

## 综述

# 线粒体ATP合成酶抑制因子1在细胞能量代谢中的调节作用

曹昕昱 章小英 叶建平\*

(上海交通大学附属第六人民医院, 上海市糖尿病研究所, 上海 200233)

**摘要** ATP除了为细胞提供能量外, 还发挥重要的信号作用。因此, 细胞内ATP水平的调节机制引起了越来越多的关注。ATP合成酶抑制因子(ATPase inhibitory factor 1, ATPIF1, 简称IF1)是线粒体基质中的一个蛋白, 其与呼吸链中的 $F_1F_0$ -ATP合酶结合, 调控后者合成和水解ATP的活性。该分子在肿瘤研究方面已有综述, 但是在糖脂代谢领域还缺乏相关综述。该综述从能量代谢角度出发, 阐明IF1分子在调节细胞ATP水平中的作用。IF1蛋白半衰期较短, 其表达呈现组织特异性, 活性受基因表达和蛋白修饰的双重调节。IF1活性在其质子化后或过表达条件下升高, 使线粒体ATP合成减少, 引起细胞能量代谢重新编程, 糖酵解合成ATP增多, 并且线粒体产生活性氧增加。这些作用可解释IF1促进癌细胞生长和提高细胞炎症反应的作用。相反, IF1活性在蛋白磷酸化后或基因敲除条件下降低, 由此介导的代谢编程提高细胞对恶劣环境的适应能力, 提高细胞的生存力, 增加局部组织的抗炎能力。总之, IF1的这些作用为探索细胞内ATP水平调节机制和细胞能量代谢稳态机制提供了重要的指导意义。

**关键词** ATP合酶; ATP合成酶抑制因子1(IF1); 代谢重编程; 线粒体低毒兴奋效应; 活性氧; 转基因小鼠

## Regulation of Mitochondrial ATP Synthase Inhibitor 1 in Cellular Energy Metabolism

CAO Xinyu, ZHANG Xiaoying, YE Jianping\*

(The Sixth People's Hospital affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai Diabetes Research Institute, Shanghai 200233, China)

**Abstract** Intracellular ATP not only provides energy to cells, but also plays an important signaling role. Therefore, the regulation mechanism of intracellular ATP levels has attracted more and more attention. ATPIF1 (ATPase inhibitory factor 1, IF1), is a mitochondrial protein that binds to the  $F_1F_0$ -ATP synthase in the mitochondrial matrix to regulate the synthesis and hydrolysis of ATP. Although there are review articles on IF1 in the cancer biology field, the molecule has not been reviewed in the metabolism field of glucose and fatty acids. This review is prepared to summarize the latest information of IF1 with a focus on mitochondria to understand its role in the control of intracellular ATP level. With short half-life, IF1 is tissue-specifically expressed and primarily controlled

收稿日期: 2019-08-20 接受日期: 2019-11-18

\*通讯作者。Tel: 17316390783, E-mail: yejianping@sjtu.edu.cn

Received: August 20, 2019 Accepted: November 18, 2019

\*Corresponding author. Tel: +86-17316390783, E-mail: yejianping@sjtu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5229>

by gene expression and protein modification. IF1 activity is upregulated after protonation or overexpression, which reduces mitochondrial ATP synthesis, causes reprogramming of cellular energy metabolism, increasing ATP production by glycolysis, and increasing mitochondria production of reactive oxygen species. These effects explain the role of IF1 in promoting cancer cell growth and increasing cellular inflammatory responses. In contrast, IF1 activity is reduced after protein phosphorylation or in gene knockout conditions, and this mediated metabolic programming increases the ability of cells to adapt to harsh environments, increases cell viability, and increases the anti-inflammatory capacity of local tissues. In conclusion, these roles of IF1 provide important guidance for exploring the regulation mechanism of ATP levels in cells and the homeostasis mechanism of cellular energy metabolism.

**Keywords** ATP synthase; ATPase inhibitory factor 1; metabolic reprogramming; mitohormesis; reactive oxygen species; transgenic mice

线粒体是细胞的“能量工厂”，为细胞活动提供大部分ATP。细胞内ATP水平取决于生成与消耗之间的平衡。在正常情况下，细胞内95%的ATP由线粒体产生，呼吸链是线粒体合成ATP的重要生产线。呼吸链通过一系列的酶促化学反应，将电子传递给氧，同时用反应所释放的能量维持线粒体膜电位。在该膜电位的驱动下，呼吸链复合物V即 $F_1F_0$ -ATP合成酶(本文简称ATP合酶)通过磷酸化ADP产生ATP。ATP合酶拥有合成和水解ATP的双重催化活性。在氧和能量物质充足的生理条件下，ATP合酶功能以合成ATP为主，而在细胞应激情况下，如膜电位不足时，以水解ATP为主。水解ATP时，ATP合酶获得能量将质子反向(逆着膜电位)泵入膜间隙，维持线粒体膜电位，发挥抗凋亡作用。促进线粒体合成ATP的信号通路(如cAMP/PKA和AMPK等)已有很多报道<sup>[1]</sup>。在抑制ATP合成的信号通路中，除了缺氧信号通路外，关于其他通路的文献较少<sup>[1]</sup>。IF1是线粒体中调节ATP合酶的一个天然抑制因子。目前已有文献报道，IF1与多种疾病有关，如肿瘤、肥胖和2型糖尿病等<sup>[2-3]</sup>，但尚无统一的细胞或分子机制解释IF1的病理作用。综合文献报道，本文作者提出，IF1可能通过调控细胞内ATP水平影响线粒体膜电位、ROS、细胞凋亡等方面，参与这些疾病的发生。本综述将重点关注IF1生物学作用和活性调控的最新进展，帮助理解细胞内ATP水平调控的新机制。

