

前言

线粒体毒性是药物开发中的常见问题，因为大多数真核细胞利用线粒体产生代谢功能所需的大部分 ATP，并调控关键的细胞过程。

Seahorse XF 线粒体毒性检测试剂盒与 XF Pro 分析仪以及专用软件功能相结合，可以轻松实现灵敏的线粒体毒物检测和表征。借助这种方法，我们可以通过定制软件工具 Seahorse Analytics 根据耗氧率 (OCR) 得出一个标准化的定量参数—线粒体毒性指标 (MTI)。

在预测体内药源性肝脏损伤，尤其是当考虑药物代谢时，我们通常会采用冷冻保存的人原代肝细胞作为体外毒性评估的标准模型。

本研究验证了人原代肝细胞在 Seahorse XF 线粒体毒性检测中的应用。该工作流程需要优化细胞接种密度并确定适当的 FCCP 浓度。结果表明，XF 线粒体毒性检测解决方案是使用人原代肝细胞筛选和评估线粒体毒性的可靠方法。

分析设计

使用线粒体毒性指标对线粒体毒性进行参数评估并检测 OxPhos 抑制剂

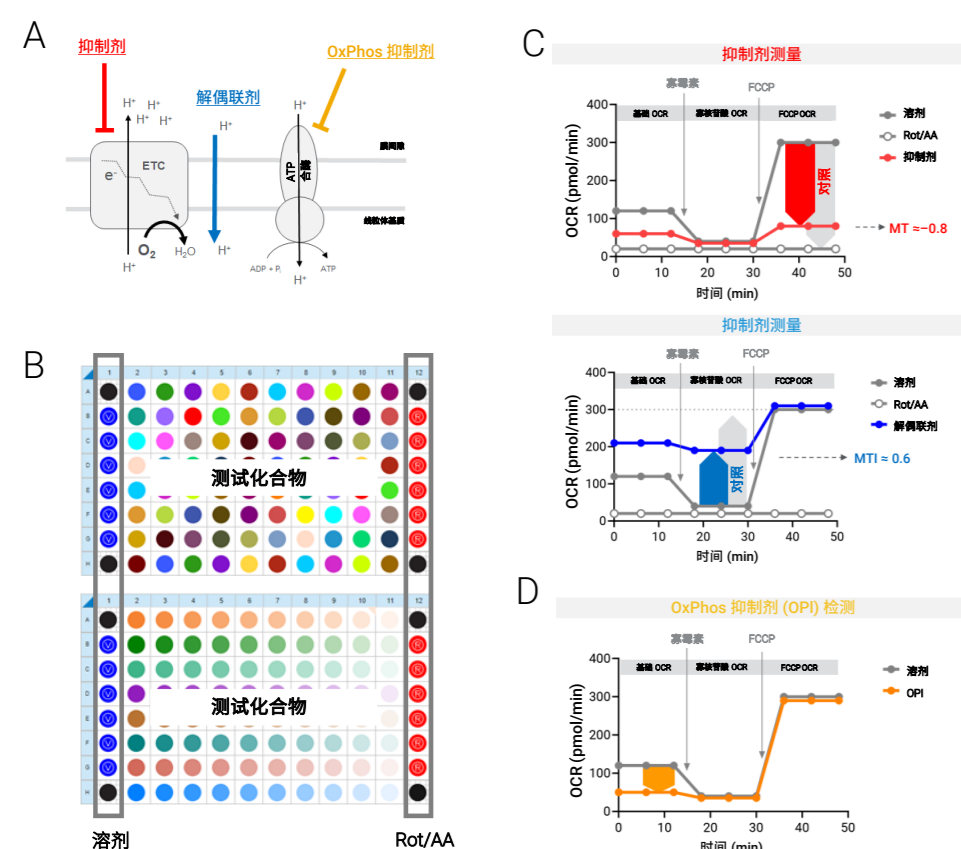


图 1. XF Seahorse 线粒体毒性检测的设计和概念，包括计算线粒体毒性指标 (MTI) 和检测潜在 OxPhos 抑制剂 (OPI)。A. 通过使用 XF Seahorse 技术测量 OCR 可以评估三种类型的线粒体毒性。B. 用于筛选和剂量响应分析的 XF 线粒体毒性检测模板设计。该检测需要两个对照组：溶剂和 Rot/AA。C. MTI 是线粒体毒性的定量测量指标。抑制导致的毒性定义为与溶剂组相比 FCCP OCR 降低，此时 MTI 值为负值 (-1 到 0 之间)。解偶联导致的毒性定义为与溶剂组相比寡霉素 OCR 增大，此时 MTI 值为正值 (0 到 1 之间)。D. 如果测试化合物处理后基础 OCR 降低且 FCCP OCR 未发生显著降低，则将该化合物归类为潜在 OPI。建议开展下游检测 (剂量响应或其他正交检测)，进一步研究和表征该类毒性

