

用于线粒体毒性检测和表征的定制化 XF 工作流程

作者

Yoonseok Kam,
George W. Rogers,
Lisa Winer,
Melanie Schwalfenberg,
Natalia Romero
安捷伦科技有限公司

摘要

我们开发了一种定制化 XF 解决方案，可用于对引发线粒体毒性的化合物进行检测和定量评估。安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测能够：

- 识别和区分不同的线粒体毒性模式
- 对毒性程度进行标准化定量测量
- 提供针对检测质量和性能评估的指标，使用户对获得的数据充满信心
- 提供快速、简单的检测设置，用于化合物筛选或剂量响应分析

本应用简报为使用 XF 线粒体毒性检测进行化合物筛选和剂量响应实验以及使用线粒体毒性指标 (MTI) 解析结果数据提供了概念验证和示例。此外，本应用简报还探讨了使用 XF 线粒体毒性检测时的检测策略设计、性能指标和具体案例。

安捷伦 Seahorse XF 技术是一种无标记的集成平台，无缝结合了安捷伦 Seahorse XF Pro 分析仪、探针板、分析试剂盒和软件，可提供细胞代谢功能的实时动力学数据。XF 线粒体毒性检测解决方案包含经过验证的试剂，可提供简化的工作流程，主要由安捷伦 Wave Pro 软件和安捷伦 Seahorse Analytics 工具支持，可进行直观的检测设计、性能评估、数据质量评估和数据解析。总之，这一标准化 XF 解决方案让用户能够快速获得可靠的结果和有意义的结论，减少了为评估线粒体毒性而开发检测方法的需求。

前言

线粒体在 ATP 产生、代谢控制、免疫反应、信号转导和细胞凋亡等多种细胞生理机制的调节过程中发挥着关键作用^[1]。线粒体损伤涉及可导致线粒体功能障碍的过程或损伤，包括通过直接酶抑制、氧化性损伤以及线粒体/核 DNA 突变和/或其他上游细胞过程造成的损伤。

线粒体也可能意外成为药物和治疗性化合物的靶标，导致线粒体功能受损（图 1）。这种由药物引起的线粒体毒性可能造成大脑、心脏、肝脏、肌肉和/或肾脏损伤：这些都是高度依赖氧化磷酸化的器官或主要的药物代谢器官^[2]。许多不同类型的药物均可引起线粒体毒性。许多对人体和环境健康有害的农业、工业和药用化学品均通过线粒体毒性机制发挥作用^[3]。

因此，在治疗性化合物的开发过程中，对线粒体毒性进行灵敏、准确的特异性检测是一个关键考虑因素，有助于减少候选药物的研发损耗和上市后药物的撤回。在许多适用的临床前细胞器模型和体外细胞模型中，基于耗氧量的检测方法被认为是用于评估线粒体功能障碍和毒性的检测方法中信息量最大、特异性最高的方法^[4-6]。已有研究表明，使用 Seahorse XF 技术通过测定耗氧量直接评估线粒体功能可作为线粒体毒性的一种灵敏的特异性标志物/指标^[4,7]。

本应用简报介绍了一种定制化 XF 检测方案，可简化线粒体毒性的检测和评估。将 Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒与 Seahorse XF Pro 分析仪以及专用软件功能相结合，能够轻松实现灵敏的线粒体毒性化合物检测和表征。该检测方法能够区分不同模式的线粒体毒性，提供针对毒性程度的标准化定量参数 MTI 以及用于评估检测质量和性能的指标。该解决方案兼容自动化，能够为化合物筛选或剂量响应实验提供快速、简单的检测设计和直观的数据解析。该解决方案旨在减少检测和评估线粒体毒性化合物所需的时间和精力。

用于标准化线粒体毒性评估的定制化 XF 检测设计

药物可以通过多种直接或间接方式影响线粒体功能（图 1），主要通过抑制电子传递链（ETC）蛋白质复合物、ATP 合酶和其他氧化磷酸化（OxPhos）成分、三羧酸（TCA）循环的酶、各种线粒体转运蛋白、线粒体转录和翻译机制，或通过 ETC 与 ATP 合成的解偶联来实现^[7]。这种药物诱导的线粒体功能障碍通常会影响线粒体耗氧率（OCR），可通过 Seahorse XF 技术对其进行直接评估。

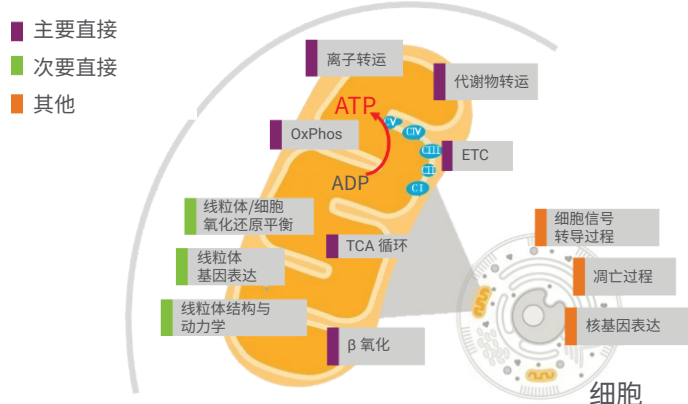


图 1. 药物诱导线粒体毒性中可作为潜在靶标的关键线粒体和细胞过程。主要的直接靶点包括代谢物和离子转运、三羧酸循环（TCA）、脂肪酸氧化（FAO）、电子传递链（ETC）和氧化磷酸化（OxPhos）机制。次要直接靶点包括氧化还原平衡、线粒体基因表达、结构与动力学。影响其他上游流程（如细胞信号转导、凋亡和核基因表达）的药物也可能导致下游线粒体毒性。请注意，本图仅用于说明目的，所提供内容并不全面



图 2. 使用安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测来研究化合物的急性、短期和长期效应的简化工作流程。请注意，建议（但非必须）在检测后进行细胞计数以用于数据归一化

在 Seahorse XF 线粒体毒性检测过程中，在检测开始前的指定时间向细胞中加入需要进行线粒体毒性评估的化合物（图 2），然后在基础（基础 OCR）、寡霉素诱导 (Oligo OCR) 和 FCCP 诱导 (FCCP OCR) 条件下实时测量 OCR（图 3A）。

根据测试化合物在基础 OCR、Oligo OCR 和/或 FCCP OCR 中的响应（与合适的对照相比），XF 线粒体毒性检测能够识别三种不同类型的线粒体毒性：

- 直接/间接抑制 ETC 或其他线粒体过程
- ETC 与 OxPhos 解偶联
- 其他可能靶向 OxPhos 机制成分（即复合物 V、腺苷酸转运蛋白 (ANT) 和无机磷酸盐转运蛋白 (P_i T)) 的抑制作用（图 3B）

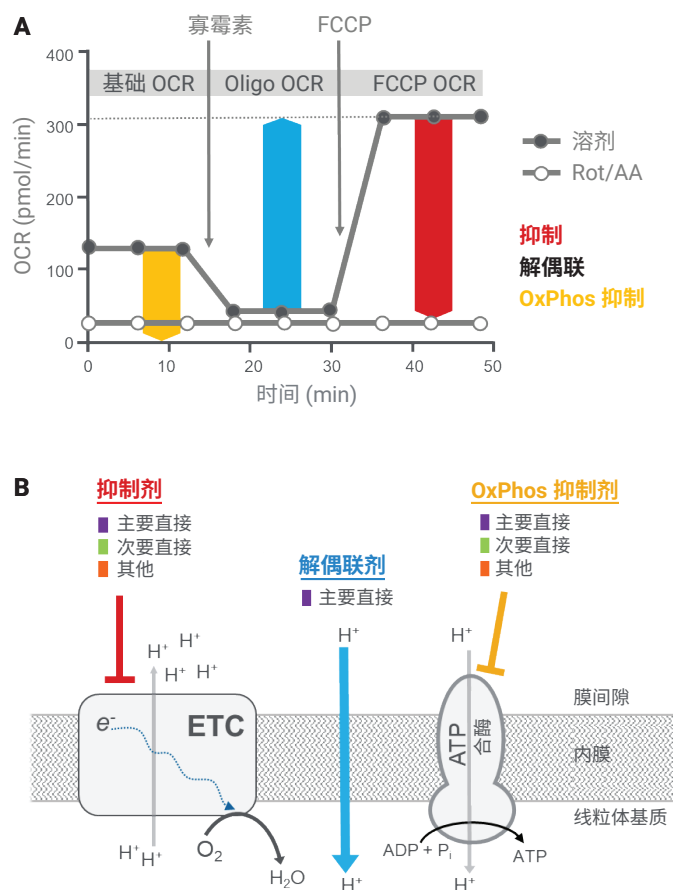


图 3. 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测确定的线粒体毒性模式。(A) 加入寡霉素和 FCCP 的对照组（溶剂和 Rot/AA）检测动力学图。分别测量 FCCP OCR、Oligo OCR 和基础 OCR 的变化，检测抑制剂、解偶联剂和 OxPhos 抑制剂 (OPI) 的影响。(B) 对转运、TCA、FAO、ETC 产生影响的化合物，或导致 FCCP OCR 降低的其他上游过程被归类为抑制剂。化合物作为质子载体将 ETC 与导致 Oligo OCR 增加的 OxPhos 机制解偶联，这种化合物被归类为解偶联剂。化合物对 OxPhos 机制（即 ATP 合酶、ANT、 P_i T）产生特异性抑制，这种化合物被归类为 OPI