## 1 线粒体ATP合酶的结构和功能

ATP合酶即呼吸链复合物V，占线粒体总蛋白量的50%<sup>[2]</sup>。在分子结构上，该酶包含 $F_0$ 和 $F_1$ 两个区域。 $F_0$ (由 $\alpha$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$ 、 $\beta_4$ 、 $\beta_5$ 亚基构成)部分嵌入线粒体内

膜中构成该酶的疏水区<sup>[4]</sup>， $F_1$ 区为蘑菇头状结构(由 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 亚基和寡霉素敏感蛋白构成)位于线粒体基质侧，构成该酶的亲水区。 $F_0$ 区不但为质子流动提供通道，还可获取质子回流所释放的能量，驱动 $F_1$ 结构旋转，为 $F_1$ 催化作用提供能量。 $F_1$ 区的亚基( $\alpha_3\beta_3$ )有独特的排列方式，形成橘子瓣一样的球状结构，围绕着中央的轴( $\gamma$ 亚基)旋转，发挥催化作用。正向旋转催化ATP合成，反向旋转催化水解ATP。在呼吸链功能受阻的情况下，ATP合酶反向旋转，通过水解ATP获得能量，将质子从线粒体基质逆势泵入膜间隙，稳定线粒体膜电位。因此ATP合酶的双向功能不但参与调节ATP水平，而且调节线粒体膜电位。在膜电位充足的条件下，该酶利用膜电位合成ATP。在膜电位不足时，该酶可以水解ATP维持膜电位，防止膜电位过低引起细胞凋亡<sup>[2]</sup>。由此可见，ATP合酶的活性受到抑制将对线粒体功能产生广泛的影响。

## 2 IF1的结构和功能

IF1作为ATP合酶在体内的天然抑制因子，近年来受到越来越多研究者的关注。这个蛋白首先发现于牛的心肌线粒体中，随后在植物、酵母及其他动物和人线粒体中被发现。IF1是第一个可与ATP合酶相互作用的细胞核编码的蛋白质<sup>[2]</sup>。哺乳动物的IF1蛋白表现出高度的保守性，体现在能与ATP合酶的 $F_1$ 区特异结合，具有跨种系的ATP合酶抑制活性<sup>[5]</sup>。在人和小鼠中，IF1蛋白分别由1号和4号染色体基因编码。在人体，其mRNA合成后被选择性剪切，产生三种长度和序列不同的剪切体，翻译成三种不同亚型的IF1蛋白(图1)。亚型1分子量最大(12.24 kDa, PI9.34)，其mRNA包含三个外显子和一个短小的3'UTR。亚型2(7.91 kDa, PI7.96)，同样由三个外显子编码组成，

但是最后一个外显子与亚型1的不同,从而形成不同的C末端。亚型3(6.59 kDa, PI8.34)分子量最小,由两个外显子编码组成,其mRNA有一个非常长的3'UTR<sup>[2]</sup>。

## 2.1 IF1的功能

IF1通过与ATP合酶相互作用,改变线粒体的多个功能指标,但还没有文献系统描述IF1的这些效应。以下,我们重点探讨IF1蛋白对细胞内ATP水平、线粒体pH、线粒体膜电位、线粒体ROS产生和产热活动的调节作用及生物学意义。

### 2.1.1 调节细胞ATP水平

早期研究发现,IF1与ATP合酶的F<sub>1</sub>结构域结合<sup>[5]</sup>,抑制ATP合酶的水解活性<sup>[5-6]</sup>,从而减少ATP消耗。但目前研究证实,IF1也抑制该酶的合成活性<sup>[2]</sup>,因此IF1可抑制ATP合酶的双向催化作用。IF1的N-端深深地插入到ATP合酶球形结构(F<sub>1</sub>区域)中,由长螺旋结构组成的C-端则游离并根据环境变化调节IF1蛋白的聚合状态:当线粒体基质的质子浓度升高时,IF1的C-端被质子化修饰,使两个IF1单体通过C-端相互结合形成二聚体,并激活IF1的抑制活性,导致相邻的ATP合酶连在一起,F<sub>1</sub>区无法转动,抑制ATP合成<sup>[4]</sup>。当线粒体基质的质子浓度降低时,IF1蛋白的质子化程度降低,二聚体变成四聚体或者高聚体,引起IF1与ATP合酶分离,失去抑制活性<sup>[2]</sup>。IF1失活导致ATP合酶活化,这种情况发生在线粒体膜电位降低时,ATP合酶可水解来自糖酵解的ATP,维持线粒体膜电位,可防止细胞凋亡<sup>[4]</sup>。但如果ATP合酶水解功能过强,导致ATP枯竭,就会引起细胞坏死。在这种情况下,IF1通过控制ATP合酶的水解作用,维持细胞内ATP水平<sup>[1,7]</sup>,降低

细胞坏死的风险。

### 2.1.2 调节线粒体基质pH

线粒体基质的pH值受多种因素调节,其中质子浓度与pH水平呈反比<sup>[8]</sup>。质子浓度越高,线粒体基质的pH值越低。当pH值降低时,需要减少质子浓度纠正pH。线粒体可通过调节内膜上多种离子通道(如Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>、Pi无机磷酸盐等通道),调控基质的pH<sup>[8]</sup>。例如,线粒体将基质中的Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>泵入膜间隙的同时,可以将膜间隙的质子反向泵入基质中,或是将Pi与质子一同泵入线粒体基质。正常情况下,呼吸链复合物I、III、IV将质子从线粒体基质泵到线粒体膜间隙,维持膜电压,同时避免质子在基质中堆积造成pH降低。但在呼吸链受抑制的情况下(如缺氧、中毒等),线粒体无法发挥这种功能,质子在基质中堆积,造成pH值降低。在pH降低的条件下,IF1蛋白被质子化后激活,抑制ATP合酶水解ATP的功能,有可能引起线粒体基质pH进一步降低。因此,在呼吸链受到抑制的条件下,IF1通过这一作用调节线粒体基质的pH。