结果与讨论

细胞接种密度优化

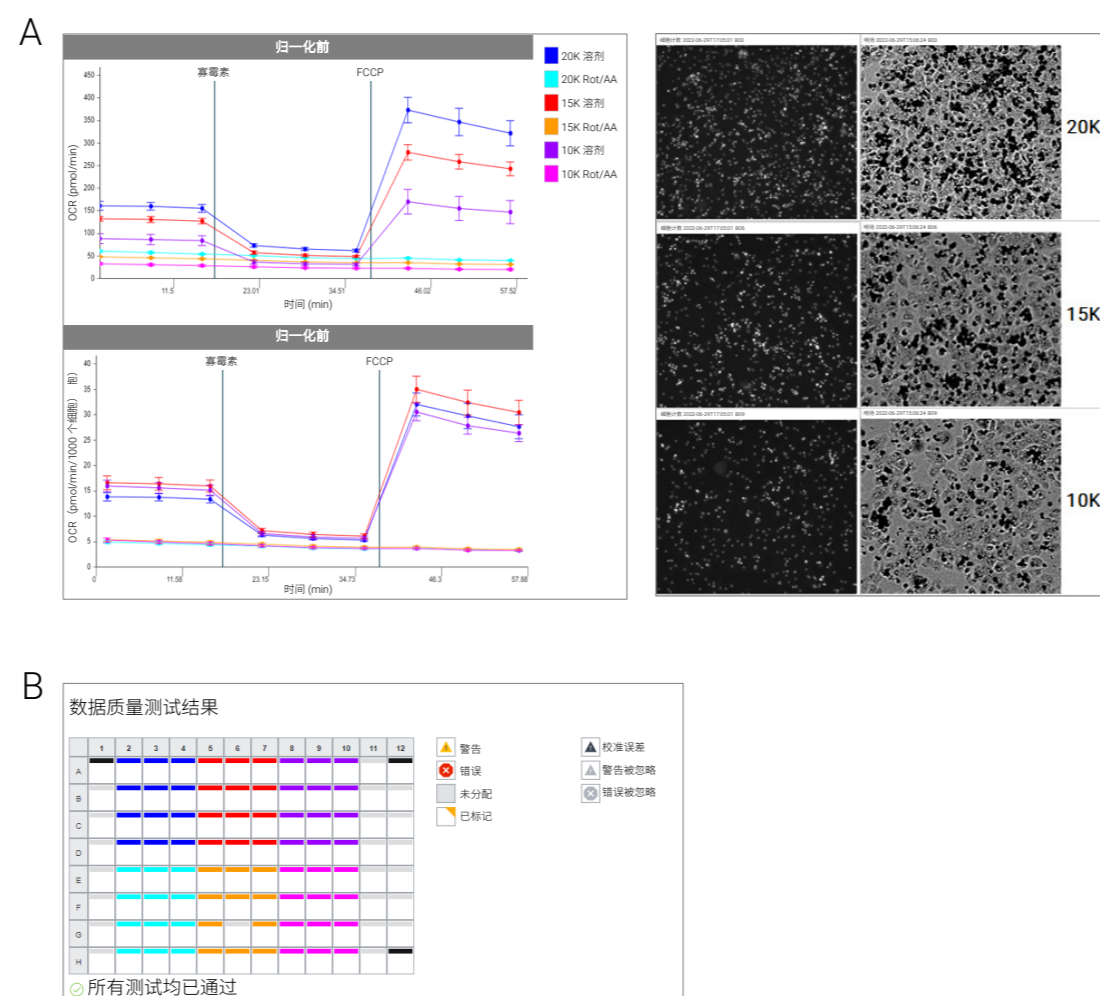


图 2. 使用人原代肝细胞在理想接种条件下进行的 XF 线粒体毒性检测。以 3 种不同的密度 (10K、15K 和 20K 个细胞/孔) 接种原代肝细胞，并进行 XF 线粒体毒性检测。A. OCR 动力学数据表明该参数与接种密度线性相关 (上图)。数据归一化结果表明，每个细胞在不同的接种密度下具有同等的 OCR。代表性荧光和明场图像表明细胞在 20K 个细胞/孔的密度下几乎完全汇合。B. 数据 QC 软件中未报告任何数据质量错误或警告