为了区分上述线粒体毒性模式、量化毒性程度，引入了 MTI 值。抑制导致的线粒体毒性（抑制被定义为与溶剂组的最大 FCCP OCR 相比，测试化合物的 FCCP OCR 降低，并据此进行检测）会产生负的 MTI 值（通常在 0 与 -1 之间），如图 4A 所示。请注意，Rot/AA OCR 作为抑制的阳性对照（100% 抑制，MTI = -1），而溶剂 FCCP OCR 作为阴性对照（0% 抑制，MTI = 0）。此外，对于抑制而言，正的 MTI 值报告为 0。

解偶联导致的线粒体毒性（解偶联被定义为与溶剂组的最小 Oligo OCR 相比，测试化合物的 Oligo OCR 增加，并据此进行检测）会产生正 MTI 值（通常在 0 与 1 之间），如图 4B 所示。请注意，溶剂 FCCP OCR 作为解偶联的阳性对照（100% 解偶联，MTI = 1），而溶剂 Oligo OCR 作为阴性对照（0% 解偶联，MTI = 0）。此外，对于解偶联而言，负 MTI 值报告为 0。

线粒体功能减弱导致线粒体毒性的一个特殊情况是对 ATP 合酶或 OxPhos 机制的其他成分（如 ANT 或 P_iT ）的潜在抑制。这类抑制通常表现为基础 OCR 显著下降，而 Oligo OCR 和 FCCP OCR 不会受到显著影响（图 4C）。在这种情况下，测试化合物将被标记，以表明其由于对 OxPhos 成分（OPIs）的潜在抑制而存在线粒体毒性。如有必要，可以通过下游实验（如剂量响应实验、安捷伦 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试、安捷伦 Seahorse XF 底物氧化压力测试和/或正交实验）来进一步研究化合物的毒性作用/机制。请注意，该解决方案不会为这种特定类型的抑制计算 MTI 值。

有关 MTI 推导、计算和 XF 数据转换以及 OPI 检测标准和报告的详细信息，请参阅由 Rogers 等人编写的安捷伦白皮书^[6]。

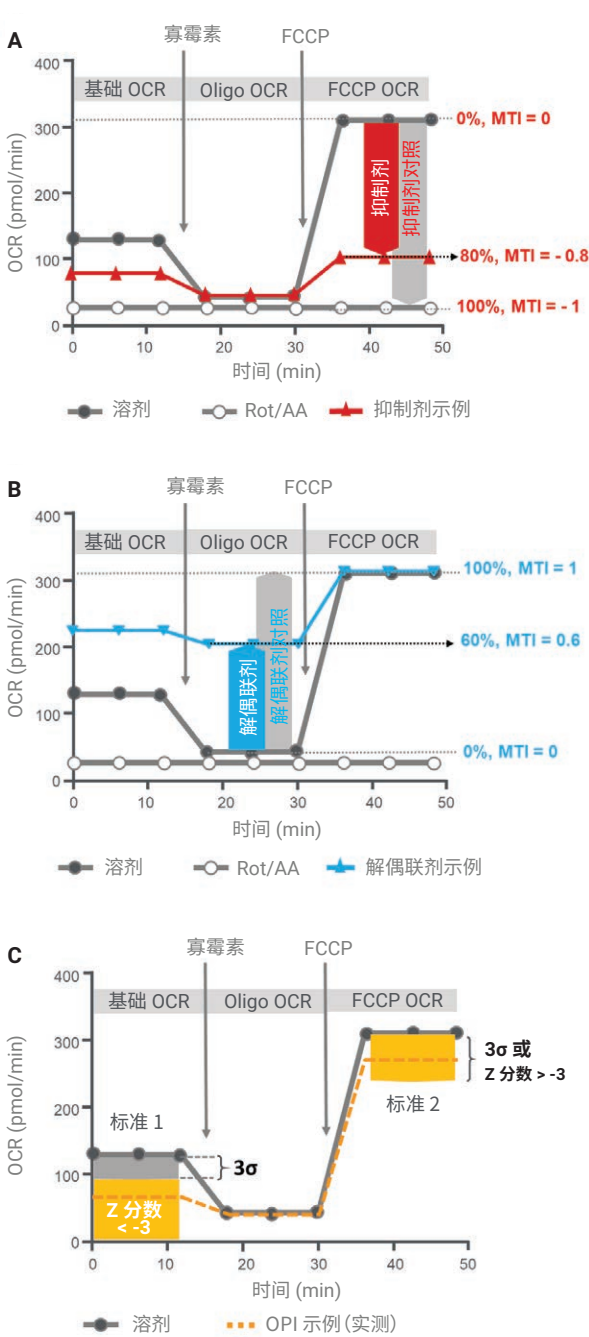


图 4. 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测的动力学 OCR 曲线，表明了 MTI 的定义以及用于评估线粒体毒性模式和毒性程度的标准。(A) 抑制的 MTI 定义；红线表示通过抑制作用体现线粒体毒性的化合物的动力学 OCR 曲线示例，其中，MTI = -0.8。(B) 解偶联的 MTI 定义；蓝线表示通过解偶联作用体现线粒体毒性的化合物的动力学 OCR 曲线示例，其中，MTI = 0.6。(C) 检测对 OxPhos 机制的抑制。需要两项标准：基础 OCR 的 Z 分数 < -3，FCCP OCR 的 Z 分数 > 3。请注意，无需为 OPI 计算 MTI 值。黄线表示通过 OxPhos 抑制作用体现线粒体毒性的化合物的动力学 OCR 曲线示例

总之，根据测试化合物在 FCCP OCR、Oligo OCR 和/或基础 OCR 中的响应（与合适的对照相比），XF 线粒体毒性检测能够识别三种不同类型的线粒体毒性：

- 直接/间接抑制 ETC 或其他线粒体过程
- ETC 与 OxPhos 解偶联
- OxPhos 机制的潜在抑制作用

此外，在基础呼吸以外的生物能量代谢条件下测量 OCR（即 Oligo OCR 和 FCCP OCR）可提高化合物线粒体毒性作用评估的特异性和灵敏度。

实验部分

XF 检测

将 HepG2 细胞以 2.0×10^4 个细胞/孔的密度接种到安捷伦 Seahorse XF Pro M 细胞培养微孔板中，培养基为添加了 2 mmol/L GlutaMAX 和 10% 血清的低浓度葡萄糖 DMEM (Gibco 11885)。接种后，将微孔板放入恒温箱中保存 1 小时，然后在 37 °C、5% CO₂ 的加湿环境中孵育 24 小时。第二天，用 XF 检测液（安捷伦 Seahorse XF DMEM 培养基，pH 7.4，添加 10 mmol/L 安捷伦 Seahorse XF 葡萄糖溶液、1 mmol/L 安捷伦 Seahorse XF 丙酮酸钠溶液和 2 mmol/L 安捷伦 Seahorse XF 谷氨酰胺溶液）清洗细胞两次，并在 37 °C、无 CO₂ 的条件下孵育 60 分钟。在清洗细胞时加入化合物

溶液以及鱼藤酮/抗霉素溶液（最终浓度为 0.5 μmol/L）。然后将细胞板转移到 XF Pro 分析仪中，按顺序加入寡霉素（最终浓度为 1.5 μmol/L）和 FCCP（最终浓度为 1.5 μmol/L），进行 XF 线粒体毒性检测。XF 检测结束后，使用配备 Agilent BioTek Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统的安捷伦 Seahorse XF 成像和归一化系统对细胞板进行成像，以确定每个孔中的细胞数量，用于进行检测数据的归一化。

所有 XF 检测均按照《安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒用户指南》^[9] 中所述的程序进行，包括化合物、试剂和探针板的准备过程。

使用 Bravo 自动化液体处理平台实现自动化使用 Agilent Bravo 自动化液体处理平台来简化 XF 检测的准备工作。在所有的检测过程中使用 Bravo 平台进行细胞清洗，每孔留 100 μL 的最终体积，为添加 100 μL 的 2x 化合物溶液做准备。对于滴定分析和 Enzo 化合物库筛选，在洗板后使用 Bravo 平台制备化合物溶液并将溶液转移到细胞板中。

在此过程中使用的实验室器具如《Bravo Seahorse 实验工作台用户指南》所述^[10]。细胞清洗方案是对《用于 Seahorse XFe96 样品前处理的 Bravo 工作流程》^[11] 中的方案进行修改后的方案。在 96 孔储液槽中进行连续稀释和化合物库稀释，仅需一步即可转移预处理溶液。加药口采用手动加药。如有需要，也可以使用 Bravo 平台完成此步骤。