### 2.1.3 调节线粒体膜电位

线粒体由内、外两层膜组成,两层膜之间的空隙叫膜间隙。线粒体膜电位由线粒体内膜两侧的质子浓度差形成。在正常情况下呼吸链复合物I、III、IV将质子从线粒体基质送到膜间隙,维持膜电位。当呼吸链功能受到抑制的时候,质子的这种跨膜转运活动减弱,膜电位会降低。当呼吸链功能亢进的时候(如大量葡萄糖刺激),质子转运加速增加,可升高膜电位,若此时ATP合酶消耗膜电位合成ATP的能力不相应提高,膜电位的持续升高可引起ROS增加。IF1通过抑制ATP合酶,

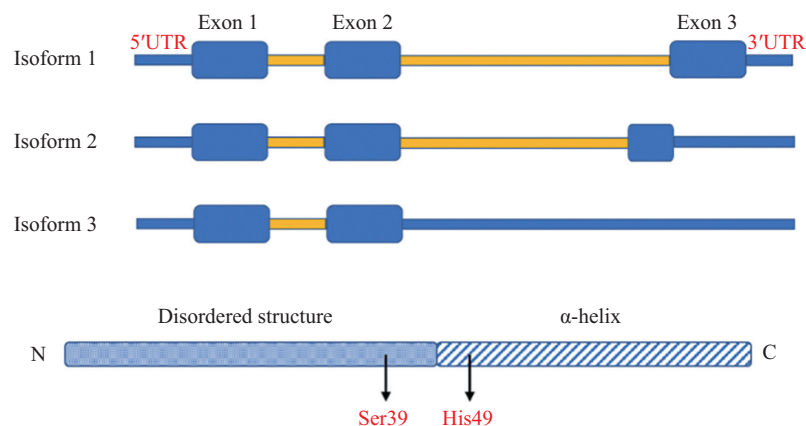


图1 RNA剪切后产生的三种IF1亚型

Fig.1 The three IF1 isoforms generated by RNA splicing



可使线粒体膜电位升高。在呼吸链功能降低时, 如ATP合酶继续消耗膜电位合成ATP, 可导致膜电位过度降低。在这种情况下, IF1通过抑制复合物V, 可避免膜电位过低。在呼吸链功能降低的时候, 最大的可能性是IF1蛋白在线粒体中被质子化, 活性得到提升, 阻断ATP合酶的水解活性, 妨碍线粒体维持膜电位。此时IF1被激活, 有可能会妨碍膜维持电位, 加剧细胞损伤。

**2.1.4 调节线粒体ROS** 线粒体呼吸链是细胞产生ROS的主要部位。呼吸链正向或反向传递电子均可产生ROS<sup>[9]</sup>。在正向电子传递中, NADH氧化成NAD<sup>+</sup>时, 释放两个电子和一个质子(H<sup>+</sup>)。此反应释放出的电子在复合物I位置上可使氧分子发生单电子还原而生成超氧离子( $\bullet\text{O}_2^-$ ), 当电子沿着呼吸链传递到复合物III时也生成 $\bullet\text{O}_2^-$ 。此外, 呼吸链的成分之一泛醌(QH, 也被称为辅酶Q, CoQ)发生氧化或氧化型醌(Q)发生还原时, 会变成半醌自由基(QH $\bullet$ ), 而QH $\bullet$ 再氧化成Q时能通过非酶性反应使O<sub>2</sub>生成 $\bullet\text{O}_2^-$ 。因此, 复合物I、复合物III和辅酶Q循环都是呼吸链生成ROS的主要位点<sup>[10]</sup>。当呼吸链在反向传递电子的时候, 也产生ROS, 但具体机制不详<sup>[9]</sup>。超氧离子在超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)催化作用下产生双氧水。超氧离子和过氧化氢都有很强的氧化作用。在正常情况下, 它们通过修饰生物大分子, 产生生物信号, 调节能量代谢。所以, 传统观点认为, ROS代表一类细胞信号。新的研究提示, ROS的产量受ATP合成的调节, 呼吸链反向传递电子会增加ROS产量<sup>[11]</sup>。在ATP合酶活性受抑制或ADP供应不足条件下, 线粒体无法通过合成ATP输出能量, 造成膜电位过高引起ROS增加。ROS可以通过氧化解偶联蛋白或增加线粒体膜通透性促进产热, 降低膜电位<sup>[12-13]</sup>。因此, IF1能够抑制ATP合酶活性继而增加ROS, 并且这个可能性在IF1过表达小鼠中得到了证实<sup>[14]</sup>。当ROS产生过多时, 其氧化修饰作用过强, 导致线粒体结构和功能损伤, 这是ROS的副作用。