非理想接种条件

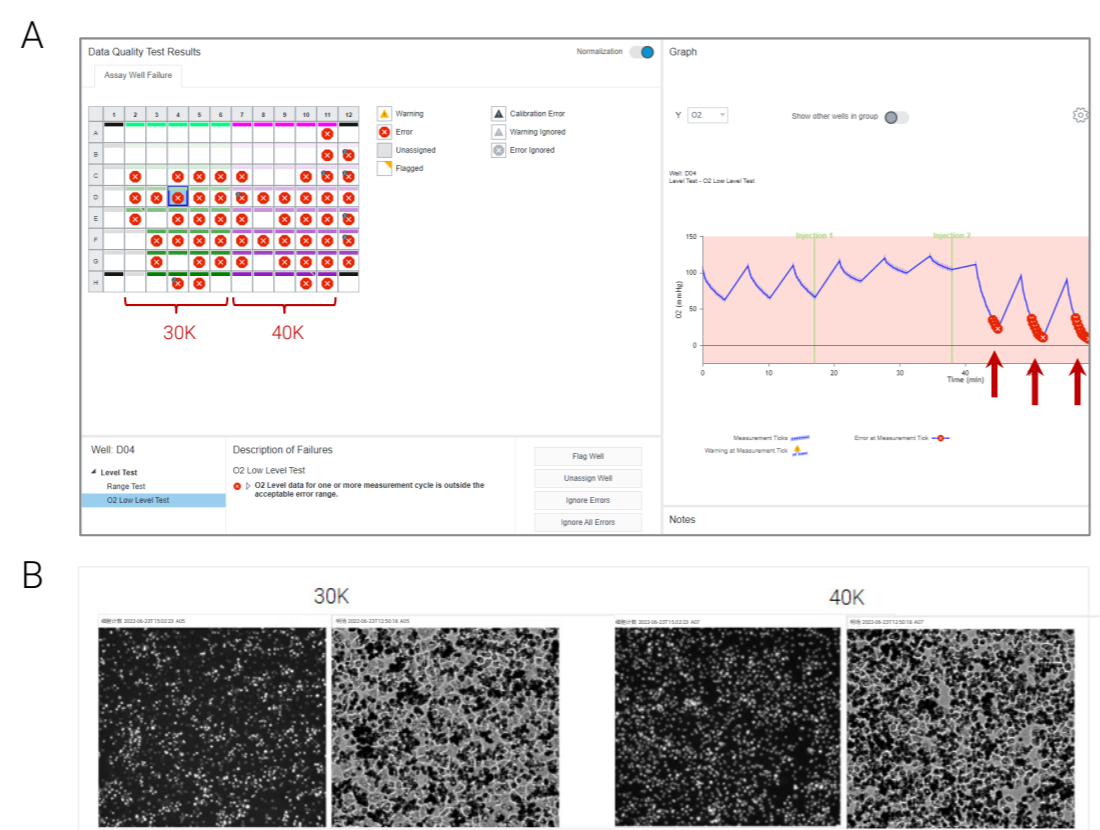


图 3. 使用人原代肝细胞在非理想接种条件下进行的 XF 线粒体毒性分析。原代肝细胞的接种密度为非理想接种密度 (30K 和 40K 个细胞/孔)。A. 数据 QC 报告了高 OCR 和低 O₂ 水平数据 (箭头) 的误差，表明 OCR 超出了仪器的动态范围。B. 明场和荧光图像显示存在不一致的细胞单层、过度汇合及大量细胞簇