表 1. 手动或使用 Agilent Bravo 平台执行的检测步骤

	Z' 值测定	十种化合物筛选	十步，两倍连续稀释	八种化合物筛选
细胞清洗	Bravo 平台	Bravo 平台	Bravo 平台	Bravo 平台
2x 化合物准备	手动	手动	Bravo 平台	Bravo 平台
2x 化合物转移	手动	手动	Bravo 平台	Bravo 平台

XF 线粒体毒性检测数据分析与解析

使用基于 Web 的软件平台 Seahorse Analytics 对 XF 线粒体毒性检测结果文件进行分析和解析。Seahorse Analytics 中的专用工具（小部件）使用动力学 OCR 测量结果自动计算关键的线粒体毒性检测参数（包括 MTI 值、IC₅₀ 和/或 EC₅₀ 值）和检测性能指标 Z' 值（图 5）。然后将这些参数显示为 MTI 热图、MTI 柱状图、剂量响应曲线和 Z' 值评估。Rogers 等人在安捷伦白皮书中详细介绍了检测设计方法、MTI 推导和用于计算 XF 线粒体毒性检测参数的公式^[8]。XF 线粒体毒性测定试剂盒用户指南中包含有关使用 Seahorse Analytics 分析及解析 XF 线粒体毒性检测结果的说明^[9]。

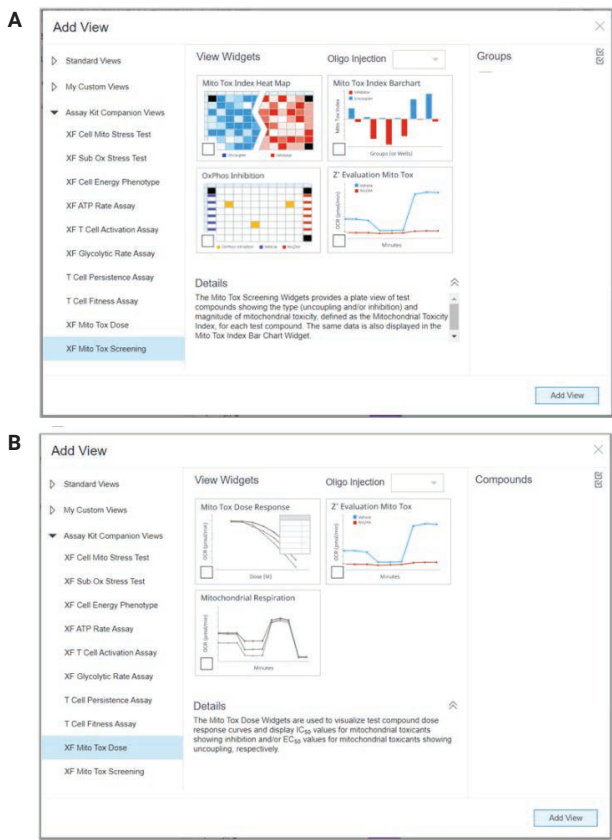


图 5. 安捷伦 Seahorse Analytics 线粒体毒性检测相关视图。(A) XF 线粒体毒性筛查工具，包括 MTI 热图和柱状图、OPI 检测热图和对检测性能的 Z' 值评估。(B) XF 线粒体毒性剂量分析工具，包括剂量响应曲线（包含 IC₅₀ 和 EC₅₀ 值）、动力学线粒体呼吸 (OCR) 图和对检测性能的 Z' 值评估

Glu/Gal：测定总 ATP

对于“Glu”条件，在高浓度葡萄糖 DMEM（41965039，Gibco）中培养 HepG2 细胞（HB-8065，ATCC）；对于“Gal”条件，在加入了 10 mmol/L 半乳糖（48359，Sigma-Aldrich）的无葡萄糖 DMEM（11966025，Gibco）中培养 HepG2 细胞。向两种培养基中添加 10% FBS（F0804，Sigma-Aldrich）、1% 青霉素/链霉素（P4333，Sigma-Aldrich）和 1 mmol/L Seahorse XF 丙酮酸钠溶液（货号 103578-100）。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 的加湿环境中。在为 Glu/Gal 检测接种细胞之前，让细胞适应“Gal”条件至少三代。

根据之前公布的方案进行 Glu/Gal 检测和结果解析^[5,12]。将在 Glu 或 Gal 培养基中生长的细胞以 2 × 10⁴ 个细胞/孔的密度接种到 96 孔安捷伦细胞培养微孔板（货号 204626-100）上的生长培养基中。接种后，将微孔板置于室温下 1 小时，然后在 37 °C、5% CO₂ 的加湿环境中孵育 24 小时。然后用浓度在 0.14–100 μmol/L 之间的测试化合物或溶剂（使用 10 mmol/L DMSO 原液以 1:3 稀释）处理细胞，具体方法是加入 1 μL 的稀释化合物溶液（孔中 DMSO 均为 1%），然后将微孔板放回培养箱中孵育 24 小时。在两次孵育步骤期间用 AeraSeal 薄膜（A9224，Merck Aldrich）密封微孔板，避免不均匀蒸发。按照制造商提供的说明书，使用 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（G7570，Promega）评估作为细胞活力指标的 ATP 水平。采用 Agilent BioTek Synergy H1 多功能微孔板检测仪或 Cytation 5 细胞成像多功能微孔板检测系统，使用默认的发光检测方案进行发光检测。使用 n ≥ 2 对各条件进行测试。

使用 Agilent BioTek Cytation 5 Gen5 软件（版本 11），对照板上的溶剂对照孔（100%）计算细胞活力。使用 GraphPad Prism 8 中的四参数 Logistic 拟合计算 IC₅₀ 值。将最低值和最高值分别设定为 0% 和 100%。舍弃 R² 值小于 0.5 的拟合。

计算每个独立的生物学重复样品的 IC₅₀(Glu):IC₅₀(Gal) 比值，然后计算平均值。在 Glu 和 Gal 条件下 IC₅₀ 估算值大于 100 μmol/L 的化合物被视为无活性 (NA)。

化合物结果被划分为以下几种类别（表 2）。

表 2. 化合物结果分类

IC ₅₀ (Glu)/IC ₅₀ (Gal) 的比值	相对线粒体毒性作用
>>3 或 >3	强线粒体毒性作用
2-3*	混合毒性；线粒体毒性加强了化合物的毒性
<2	在该检测中，化合物的作用只针对极少或不针对线粒体成分

* 如果估算的 IC₅₀(Glu) > 100 μmol/L，则可能观察到比值 >3 或 >> 3，表明该化合物具有很强的线粒体毒性作用

材料

材料	材料供应商	货号
HepG2	ATCC	HB-8065
DMEM 培养基, 低浓度葡萄糖	Gibco	11885
GlutaMAX	Gibco	35050061
胎牛血清	HyClone	
Seahorse XF Pro M FluxPak	安捷伦科技公司	103775-100 或 103777-100
Seahorse XF DMEM 培养基, pH 7.4	安捷伦科技公司	103575-100
Seahorse XF 1.0 mol/L 葡萄糖溶液	安捷伦科技公司	103577-100
Seahorse XF 100 mmol/L 丙酮酸钠溶液	安捷伦科技公司	103578-100
Seahorse XF 200 mmol/L 谷氨酰胺溶液	安捷伦科技公司	103579-100
Seahorse XF 线粒体毒性测定试剂盒	安捷伦科技公司	103595-100
SCREEN-WELL 肝毒性库	Enzo Life Sciences	
测试化合物	Sigma-Aldrich	多个
Seahorse XF Pro 分析仪	安捷伦科技公司	
Cytation 5	安捷伦科技公司	

结果与讨论

检测性能评估

在定义了线粒体毒性的定量指标（MTI 值）后，还需要演示如何使用多个参数来评估检测性能的质量。图 6A 显示了对照组和检测窗口，评估了 Z' 因子并分别计算了抑制剂和解偶联剂的 MTIs。使用暴露于溶剂或 Rot/AA 溶液的 HepG2 细胞比较了各板 and 不同日期的 Z' 值。如图所示，使用相反的板布局将 XF Pro M 板分为两组（图 6B）。结果表明，对于归一化和未归一化的数据，解偶联和抑制的 Z' 值始终大于 0.5，并且与板布局或不同板间和不同日期间性能的变化无关（图 6C）。数据表明，解偶联和抑制的动态检测窗口可用于使用 HepG2 细胞评估线粒体毒性的筛选应用。建议在使用测试化合物进行

XF 线粒体毒性检测之前采用这种评估 Z' 值的策略。除了初始检测验证以外，Z' 值还可用于追踪不同检测之间的性能一致性。有关 Z' 值计算的更多信息，请参阅 Rogers 等人编写的安捷伦白皮书^[8]。