**2.1.5 调节线粒体产热** 线粒体膜电位所储存的能量主要有两种输出方式: 一是产生ATP, 二是产生热量。两者在某种程度上存在竞争关系<sup>[15]</sup>: ATP合成所用的能量增加, 会减少线粒体产热; 相反, 如果增加线粒体产热, 会减少ATP合成。线粒体产热是呼吸链解偶联的结果, 依赖于解偶联蛋白(uncoupling

protein, UCP)发挥作用。新的发现提示, 线粒体膜上的腺苷酸转运酶(adenosine nucleotide translocase ANT; ADP/ATP carrier, AAC)也有解偶联功能<sup>[16]</sup>。传统观点认为, 该蛋白主要功能是将胞质中的ADP转运到线粒体基质中为ATP合成提供原料<sup>[17]</sup>。长链脂肪酸可以与UCP-1分子直接结合刺激产热活动<sup>[18]</sup>, 新的研究发现, 长链脂肪酸(尤其是不饱和和长链脂肪酸)还可以抑制ANT的传统功能, 即降低该蛋白转运ADP的能力, 提高其转运质子的能力, 将质子从线粒体膜间隙转运到基质中并释放热量<sup>[16]</sup>。另外, 脂肪酸还可通过增加ROS, 氧化解偶联蛋白(如UCP-1)<sup>[12]</sup>, 刺激产热。根据这些研究, 我们推测, IF1通过抑制ATP合酶, 增加膜电位和ROS, 有可能刺激线粒体产热活动。

## 2.2 调节IF1活性的机制

IF1蛋白以单体、二聚体或四聚体的形式存在于线粒体中。单体和四聚体无活性, 二聚体才有活性<sup>[19]</sup>。其活性在蛋白质质子化后被激活, 在磷酸化后被抑制。

质子化: IF1二聚体和四聚体的形成受线粒体基质中质子(H<sup>+</sup>)浓度调节。IF1蛋白第49位氨基酸是组氨酸残基(H49), 有结合质子(H<sup>+</sup>)的功能。在质子浓度增加的情况下, 组氨酸残基结合H<sup>+</sup>导致质子化, IF1蛋白携带的正电荷增加, 单体形成二聚体, IF1功能被活化(图2)。当质子浓度降低, 该组氨酸失去质子后(去质子化), 蛋白正电荷减少, 通过未知的机制形成四聚体, IF1失去活性<sup>[20]</sup>。IF1质子化状态取决于线粒体基质pH水平。当呼吸链受到抑制的时候, 线粒体基质的H<sup>+</sup>无法被泵到线粒体膜间隙, H<sup>+</sup>滞留在基质中造成pH值降低。pH值降到6.7以下, IF1蛋白质质子化程度明显提高, 活性增加。通过抑制ATP合酶, 减少质子从线粒体膜间隙进入线粒体基质, 防止pH值进一步降低。这一作用以减少ATP合成为代价, 避免线粒体基质pH过低, 缓冲pH波动。当线粒体基质pH高于6.7, 基质的H<sup>+</sup>浓度较低, 导致IF1去质子化状态增加, 两个IF1二聚体相互作用形成无活性的四聚体, 解除对ATP合酶的抑制<sup>[20]</sup>。ATP合酶促进质子迁移进入线粒体基质, 增加线粒体基质的质子浓度, 降低pH值, 防止其过高。如将IF1组氨酸残基突变成赖氨酸, 可模拟质子化修饰状态, 避免IF1形成四聚体, 使其长期处于活化状态, 阻断pH升高对IF1的反馈抑制作用。突变蛋白在pH高于6.7时仍继续抑制ATP合酶, 导致线粒体膜电位无法用于合

成ATP,膜电位升高,从而引起氧自由基增加。在表达突变蛋白的转基因小鼠中,这种作用造成线粒体ATP合成减少,糖酵解水平代偿升高弥补ATP合成不足<sup>[21-22]</sup>,并增加线粒体氧自由基产生,加重细胞的炎症状态。

**磷酸化:** IF1的活性也受磷酸化状态的调节。IF1蛋白第39位氨基酸是丝氨酸(Ser39),可被PKA(蛋白激酶A)磷酸化,使IF1失去活性<sup>[19]</sup>(图3)。在Ser39去磷酸化后,IF1从抑制状态下解放出来,发挥调节ATP合酶的活性。IF1的磷酸化是通过环磷酸腺苷(cAMP)依赖的PKA(protein kinase A)实现的<sup>[19]</sup>。该通路在交感神经兴奋下被激活,产生抑制IF1的作用,促进线粒体合成ATP,满足细胞在应激状态下的能量需求。IF1的磷酸化修饰是一种快速的调节细胞能量供需平衡的方式,提高ATP合酶的合成活性,增加ATP的合成速度,满足细胞的能量需求<sup>[19]</sup>。

### 2.3 IF1表达的调控

IF1蛋白表达在人类不同组织细胞中差异很大,其蛋白水平在线粒体丰富的器官,如心、肝、肾、胃、脑等器官中比较高,而在乳腺、结肠、肺、卵巢中

则表达较低<sup>[23-24]</sup>。在人类某些肿瘤组织中(如结肠癌、肺癌、乳腺癌和卵巢癌),IF1蛋白表达明显升高,但也有肿瘤组织中IF1表达并不升高<sup>[20,23-24]</sup>。有趣的是,蛋白水平的升高与mRNA表达水平不成正比<sup>[24]</sup>,提示IF1蛋白表达主要受转录后调节<sup>[25]</sup>。目前,IF1蛋白的基因调控机制还不十分清楚,无法解释IF1组织特异性表达的原因。文献提示,IF1蛋白水平与两种蛋白有关:一种是含有亮氨酸五肽的重复序列(leucine-rich pentatricopeptide repeat containing, LRPPRC);另一种是即刻早期反应3(immediate early response 3, IER3)。这两种蛋白均降低IF1蛋白水平。