FCCP 滴定和分析性能评估

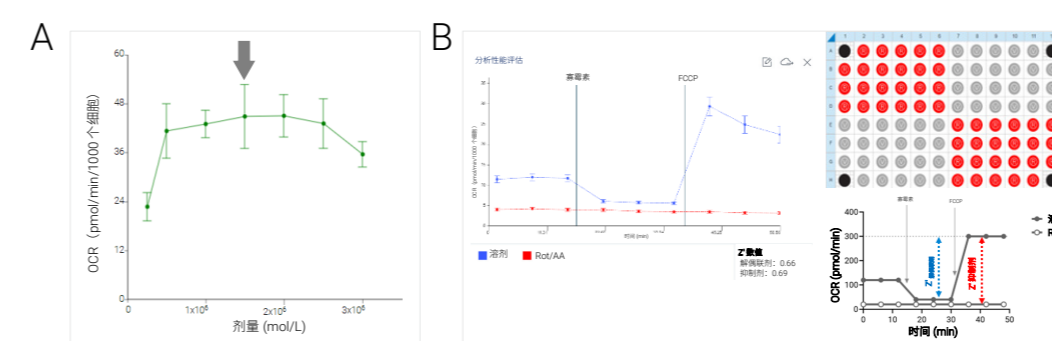


图 4. FCCP 滴定和分析性能评估。A. 以 20K 个细胞/孔的理想细胞密度滴定 FCCP，理想 FCCP 浓度确定为 1.5 μmol/L (箭头)。B. 将接种于 XF96 孔板上的原代肝细胞分为两组：溶剂对照 (灰色) 和 Rot/AA (红色)，进行 XF 线粒体毒性分析。使用 Seahorse Analytics 自动计算抑制剂和解偶联剂的 Z' 值

使用人原代肝细胞的线粒体毒性测定

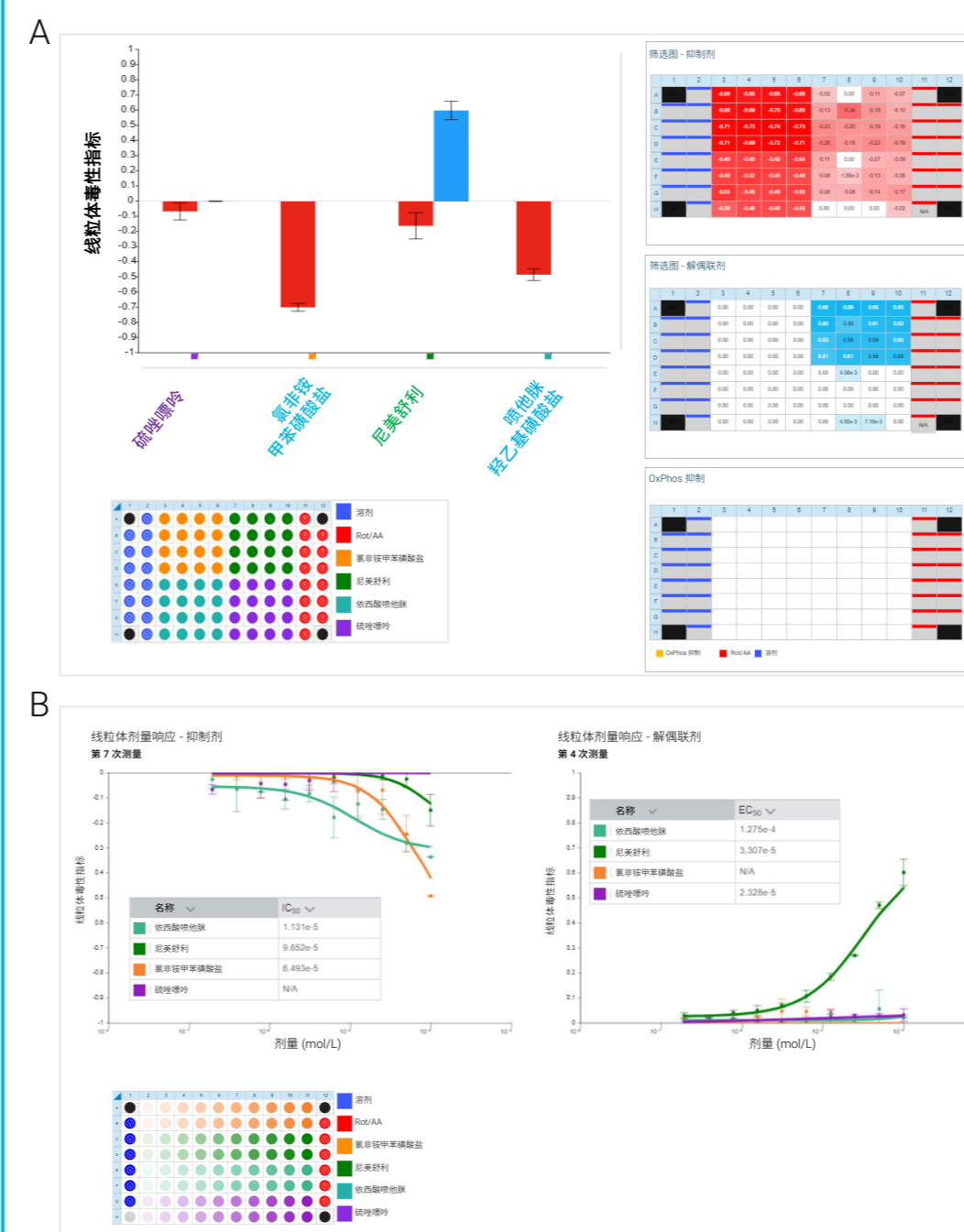


图 5. 使用人原代肝细胞进行的线粒体毒性评估。通过筛选和剂量响应检测对已知会引起线粒体毒性的选定模型化合物进行了测试。A. 正如预期的那样，筛选检测鉴定出 2 种抑制剂和 1 种解偶联剂。B. 使用 Wave Pro 软件中的剂量响应模板设计工具和 Seahorse Analytics 中的剂量响应伴随视图得到抑制 IC₅₀ 和解偶联 EC₅₀