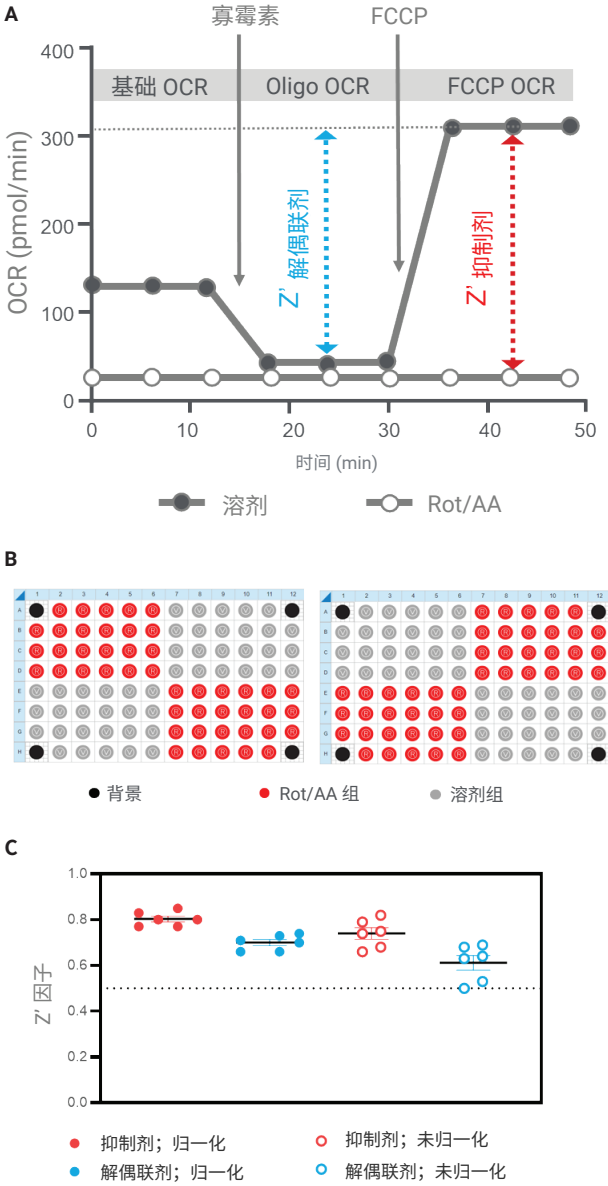


图 6. 使用 Z' 值评估安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测的性能。(A) 用于计算解偶联（蓝色）和抑制（红色）的 Z' 值的动态范围。(B) 显示对照组位置的孔板分布图（每块板 n = 46）；溶剂（灰色）和 Rot/AA（红色）。(C) 连续三天获得的 Z' 值汇总，使用通过安捷伦 Seahorse XF 成像和归一化系统获得的细胞计数进行数据归一化或不对数据进行归一化

XF 线粒体毒性检测在化合物筛选中的应用

XF 线粒体毒性检测旨在用于化合物筛选，其能够以单一浓度在每块板上筛选多达 80 种化合物（图 7A）。可以根据所需的样品化合物和重复孔的数量定制检测设计（例如：10 种测试化合物，每种化合物重复 8 次，图 7B）。

为了提供初始原理验证并演示 XF 线粒体毒性检测过程，我们评估了一组已知可引发线粒体毒性作用（包括抑制、解偶联和 OxPhos 抑制）的化合物（表 3）。

在将细胞培养基更换为 XF 检测液后，将这些化合物（最终浓度为 100 μmol/L）加入 HepG2 细胞，然后进行 XF 线粒体毒性检测。使用 Seahorse Analytics 将动力学 OCR 数据转换为 MTI 值和/或分析每种化合物的潜在 OPI（图 8A 至图 8D）。

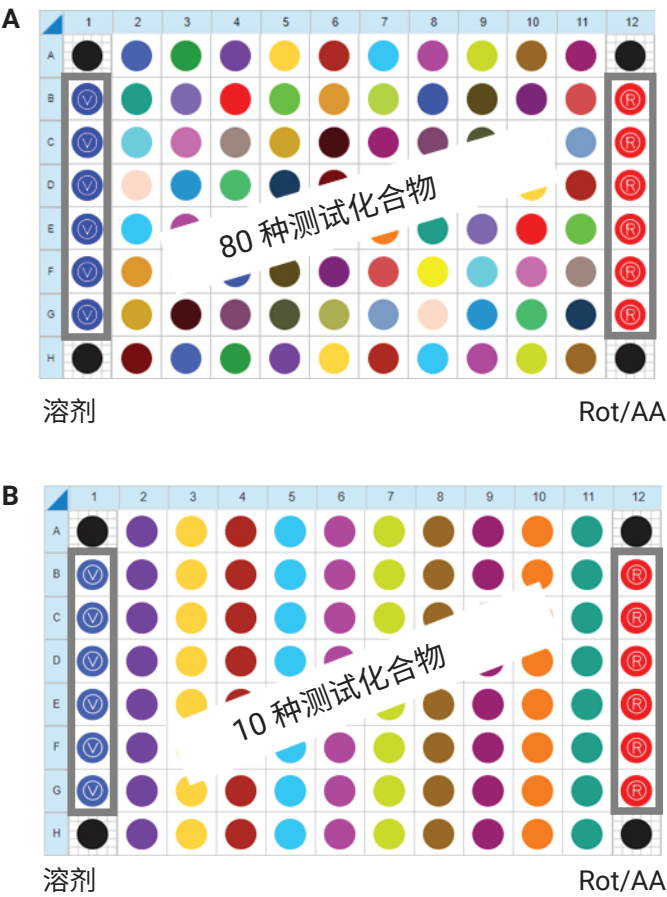


图 7. 用于化合物筛选的安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测设计。(A) 80 种化合物的筛选检测设计，n = 1，每块板一种剂量。(B) 10 种化合物的筛选检测设计示例，n = 8，每块板一种剂量。请注意，计算 MTI 和 Z' 值需要溶剂组和 Rot/AA 组

表 3. 用于安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测的初始概念验证测试的化合物组

化合物（缩写）	预期用途	线粒体毒性	参考文献
硫唑嘌呤 (AZ)	免疫抑制	线粒体损伤、ATP 耗竭	Al Maruf 等人 ^[13] Menor 等人 ^[14]
氯非铵甲苯磺酸盐 (CT)	钾离子通道阻滞剂。	DNA 稳定化合物，可能成为治疗 POLG 相关疾病的有效替代药物	Pitayu 等人 ^[15]
DCCD (DC)	ATP 合酶抑制剂。	DCCD 通过与其中一个 c 亚基结合，对 F ₀ 亚基旋转造成空间位阻，从而抑制 ATP 合酶	Luz 等人 ^[16] Hong 和 Pedersen ^[17]
二氟尼柳 (DI)	二氟尼柳是一种具有镇痛和抗炎活性 (NSAID) 的水杨酸衍生物	ETC 与 OxPhos 解偶联	Nadanaciva 等人 ^[18]
非诺贝特 (FF)	治疗严重的高甘油三酯血症和混合性血脂异常	通过降低 MMP 和诱导氧化应激引发线粒体功能障碍	Chen 等人 ^[19]
尼美舒利 (NI)	抗炎药、NSAID	在人肝癌细胞中进行线粒体解偶联并诱发线粒体通透性转变：白蛋白的保护作用	Nadanaciva 等人 ^[18]
依西酸喷他肽 (PI)	喷他肽是一种抗菌药物	线粒体抑制剂	Ludewig 等人 ^[20]
利培酮 (RI)	抗精神病药：可治疗精神分裂症、躁郁症、自闭症引起的烦躁易怒。	ETC 抑制 (CI 和 CII/III)	Cikánková 等人 ^[21]