LRPPRC是一种能够结合线粒体的蛋白,其功能是协调细胞核和线粒体基因转录表达。在小鼠心脏中,条件性敲除*Lrpprc*基因,导致IF1蛋白水平上调,抑制线粒体ATP合成、诱导线粒体膜超极化(膜电位升高)及ROS增多<sup>[26]</sup>。IF1蛋白升高的机制不明,可能是蛋白稳定性或mRNA稳定性增加的结果。LRPPRC既调节线粒体编码的mRNA稳定性<sup>[27-28]</sup>,也调节细胞核编码的mRNA稳定性<sup>[29-30]</sup>。这些研究提示,IF1是LRPPRC调节的基因之一。

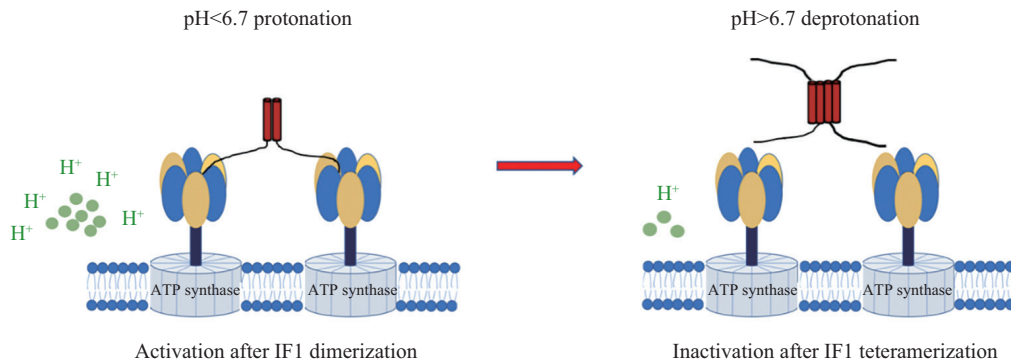


图2 组氨酸H49质子化增加IF1的活性

Fig.2 IF1 activity is increased by histidine 49 protonation

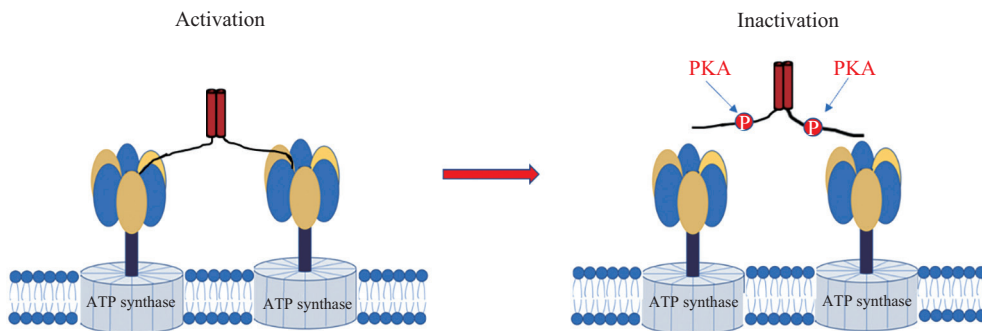


图3 丝氨酸Ser39磷酸化抑制 IF1活性

Fig.3 IF1 activity is inhibited by serine 39 phosphorylation

IER3蛋白是一种应激蛋白,能够抑制ROS产生,保护细胞避免凋亡。有研究指出,IER3直接与IF1的C-端结合,使IF1被未知的线粒体蛋白酶降解,影响其稳定性<sup>[31]</sup>。IER3在结肠癌、肺癌和乳腺癌中的表达明显增加,与IF1蛋白水平升高同时存在<sup>[24]</sup>,支持IER3调节IF1蛋白。

在内毒素引起的细胞反应中,IF1表达增加。在脓毒症大鼠肝细胞中,IF1蛋白水平升高<sup>[32]</sup>。此变化与缺氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF1 $\alpha$ )激活相关,用氯化钴处理肝细胞模拟缺氧反应,激活HIF1 $\alpha$ 可诱导IF1表达。但HIF1 $\alpha$ 的这种作用在多种人癌细胞(结肠癌、肺癌、乳腺癌和卵巢癌细胞)中并未被观察到<sup>[24]</sup>,提示HIF1 $\alpha$ 在肿瘤细胞中不能调节IF1表达,且机制不清。显然,需要更多的研究来揭示IF1表达调控的机制。

## 2.4 IF1的生理病理作用

**2.4.1 抑制IF1可促进细胞适应应激** 在缺氧或呼吸链中毒条件下,线粒体无法通过呼吸维持电位,膜电位降低增加细胞死亡的风险。为了恢复膜电位,ATP合酶通过水解ATP将质子从线粒体基质泵入膜间隙,维持膜电位<sup>[2]</sup>。在这种情况下,IF1抑制ATP合酶的水解功能,妨碍线粒体维护膜电位,可加剧细胞死亡。在缺氧反应中,胞质的糖酵解反应是细胞里ATP的主要来源。在缺氧状态下,交感神经兴奋通过激活PKA,磷酸化IF1蛋白,降低其活性,促进线粒体维护膜电位,降低细胞在缺氧或呼吸链障碍状态下的死亡率<sup>[19]</sup>。

**2.4.2 IF1影响肿瘤细胞的能量代谢** 与正常的组织相比,结肠癌、肺癌、乳腺癌和卵巢癌组织均表达高水平IF1,此升高是肿瘤细胞氧化磷酸化水平降低以及无氧糖酵解增加的原因之一<sup>[2]</sup>。这种代谢特点为细胞增殖提供了最佳条件,有利于肿瘤细胞把糖和脂等能量物质用于合成核苷酸和氨基酸,满足肿瘤细胞DNA复制和蛋白质合成的需求,很大程度上促进了肿瘤细胞的分裂、生长以及转移。另外,IF1促进线粒体产生ROS,可能刺激肿瘤细胞生长。还有文献报道,在IF1高表达的肿瘤细胞中,IF1抑制ATP合酶的水解功能,有助于维持细胞内ATP水平,促进了癌细胞在缺氧条件下的存活<sup>[33]</sup>。