结论

原代肝细胞是在药物安全性测试中预测药源性肝脏损伤的首选细胞类型。在理想的检测条件下，XF 线粒体毒性检测解决方案可成功筛选和评估测试化合物对人原代肝细胞的线粒体毒性。

结果表明，人原代肝细胞的理想条件是 20K 个细胞/孔和 FCCP 浓度 1.5 μmol/L。在 XF 线粒体毒性检测中使用人原代肝细胞可以稳定检测线粒体毒性，抑制 (0.69) 和解偶联 (0.66) 的 Z' 值均大于 0.5。

在测试的 4 种模型药物中，条形图和热图显示，有 2 种抑制剂和 1 种解偶联剂与之前的报告一致。本实验还通过剂量响应试验成功评估了毒性范围。

对于此前未经过优化的细胞类型，强烈建议执行下方所示的优化步骤。

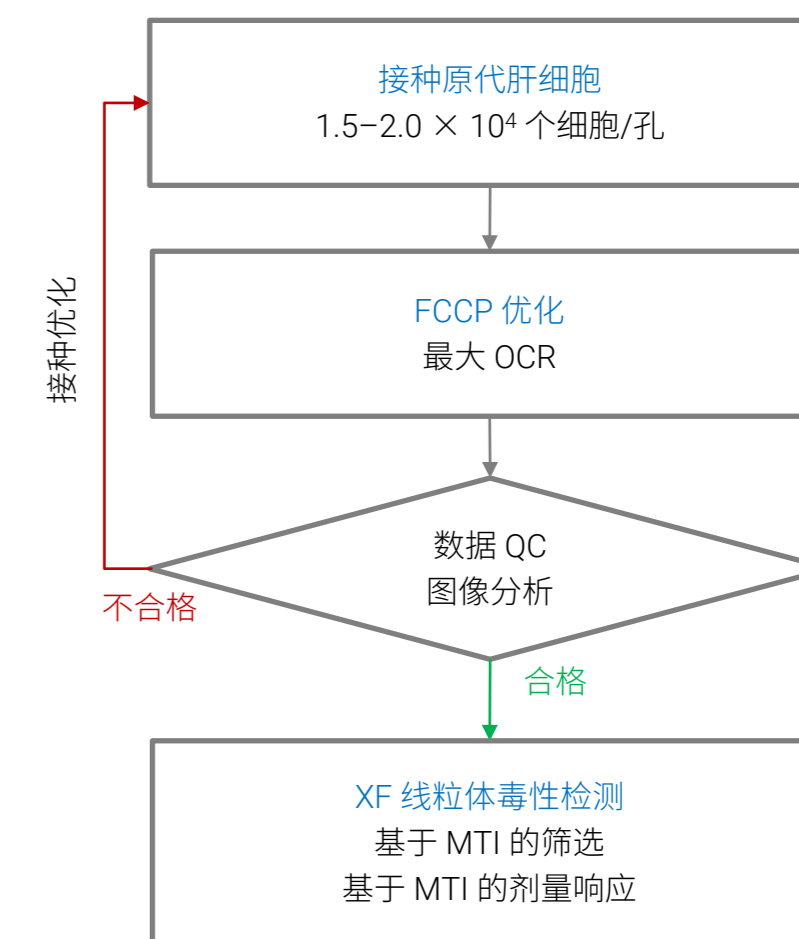


图 5. 包含新细胞类型优化步骤的 XF Seahorse 线粒体毒性分析工作流程

参考文献

- 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 5994-4732ZHCHN，2022
- Kam et al. 用于线粒体毒性检测和表征的定制化 XF 工作流程，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5994-4778ZHCHN，2022
- 安捷伦 Seahorse 线粒体毒性检测试剂盒用户指南，安捷伦科技公司，出版号 5994-3715ZHCHN

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。
RA44984.2573032407

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司，2023
2023 年 4 月 4 日，中国出版
5994-5991ZHCHN