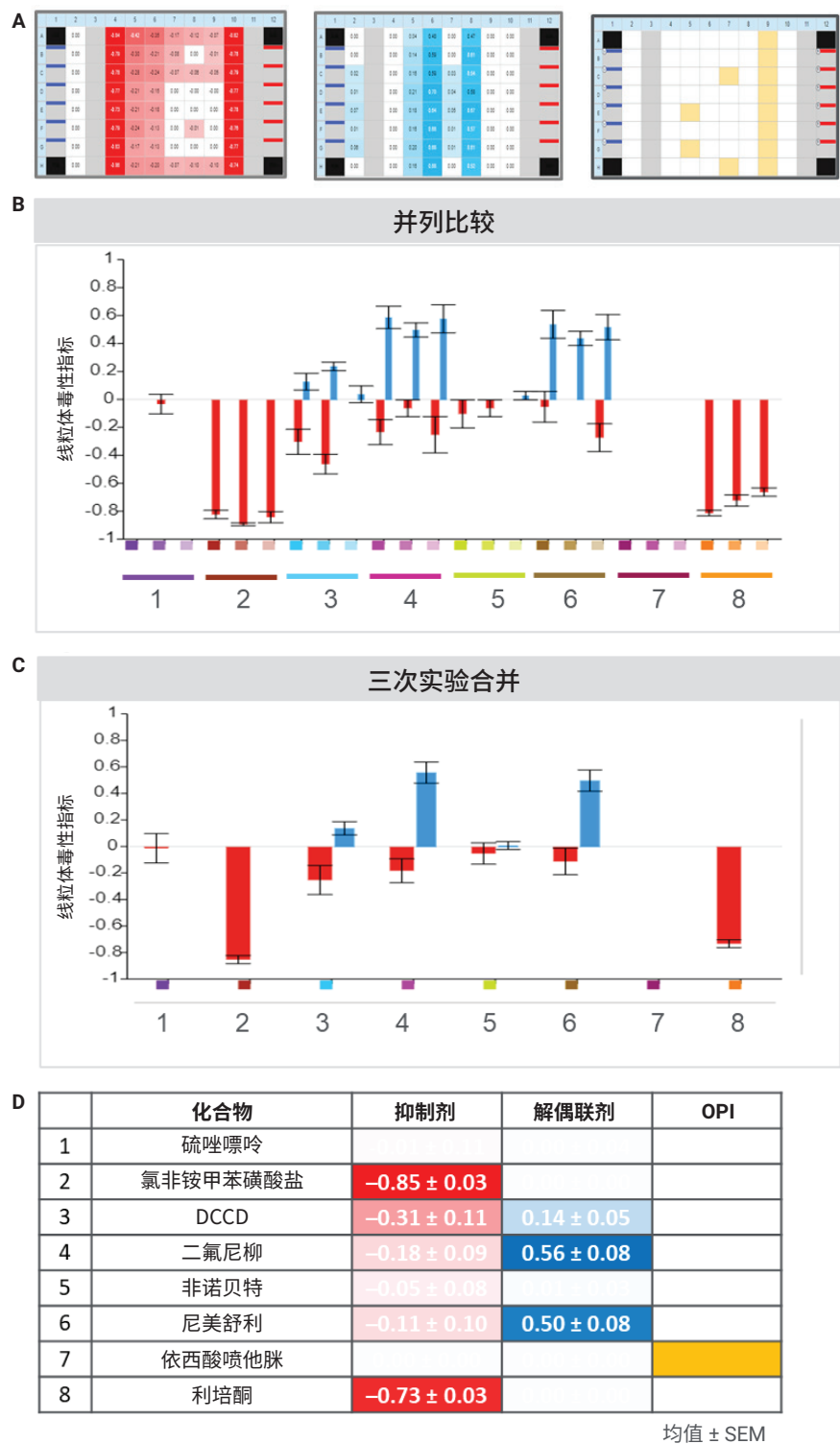


图 8. 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测：初步理论论证。(A) MTI 热图视图，显示了抑制剂（左）和解偶联剂（中）MTI 值以及 OPI 检测（右）。(B) MTI 柱状图，并列比较了每种化合物三次独立实验得到的 MTI 值。(C) 柱状图，显示了三次独立实验获得的平均 MTI 值。(D) 各种测试化合物的 MTI 值和 OPI 检测汇总表（均值 + SEM）；(n = 8)

XF 线粒体毒性检测的数据分析提供了以下结果：氯非铵甲苯磺酸盐和利培酮的 MTI 值为明显的负值，表明线粒体毒性的机制为抑制，这与 Pitay 等人^[15]和 Cikánková 等人^[21]发表的结果一致。二氟尼柳和尼美舒利的 MTI 值为正值，表明线粒体毒性的机制是解偶联，这与 Nadanaciva 等人^[18]得到的结果一致。DCCD 是一种特异性较低的已知 ATP 合酶抑制剂 (Ludewig 等人^[20])，既具有解偶联作用，也具有抑制作用，这可能是由于其在相对较高的浓度 (100 $\mu\text{mol/L}$) 下的作用具有非特异性。两种化合物 (硫唑嘌呤和非诺贝特) 的 MTI 值没有显著变化。据 Al Maruf 等人报告，当硫唑嘌呤的浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时，毒性作用非常小，但是，随着硫唑嘌呤浓度的提高，预计会检测到毒性作用^[13]。Chen 等人^[19]发现，在将非诺贝特加入到细胞中后，OCR 显著下降，但是，在他们的研究中，化合物处理时间为 24 小时，而在本研究中，处理时间为 2 小时，因此，随着增加 XF 线粒体毒性检测之前的化合物孵育时间，预计会检测到毒性作用。本应用简报进一步探讨了化合物处理的剂量和时间的的影响，Rogers 等人编写的安捷伦白皮书中包含相关概述^[6]。

如前文所述，线粒体功能减弱导致线粒体毒性的一个特殊情况是对 OxPhos 机制的成分产生直接抑制，包括：ATP 合酶、ANT 和/或 P_i T。这种类型的抑制通常表现为基础 OCR 显著下降，而 Oligo OCR 和 FCCP OCR 不会受到显著影响 (图 5)。当使用依西酸喷他脒作为测试化合物时可以说明这一点 (图 9)。在这类情况下，XF 线粒体毒性检测数据分析将利用 OPI 检测热图来检测并报告潜在的 OxPhos 抑制作用。有关 OPI 检测标准的更多详细信息，请参阅 Rogers 等人编写的安捷伦白皮书^[6]。

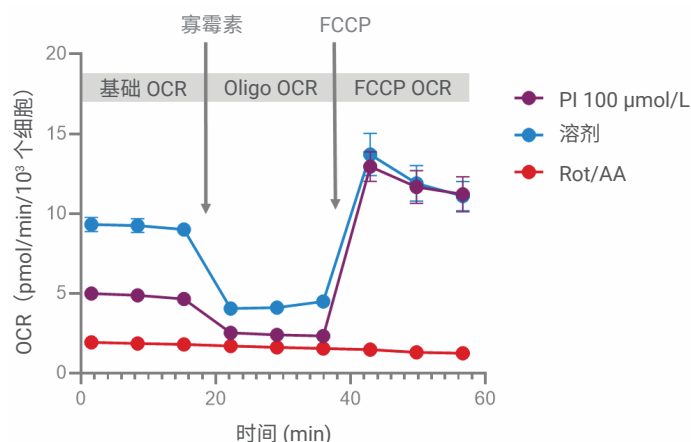


图 9. OxPhos 抑制示例：安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测的动力学曲线，显示了对照组（溶剂和 Rot/AA）和依西酸喷他脒处理组的情况。请注意，基础 OCR 显著下降，但未发现 FCCP OCR 显著下降

上述小规模示例测试使用了几种已知会影响线粒体的毒性化合物，初步确定并测试了检测设计和 MTI 参数，在所使用的条件下获得了预期结果。为了进一步证明 MTI 值是检测线粒体毒性的可靠参数，我们将 XF 线粒体毒性检测与“Glu/Gal”方法进行了比较，“Glu/Gal”方法是在培养的细胞模型中评估线粒体毒性的一种常用的公认技术^[5,12,22]。Glu/Gal 方法需要在培养基和/或检测液提供葡萄糖或半乳糖，其中，半乳糖使细胞更加依赖线粒体 ATP，因此更容易受到线粒体毒性的影响。简而言之，向葡萄糖或半乳糖培养基中的细胞提供浓度不断增加的测试化合物（即剂量响应分析），然后测量总的细胞 ATP 含量。下一步是生成剂量响应曲线，得到 IC_{50} 值，随后使用 Glu 条件与 Gal 条件之间 IC_{50} 值的相对差异来评估线粒体毒性（如实验部分和 Marroquin 等人^[12]、Hynes 等人^[5]所述）。总之，Glu/Gal 方法通过在不同培养条件下进行总细胞 ATP 测量来测定细胞活力，以此来间接评估线粒体毒性。

为此，我们使用 XF 线粒体毒性检测和 Glu/Gal 检测法检测了 17 种经过充分表征的线粒体毒性化合物（包括上述实验中使用的化合物）。结果如图 10 所示。

A

化合物	XF 线粒体毒性检测			Glu/Gal 分析
	抑制剂	解偶联剂	OxPhos 抑制剂	
抗霉素 A				
胺碘酮				
硫唑嘌呤				
氯非铵甲苯磺酸盐				
*氯丙嗪				
*二氟尼柳				
非诺贝特				
氟他胺				
酮康唑				
萘丁美酮				
*尼美舒利				
尼莫地平				
寡霉素				
喷他脒				
利培酮				
鱼藤酮				
*他莫昔芬				

B

毒性	MTI		OPI	Glu/Gal
有毒性	≤ -0.5	≥ 0.5	是	≥ 3
可能有毒性	≤ -0.2	≥ 0.2	否	≥ 2
不显著	> -0.2	< 0.2		< 2

图 10. 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测和 Glu/Gal 总 ATP 测定的总结和比较。(A) 使用 XF 检测和 Glu/Gal 方法筛选线粒体毒性化合物的结果。(B) XF 线粒体毒性检测结果（MTI 和 OPI）和 Glu/Gal 检测结果的线粒体毒性“结果匹配”标准。*表示该化合物仅通过 XF 线粒体毒性检测被识别出“有毒性”