**2.4.3 IF1参与代谢性疾病的代谢平衡紊乱** 在肥胖和2型糖尿病患者骨骼肌细胞中,IF1蛋白水平增加280%<sup>[3]</sup>。在肌管细胞中,IF1抑制三羧酸循环中间

产物 $\alpha$ -酮戊二酸代谢和左旋肉碱(L-carnitine)的代谢,降低脂肪酸 $\beta$ -氧化,引起脂肪在胞质中聚积<sup>[3]</sup>。这表明,增加IF1表达可能促进脂质代谢紊乱,是治疗肥胖和2型糖尿病的潜在干预目标。

## 3 IF1转基因小鼠的表型

转基因小鼠是研究基因生物学功能的重要工具。IF1组织特异性转基因小鼠的表型为理解其生物学功能提供依据,也为研究IF1生理及病理作用提供可能。以下介绍这几种IF1转基因小鼠的表型。

### 3.1 IF1基因敲除小鼠

目前,全身IF1敲除(IF1-KO)小鼠已经有报道,组织特异性敲除小鼠还未见报道。

**3.1.1 敲除IF1基因提高细胞在应激状态下的生存能力** 在全身IF1-KO的C57BL/6J小鼠模型中,小鼠的生长和繁殖均正常,行为无异常,且血检结果和饥饿反应均正常<sup>[34]</sup>。组织解剖、细胞自噬、线粒体形态、ATP合酶分子含量及ATP合成活性也均正常。尽管IF1在真核生物中普遍存在,但它并不是小鼠正常发育必需的蛋白质。然而,在应激条件下,IF1-KO小鼠的细胞护能力提高<sup>[35]</sup>。有研究表明,IF1-KO小鼠前脂肪细胞分化成脂肪细胞的能力提高,合成甘油三酯的能力加强<sup>[36]</sup>。IF1-KO小鼠骨髓细胞在体外分化成巨噬细胞后,线粒体合成ATP的能力增强,其中包括三羧酸循环的酶表达增加,线粒体氧耗量增加<sup>[37]</sup>。

**3.1.2 敲除IF1基因可保护心脏** 心肌肥厚增加心肌缺血和缺氧的风险,是造成心衰的重要原因之一。在缺氧条件下,线粒体呼吸链因缺氧不能正常运转,导致膜电位降低和ATP不足,心肌细胞出现坏死。肥厚的心肌表达IF1升高,敲除IF1基因可降低心肌肥厚引起的心衰发生率<sup>[38]</sup>。在IF1-KO小鼠中,心肌肥厚造成的ATP缺乏状态得到明显缓解,心衰发生率降低。IF1-KO的作用机制可分两个方面:一方面防止线粒体膜电位降低造成的细胞死亡<sup>[35]</sup>;另一方面刺激细胞通过自噬合成ATP,提高对缺氧的适应能力<sup>[38]</sup>。这些研究提示,抑制IF1可改善心肌功能,IF1成为病理性心肌肥厚和心力衰竭治疗的潜在药物靶点。

**3.1.3 敲除IF1基因提高肝细胞应激能力** 线粒体呼吸链的很多蛋白是由线粒体基因编码的,在线粒体遗传病中,呼吸链障碍引起的疾病很常见,且没



有好的治疗方法。在这类疾病基因靶点筛选中, *IF1* 基因被发现是一个潜在的治疗靶点<sup>[35]</sup>。在毒素引起的呼吸链障碍细胞模型中, 敲除 *IF1* 基因可提高肝细胞对毒素的耐受力, 毒素引起的肝细胞死亡率降低。在机制方面, 呼吸链发生障碍时, ATP合酶利用ATP维持膜电位的能力提高, 大大降低 *IF1*-KO 细胞死亡风险<sup>[35]</sup>。

### 3.2 *IF1* 基因过表达小鼠表型

组织特异过表达小鼠包括神经、肝脏和肠道上皮细胞转基因小鼠已有报道, 但全身过表达小鼠还未见报道。

3.2.1 *IF1* 提高神经元对毒素的抵抗力 为研究 *IF1* 激活对神经元代谢的影响, FORMENTINI 等<sup>[22]</sup>建立了神经元特异的活化型 *IF1* (*IF1*-H49K) 过表达小鼠。*IF1*-H49K 变异蛋白模拟 *IF1* 在 pH 降低时激活的状态, 且不受 pH 升高的抑制, 持续处于活化状态<sup>[22]</sup>。转基因小鼠 ATP 合酶活性受到抑制, 脑组织 ATP 水平明显降低、AMPK 活性升高、糖酵解反应增强。在大脑皮层神经元培养中观察到, *IF1* 抑制 ATP 合酶, 降低神经元功能和增强有氧糖酵解, mtROS 和细胞蛋白羧基化水平均升高。尽管如此, 转基因小鼠与对照组相比, 在正常情况下没有出现其它明显表型。

然而, 转基因小鼠神经元抗损伤的能力提高。在小鼠神经毒性模型中, 左纹状体注射喹诺酸诱导神经元损伤, 转基因小鼠神经元死亡减少<sup>[22]</sup>。这表明, *IF1* 过表达可以保护神经元免受氧化损伤, 发挥保护细胞的作用。信号通路分析提示, Akt/mTORC1、NF- $\kappa$ B 及 PARP 修复通路的活性增加。这些表现可能是氧化反应和细胞修复能力同时提高的结果。此研究表明, *IF1* 使神经元产生代谢重编程, 发生线粒体低毒兴奋效应 (mitohormetic response), 从而减少神经毒物质产生的损伤。

