-LEDO L, NUEVO-TAPIOLES C, CUEVAS-MARTIN C, et al. Overexpression of the ATPase inhibitory factor 1 favors a non-metastatic phenotype in breast cancer[J]. *Frontiers Oncology*, 2017, 7:69.

[9] WALKER J E. The ATP synthase; the understood, the uncertain and the unknown[J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(1):1-16.

[10] SUZUKI T, TANAKA K, WAKABAYASHI C, et al. Chemomechanical coupling of human mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase motor[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(11):930-936.

[11] GOMEZ-PUYOU A, DE GOMEZ-PUYOU M T, ERNST L. Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 547(2):252-257.

[12] HARRIS D A, VON TSCHARNER V, RADDA G K. The ATPase inhibitor protein in oxidative phosphorylation. the rate-limiting factor to phosphorylation in submitochondrial particles[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 548(1):72-84.

[13] NAKAMURA J, FUJIKAWA M, YOSHIDA M. IF<sub>1</sub>, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice[J]. *Biosci Rep*, 2013, 33(5):735-741.

[14] YANG K, LONG Q, SAJA K, et al. Knockout of the ATPase inhibitory factor 1 protects the heart from pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1-11.

[15] SANTACATTERINA F, SANCHEZ-CENIZO L, FORMENTINI L, et al. Down-regulation of oxidative phosphorylation in the liver by expression of the ATPase inhibitory factor 1 induces a tumor-promoter metabolic state[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1):490-508.

[16] FORMENTINI L, PEREIRA M P, SANCHEZ-CENIZO L, et al. In vivo inhibition of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning[J]. *EMBO J*, 2014, 33(7):762-778.

( 本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

## 《眼科新进展》2018 年征订启事

《眼科新进展》杂志是由新乡医学院主办的眼科学高级学术刊物,创刊于 1980 年,大 16 开,100 页,国内外公开发行人。1999 年加入国家科技部《万方数据系统科技期刊群》和《中国学术期刊(光盘版)》,1997 年被上海医科大学图书馆选定为医学类核心期刊,2000 年被美国《化学文摘》收录,2001 年被俄罗斯《文摘杂志》收录,自 2002 年连续入选中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),自 2008 年连续入选中国中文核心期刊,并连续被评为河南省二十佳科技期刊。2009 年入选 WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM),并被评为 RCCSE 中国核心学术期刊。国际标准连续出版物号为:ISSN 1003-5141,国内统一刊号:CN 41-1105/R,邮发代号:36-42。

本刊辟有名家讲坛(述评)(Editorial)、实验研究(Experimental study)、应用研究(Applied study)、文献综述(Review article)、海外信息(Overseas information)、消息(News)、读者来信(Letters)等栏目。本刊读者对象主要是眼科学临床、科研和教学工作者。欢迎国内外眼科医学工作者踊跃投稿和订阅。国内每期定价 10.00 元,全年定价 120.00 元。如错过邮局订阅,可直接汇款到我刊编辑部。联系地址:河南省新乡市金穗大道 601 号,新乡医学院期刊社《眼科新进展》杂志编辑部,邮编:453003。联系电话:0373-3029404;E-mail:ykxjz@xxmu.edu.cn、ykxjz@163.com;网址:http://www.ykxjz.com。