结果表明，与 Glu/Gal 检测相比（比值 ≥3），XF 线粒体毒性检测能够发现更多明显的线粒体毒性化合物 (9/17 vs. 4/17)，并且在提供有关毒性类型（抑制、解偶联和/或 OPI）的初步信息方面具有明显的优势。虽然这两种检测方法都能轻松检测到已知的较强的线粒体毒性化合物（如抗霉素 A、寡霉素、依西酸喷他脒、利培酮），但只有 XF 检测检出了其他九种具有显著线粒体毒性的化合物 (MTI ≤-0.5 或 MTI ≥0.5)，表明它们具有抑制和解偶联作用。

总之，与 Glu/Gal 方法相比，XF 线粒体毒性检测能够发现更多线粒体毒性化合物，而 Glu/Gal 则会遗漏部分线粒体毒性化合物。此外，XF 线粒体毒性检测可表明毒性模式（抑制、解偶联或 OPI），而 Glu/Gal 方法则不能。需要注意的是，该工作流程不需要两种类型的培养/培养基条件（Glu 与 Gal），而且可以在单一剂量下进行初始筛选，而 Glu/Gal 方法则需要两种培养基类型，还需要生成 IC₅₀ 值用于比较。最后，XF 线粒体毒性检测可直接测量线粒体功能 (OCR)，而 Glu/Gal 则使用间接分析物（即总细胞 ATP），更能反映整体细胞毒性，而非特定的线粒体毒性。总之，与 Glu/Gal 方法相比，XF 线粒体毒性检测能够以更直接、更具体的方式进行线粒体毒性评估。

为了进一步证明 XF 线粒体毒性检测在中高通量下快速筛选测试化合物的能力，将该工作流程应用于包含 240 种肝毒性化合物的化合物库（SCREEN-WELL 肝毒性库，Enzo Life Sciences）。将该肝毒性化合物库分至三板，每块板包含 80 种化合物。在同一天以单一剂量对整个化合物库进行 XF 线粒体毒性检测（三板检测板/天）。在三天内重复执行该策

略，获得每种化合物的三个重复测定值。使用 Bravo 平台对检测过程中的几个步骤进行自动化操作（参见“实验”部分）。将动力学 OCR 数据转换为 MTI 值，并根据定义线粒体毒性概率（无/低、中、高）的任意 MTI 值阈值进一步整理结果（图 11）。

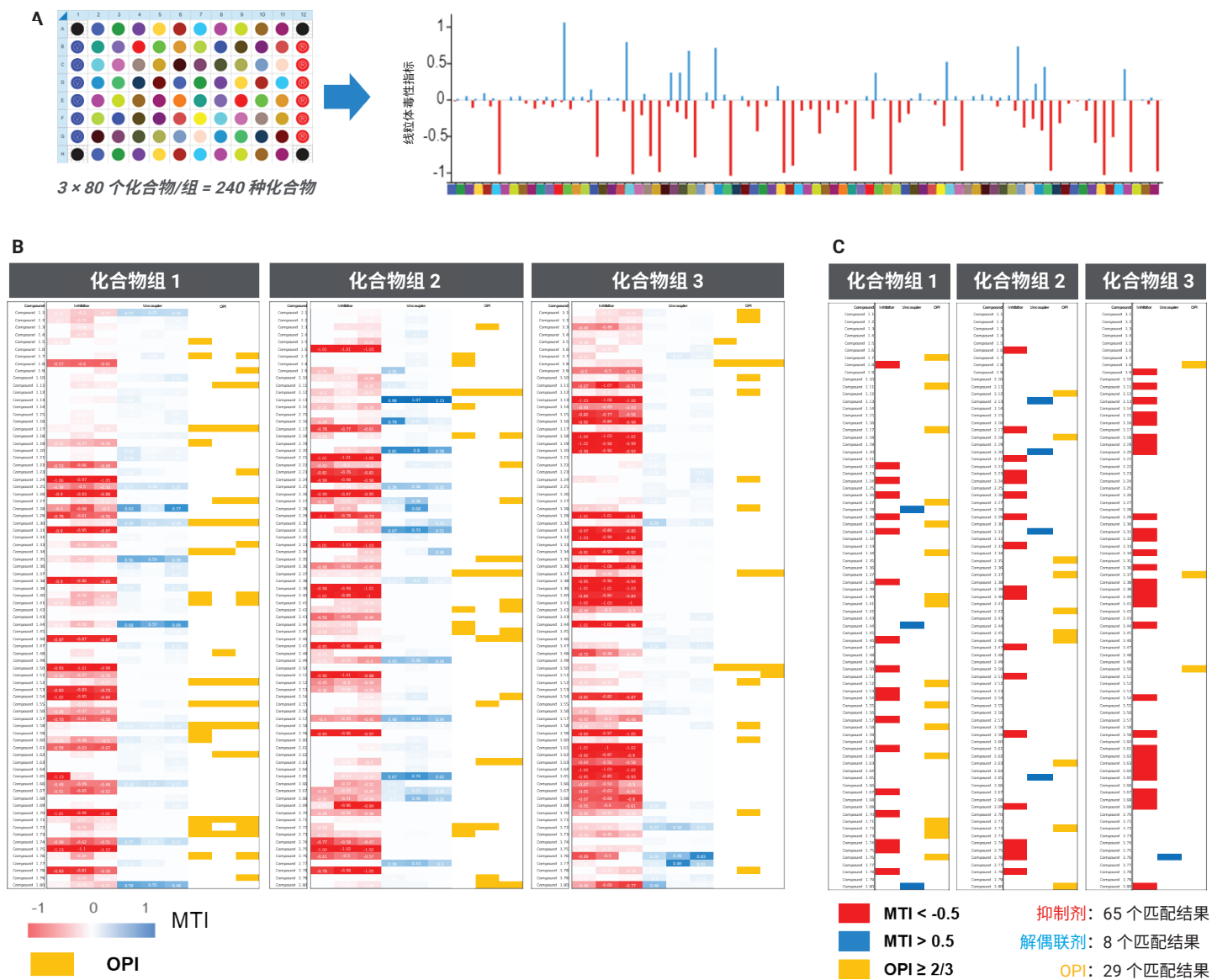


图 11. 包含 240 种化合物的化合物库筛选结果。(A) 用于 80 种化合物和必要对照组（溶剂组和 Rot/AA 组）的代表性安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测孔板布局设计（左）和生成的 MTI 柱状图（右）。(B) 整个数据集的 MTI 值（每板 80 种化合物，每天 240 种化合物，在 3 天内重复检测，共 9 块板，每种化合物 n = 3），并列比较了 3 个化合物 (compd) 组的重复板之间的 MTI 值和/或 OPI 检测。(C) 整个数据集的三个 MTI 值的平均值。解偶联和抑制的 MTI 报告阈值分别 ≥ 0.5 和 ≤ -0.5 。OPI 报告阈值 = 2/3（即如果某种化合物在三次重复检测中有两次被检测为 OPI，则报告为 OPI）

线粒体毒性的剂量响应评估

使用 XF 线粒体毒性检测来筛选化合物是一种能够快速评估大量样品的线粒体毒性类型和毒性程度的方法。在单一剂量下完成初步毒性评估后即可根据研究的目标通过剂量响应分析来评估目标化合物。这样可以获得在单剂量分析中可能不太明显的第二层信息。如前文所述，为每个测试样品/孔计算 MTI 值，并使用该值生成剂量响应图，包括剂量响应柱状图、曲线和 IC₅₀/EC₅₀ 值。图 12 中显示的 XF 线粒体毒性检测即为剂量响应分析。Rogers 等人编写的安捷伦白皮书中描述了曲线拟合和 IC₅₀/EC₅₀ 测定的详细信息^[8]。

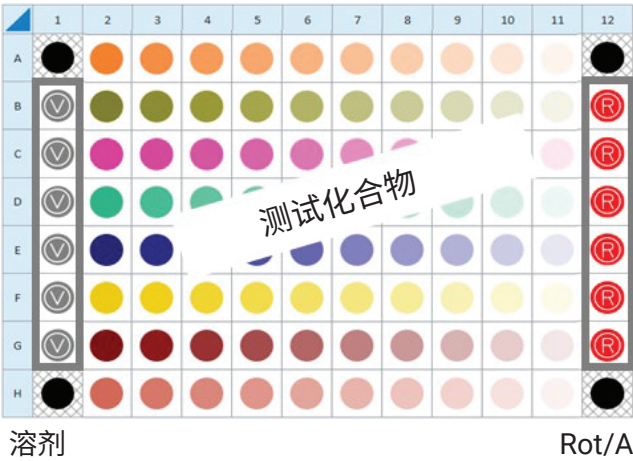


图 12. 用于剂量响应分析的安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测设计。8 种化合物，每种化合物 10 种剂量，n = 1，一块板。请注意，计算 IC₅₀ 和/或 EC₅₀ 值需要溶剂组和 Rot/AA 组