3.2.2 *IF1* 增加肿瘤的发生率和生长速度 为研究 *IF1* 激活对肝脏代谢的影响, SANTACATTERINA 等<sup>[21]</sup>建立了肝细胞 *IF1* (*IF1*-H49K) 过表达小鼠, 并用 Tet-On 和 Tet-Off 方式控制转基因表达。线粒体的氧化磷酸化在该小鼠肝脏中被抑制, AMPK 和 p38 MAPK 被激活, 诱导能量代谢改变效应<sup>[21]</sup>。在化学致癌剂二乙基亚硝胺 (diethyl-nitrosamine, DEN) 诱导的肝癌模型中, 转基因小鼠的肿瘤数量和肿瘤体积均显著高于野生小鼠。免疫组化分析显示, 过表达 *IF1* 的癌细胞增殖速度和抗凋亡能力均升高, 证明 *IF1* 的

促癌活性。此外, 转基因肝细胞对乙酰氨基酚诱导的细胞凋亡反应减弱。

3.2.3 *IF1* 提高细胞炎症反应和细胞微环境的抗炎水平 肠道上皮细胞过表达人类野生型 *IF1* 基因的小鼠模型曾用于评估 *IF1* 活化对肠道炎症反应的影响: *IF1* 转基因使肠道上皮细胞线粒体 ATP 合酶被抑制, 产生 mtROS 增加, NF- $\kappa$ B 活性升高, 上皮细胞的炎症状态提高; 但肠道局部 M2 型巨噬细胞增加, 出现抗炎反应<sup>[14]</sup>。在右旋糖酐硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导的结肠炎模型中, 转基因小鼠的肠道出现抗炎表型。用线粒体靶向抗氧化剂 MitoQ 抑制上皮细胞的 mtROS, NF- $\kappa$ B 活性降低, 抗炎表型消失<sup>[14]</sup>。这些发现说明, *IF1* 在肠道上皮细胞中诱导炎症反应, 但此反应在局部组织增加 M2 型巨噬细胞, 可降低肠道炎症反应。

## 4 结语与展望

本文的目标是通过梳理 *IF1* 的相关文献, 强调 *IF1* 调节细胞内 ATP 水平的重要作用, 并以此为基础统一解释 *IF1* 在病理生理条件下的多种作用。*IF1* 作为 ATP 合酶的一个天然抑制因子, 既可以抑制其合成也可以抑制其水解 ATP 的作用, 从而调节能量代谢和线粒体功能, 成为近年来肿瘤研究的热点。*IF1* 基因在线粒体丰富的细胞中表达较高, 但在肿瘤细胞表达也增加。*IF1* 表达的调控机制还不清楚, 尚需进一步研究。*IF1* 蛋白活性受到组氨酸质子化和磷酸化的调节: 组氨酸质子化激活而丝氨酸磷酸化抑制 *IF1* 活性。*IF1* 参与调节线粒体膜电位、基质 pH 值、ATP 合成、ROS 产生和产热等活动, 通过这些作用影响细胞在应激情况下的代偿和生存能力。例如, 在交感神经兴奋状态下, *IF1* 蛋白因磷酸化水平升高活性受到抑制, 促进细胞适应恶劣的环境 (如缺氧或呼吸链中毒条件下)。此观点得到基因敲除小鼠实验的支持, 如抑制 *IF1* 活性可增加心肌和肝脏细胞在应激条件下的生存能力, 促进脂肪细胞分化和提高巨噬细胞 ATP 水平。当 *IF1* 功能增强时, *IF1* 通过抑制线粒体产生 ATP, 促进糖酵解产生 ATP, 对细胞能量代谢进行编程。此观点得到基因过表达小鼠实验支持, 如提高 *IF1* 基因表达可造成线粒体 ROS 增多引起线粒体低毒兴奋效应和糖酵解加强, 从而提高细胞炎症反应, 加速肿瘤细胞生长。此为 *IF1* 在某些肿瘤中表达升高提供了解释。尽管这些文献支持 *IF1* 通

过能量代谢编程调节细胞在生理和病理条件下的多种代偿活动,但这些理论还没有转化为临床治疗疾病的手段。此现状提示,我们对IF1生物学作用的了解才刚刚开始,有待在深度和广度上进一步加强对IF1功能的研究。