为了证明 MTI 值可用于剂量响应分析的数据分析，我们使用五种已知化合物进行了实验。图 13A 显示了五种化合物的动力学剂量响应 OCR 数据，然后使用 Seahorse Analytics 将这些数据转换成每个剂量的 MTI 值。然后使用 MTI 值和化合物浓度绘图，得到剂量响应曲线和 IC₅₀（或 EC₅₀）计算值（图 13B 和图 13C）。请注意，在某些情况下，线粒体毒性模式可能与剂量有关，Rogers 等人编写的安捷伦白皮书中通过示例对此进行了详细讨论^[8]。

优化 XF 线粒体毒性检测的工作流程和注意事项

XF 线粒体毒性检测是一套完整的线粒体毒性定量评估解决方案，图 14 对从设计到数据解析的整个流程进行了总结。

图 2 中的示意图表明了三种可用的 XF 线粒体毒性检测工作流程。它们之间的唯一区别就是向细胞中添加测试化合物的方式和时间。第一种方法使用加药口原位添加化合物（图 2A）。这种方法的优势在于能够实时动态追踪化合物的任何急性效应，同时还可提供 XF 线粒体毒性检测参数。第二种方法通

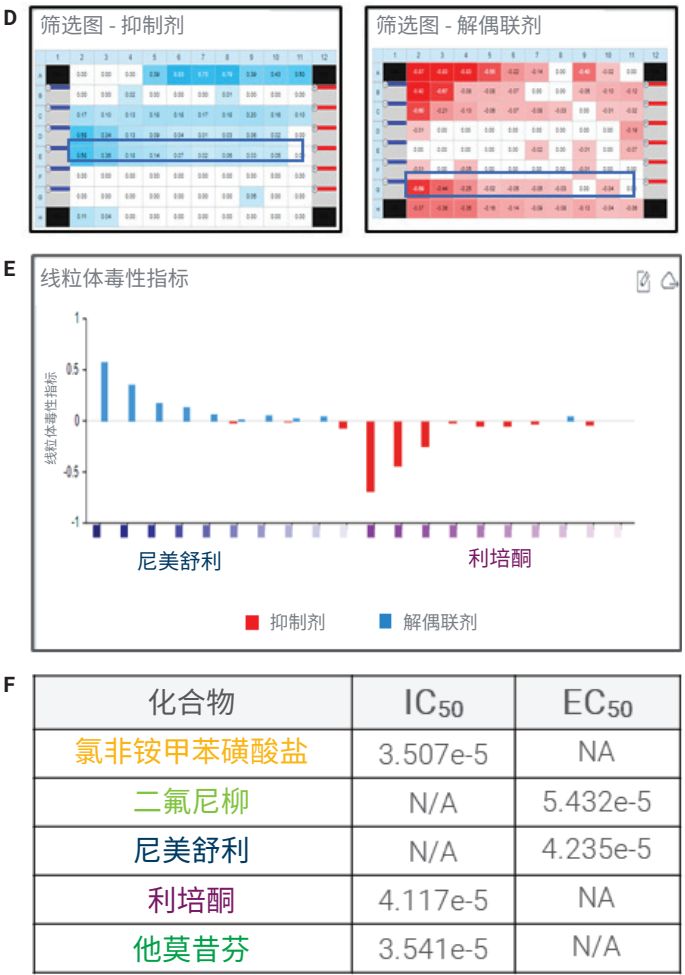
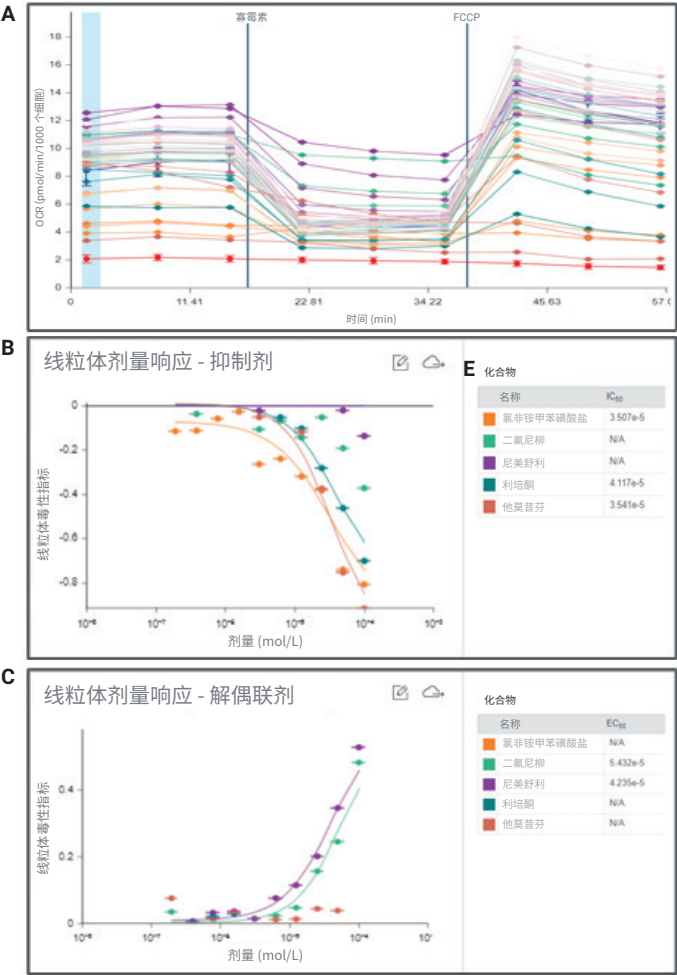


图 13. 使用 MTI 值对五种线粒体毒性化合物进行的剂量响应评估。(A) 动力学 OCR 测量。(B) 使用抑制剂的 MTI 值生成的剂量响应曲线，以及 IC₅₀ 值。(B) 使用解偶联剂的 MTI 值生成的剂量响应曲线，以及 EC₅₀ 值。(D) 和 (E) 分别为 MTI 热图和柱状图。这些分析工具也可用于 XF 线粒体剂量响应分析设计，为说明 XF 线粒体毒性检测剂量响应实验的结果提供了替代方法。(F) 通过三份数据（三块板）计算得到的 IC₅₀ 和 EC₅₀ 平均值

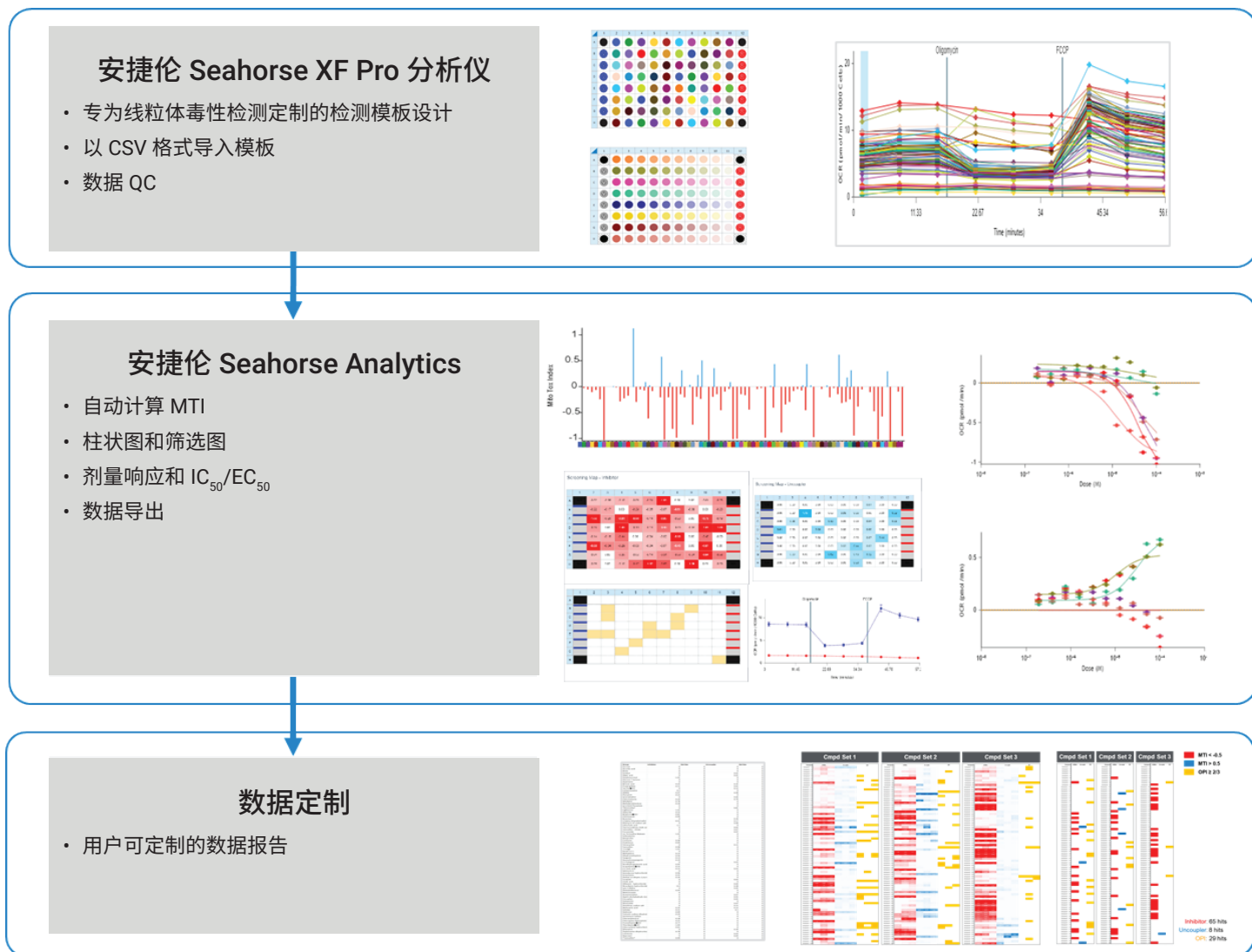


图 14. 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测工作流程总结，包括检测设计以及通过安捷伦 Seahorse Analytics 进行数据解析以及进一步的数据定制化