### 参考文献 (References)

- [1] WALKER J E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(1): 1-16.
- [2] GARCÍA-BERMÚDEZ J, CUEZVA J M. The ATPase inhibitory factor 1 (IF1): a master regulator of energy metabolism and of cell survival [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(8): 1167-82.
- [3] 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): 2052-65.
- [4] GU J, ZHANG L, ZONG S, et al. Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1 [J]. *Science*, 2019, 364(6445): 1068-75.
- [5] CAMPANELLA M, PARKER N, TAN C H, et al. IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase [J]. *Trends Biochem Sci*, 2009, 34(7): 343-50.
- [6] ZANOTTI F, GNONI A, MANGIULLO R, et al. Effect of the ATPase inhibitor protein IF1 on H<sup>+</sup> translocation in the mitochondrial ATP synthase complex [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 384(1): 43-8.
- [7] CAMPANELLA M, CASSWELL E, CHONG S, et al. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1 [J]. *Cell Metab*, 2008, 8(1): 13-25.
- [8] SANTO-DOMINGO J, DEMAUREX N. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the renaissance of mitochondrial pH [J]. *J Gen Physiol*, 2012, 139(6): 415-23.
- [9] SCIALO F, FERNANDEZ-AYALA D J, SANZ A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 428.
- [10] CADENAS S. ROS and redox signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117: 76-89.
- [11] FORMENTINI L, SANCHEZ-ARAGO M, SANCHEZ-CENIZO L, et al. The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response [J]. *Mol Cell*, 2012, 45(6): 731-42.
- [12] CHOUCANI E T, KAZAK L, JEDRYCHOWSKI M P, et al. Mitochondrial ROS regulate thermogenic energy expenditure and sulfenylation of UCP1 [J]. *Nature*, 2016, 532(7597): 112-6.
- [13] GERLE C. On the structural possibility of pore-forming mitochondrial FoF1 ATP synthase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1857(8): 1191-6.
- [14] FORMENTINI L, SANTACATTERINA F, NUNEZ DE ARENAS C, et al. Mitochondrial ROS production protects the intestine from inflammation through functional M2 macrophage polarization [J]. *Cell Rep*, 2017, 19(6): 1202-13.
- [15] DEMINE S, RENARD P, ARNOULD T. Mitochondrial uncoupling: a key controller of biological processes in physiology and diseases [J]. *Cells*, 2019, 8(8): 795
- [16] BERTHOLET A M, CHOUCANI E T, KAZAK L, et al. H transport is an integral function of the mitochondrial ADP/ATP carrier [J]. *Nature*, 2019, 571(7766): 515-20.
- [17] RUPRECHT J J, KING M S, ZÖGG T, et al. The molecular mechanism of transport by the mitochondrial ADP/ATP carrier [J]. *Cell*, 2019, 176(3): 435-47, e15.
- [18] FEDORENKO A, LISHKO P V, KIRICHOK Y. Mechanism of fatty-acid-dependent UCP1 uncoupling in brown fat mitochondria [J]. *Cell*, 2012, 151(2): 400-13.
- [19] GARCÍA-BERMÚDEZ J, SÁNCHEZ-ARAGÓ 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): 2143-55.
- [20] ESPARZA-MOLTÓ P B, NUEVO-TAPIOLES C, CUEZVA J M. Regulation of the H-ATP synthase by IF1: a role in mitohormesis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(12): 2151-66.
- [21] SANTACATTERINA F, SÁNCHEZ-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.
- [22] FORMENTINI L, PEREIRA M P, SÁNCHEZ-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): 762-78.
- [23] SÁNCHEZ-CENIZO L, FORMENTINI L, ALDEA M, et al. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(33): 25308-13.
- [24] SÁNCHEZ-ARAGÓ M, FORMENTINI L, MARTÍNEZ-REYES I, et al. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers [J]. *Oncogenesis*, 2013, 2: e46.
- [25] ESPARZA-MOLTÓ P B, NUEVO-TAPIOLES C, CHAMORRO M, et al. Tissue-specific expression and post-transcriptional regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) in human and mouse tissues [J]. *Faseb J*, 2019, 33(2): 1836-51.
- [26] MOURIER A, RUZZENENTE B, BRANDT T, et al. Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(10): 2580-92.
- [27] STERKY F H, RUZZENENTE B, GUSTAFSSON C M, et al. LRPPRC is a mitochondrial matrix protein that is conserved in metazoans [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 398(4): 759-64.
- [28] SASARMAN F, BRUNEL-GUITTON C, ANTONICKA H, et al. LRPPRC and SLIRP interact in a ribonucleoprotein complex that regulates posttranscriptional gene expression in mitochondria [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(8): 1315-23.
- [29] TSUCHIYA N, FUKUDA H, NAKASHIMA K, et al. LRP130, a single-stranded DNA/RNA-binding protein, localizes at the outer nuclear and endoplasmic reticulum membrane, and interacts with mRNA *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 317(3): 736-43.
- [30] MILI S, PIÑOL-ROMA S. LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound *in vivo* to mitochondrial and nuclear RNAs [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(14): 4833-43.



- 4972-82.
- [31] SHEN L, ZHI L, HU W, et al. IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(4): 603-12.
- [32] HUANG L J, CHUANG I C, DONG H P, et al. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver [J]. *Shock*, 2011, 36(1): 90-6.
- [33] SGARBI G, BARBATO S, COSTANZINI A, et al. The role of the ATPase inhibitor factor 1 (IF) in cancer cells adaptation to hypoxia and anoxia [J]. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 2018, 1859(2): 99-109.
- [34] NAKAMURA J, FUJIKAWA M, YOSHIDA M. IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice [J]. *Biosci Rep*, 2013, 33(5): 735-41.
- [35] CHEN W W, BIRSOY K, MIHAYLOVA M M, et al. Inhibition of ATP1F1 ameliorates severe mitochondrial respiratory chain dysfunction in mammalian cells [J]. *Cell Rep*, 2014, 7(1): 27-34.
- [36] 关丫丫, 梁银明, 王辉, 等. 三磷酸核苷合酶抑制因子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*(GUAN Y Y, LIANG Y M, WANG H, et al. Effect of adenosine triphosphate synthase inhibitory factor 1 gene knockout on ATP level and differentiation of adipocytes in fibroblasts of mice [J]. *Journal of Xinxiang Medical University*), 2018, 35(8): 658-61.
- [37] 于晓晴, 钟根深, 熊熙文, 等. 三磷酸核苷合酶抑制因子1基因敲除对小鼠巨噬细胞线粒体功能和三磷酸核苷水平的影响[J]. *新乡医学院学报*(YU X Q, ZHONG G S, XIONG X W, et al. Effects of adenosine triphosphate synthase inhibitor 1 gene knockout on the levels of adenosine triphosphate and mitochondrial function in mouse macrophages [J]. *Journal of Xinxiang Medical University*), 2019, 36(6): 501-5.
- [38] 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]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 10501.