常是最简单的方法，在将细胞培养基更换为 XF 检测液后向细胞中加入测试化合物（图 2B），能够评估短期化合物效应（1–2 小时）。在研究线粒体毒性时建议从该工作流程开始。也可以对该工作流程进行调整，以延长化合物暴露时间（大于

4 小时），如图 2C 所示。虽然这样做能够进行长时间的化合物处理，但却需要在将生长培养基更换为检测液时再次添加化合物。

表 4 为各工作流程的应用提供了一些指导和注意事项。

对这种检测方法来说，需要考虑的主要变量包括化合物的浓度和细胞暴露在化合物下的时长。此外，还需要考虑化合物的溶解性和/或化合物渗透血浆/线粒体膜的能力（在可能的情况下）。对于溶解性/细胞渗透性较强的化合物，在进行初始评估（急性或短时方法）时，可以适当提高化合物的浓度，缩短时间。对于溶解性/细胞渗透性较差的化合物，在较低的浓度下可能需要较长的孵育期才能引起显著的毒性作用。请注意，表观毒性机制可能会受到化合物暴露时长的影响，如 Rogers 等人在安捷伦白皮书中所述^[8]。

除了前述的与检测设计相关的因素以外，在进行 XF 线粒体毒性检测之前和/或在检测期间还应考虑以下因素。

- **细胞密度：**必须对细胞密度进行优化
- **FCCP 浓度：**必须对 FCCP 进行优化，确保尽可能地分离阳性对照和阴性对照（尽可能扩大检测的动态范围）

- **检测性能评估 (Z' 值)：**建议在优化细胞密度和 FCCP 浓度后、开始筛选或剂量响应分析之前，使用 Z' 指标对检测进行评估，以证明不同板/不同日期之间一致的检测性能，如图 10 所示。然后可以使用 Z' 值来追踪和评估筛选和剂量响应分析的检测性能质量
- **归一化：**虽然不需要根据每个孔中的细胞数对生成的数据进行归一化，但最好能确保板内检测的一致性，特别是在培养/生长和/或化合物暴露时间较长的实验中。但是，需要注意的是，根据细胞数量进行归一化可能会改变数据解析和/或掩盖测试化合物的细胞毒性作用。更多信息，请参阅 Rogers 等人编写的安捷伦白皮书^[8]
- **细胞活力和/细胞毒性：**化合物引起的细胞活力和/或细胞毒性作用的变化会影响 XF 线粒体毒性检测结果和下游解析^[8]。可能需要对细胞活力和/或细胞毒性作用进行正交评估，以确保准确评估并解析 XF 线粒体毒性检测数据

表 4. 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测工作流程比较以及选择合适的工作流程的注意事项

	向细胞中加入化合物的方法		
	急性加药	短时间孵育（1–2 小时）	长时间孵育（>4 小时）
是否计算 MTI?	是	是	是
是否报告 IC ₅₀ /EC ₅₀ ?	是	是	是
是否进行实时药物动力学分析?	是	否	否
是否需要化合物进行预处理?	否	是	是
是否需要二次化合物处理?	否	否	是
适用于	相对浓度较低的速效药物，评估药物动力学特征（慢效 vs. 速效）。	相对浓度较高的慢效药物。	相对浓度较低的慢效药物。
注意事项	加药口需要 8x 最终药物浓度。	通常，对于初始评估和/或剂量响应分析更易操作。	更长的细胞培养时间和/或更普遍的细胞毒性、药物代谢的影响和间接线粒体毒性可能会影响数据质量。

结论

本应用简报介绍了一种定制化 XF 检测方法 — 安捷伦 Seahorse XF 线粒体毒性检测，可用于评估线粒体毒性。该检测方法能够识别并特异性区分不同模式的线粒体毒性，具有高灵敏度。该检测方法引入并提供了一种用于评估毒性程度的标准化定量测量参数 — MTI，可用于筛选和剂量响应分析。此外，为了保证生成数据的质量，提供了检测性能指标 (Z' 值)。在考察治疗性化合物的线粒体毒性时，这种检测设计和各个输出参数可实现快速、直接的检测，并能提供直观、可靠的数据解析，有助于识别线粒体毒性，降低药物研发管线中的风险。

参考文献

1. Meyer et al. *Toxicological Sciences* **2018**, 162(1), 15–23. DOI: [10.1093/toxsci/kfy008](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy008)
2. Will et al. *Biology* **2019**, 8(2), 32. DOI: [10.3390/biology8020032](https://doi.org/10.3390/biology8020032)
3. Wills, L. *Toxicology* **2017**, 391, 34–41. DOI: [10.1016/j.tox.2017.07.020](https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.020)
4. Will & Dykens. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, 10(8), 1061–1067. DOI: [10.1517/17425255.2014.939628](https://doi.org/10.1517/17425255.2014.939628)
5. Hynes et al. *Toxicology in Vitro* **2013**, 27, 560–569. DOI: [10.1016/j.tiv.2012.11.002](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.11.002)
6. Dykens et al. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **2007**, 7(2), 161–175. DOI: [10.1586/14737159.7.2.161](https://doi.org/10.1586/14737159.7.2.161)
7. Tilmant et al. *Toxicology in Vitro* **2018**, 52, 374–383. DOI: [10.1016/j.tiv.2018.07.012](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.07.012)
8. Rogers, et al. 使用安捷伦 Seahorse XF 解决方案开展线粒体毒性评估的原则，安捷伦科技公司白皮书，出版号 5994-4732ZHCN，**2022**
9. 安捷伦 Seahorse 线粒体毒性测定试剂盒用户指南，安捷伦科技公司，出版号 **5994-3715ZHCN**
10. Agilent Bravo Seahorse Assay Workbench User Guide (Agilent Bravo Seahorse 实验工作台用户指南)，安捷伦科技公司用户指南，**5994-0684EN，2019**
11. 用于 Seahorse XFe96 样品前处理的 Agilent Bravo 自动化工作流程
12. Marroquin et al. *Toxicological Sciences* **2007**, 97(2), 539–547. DOI: [10.1093/toxsci/kfm052](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm052)
13. Maruf et al. *BioMed Research International* **2014**, 2014, 379748. DOI: [10.1155/2014/379748](https://doi.org/10.1155/2014/379748)
14. Menor et al. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, 311(2), 668–676. DOI: [10.1124/jpet.104.069286](https://doi.org/10.1124/jpet.104.069286)
15. Pitayu et al. *Human Molecular Genetics* **2016**, 25(4), 715–727. DOI: [10.1093/hmg/ddv509](https://doi.org/10.1093/hmg/ddv509)
16. Luz et al. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2016**, 69, 25.8.1–25.8.22. DOI: [10.1002/cptx.10](https://doi.org/10.1002/cptx.10)
17. Hong & Pedersen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2008**, 72(4), 590–641. DOI: [10.1128/MMBR.00016-08](https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-08)
18. Nadanaciva et al. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, 272(2), 272–280. DOI: [10.1016/j.taap.2013.06.019](https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.06.019)
19. Chen et al. *Am. J. Transl. Res.* **2020**, 12(2), 428–446. PMID: [32194894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32194894/)
20. Ludewig et al. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, 38(5), 1123–1128. DOI: [10.1128/AAC.38.5.1123](https://doi.org/10.1128/AAC.38.5.1123)
21. Cikánková et al. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2019**, 392, 1209–1223. DOI: [10.1007/s00210-019-01665-8](https://doi.org/10.1007/s00210-019-01665-8)
22. Eakins et al. *Toxicology in Vitro* **2016**, 34, 161–170. DOI: [10.1016/j.tiv.2016.03.016](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.03.016)

www.agilent.com

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

RA44666.5719212963

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2022
2022 年 4 月 27 日，中国出版
5994-4778ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

