

代谢综合征药物高通量筛选模型的建立

陈冬妹^①, 邱蓓颖^②, 杨玲玲^①, 李静雅^{②*}

① 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062;

② 中国科学院上海药物研究所, 新药研究国家重点实验室, 国家新药筛选中心, 上海 201203

* 联系人, E-mail: jyli@mail.shnc.ac.cn

2012-06-08 收稿, 2012-08-30 接受

国家自然科学基金(81001463)、中国科学院创新药物研发网络(KSCX2-EW-R-15)和上海市科委公共服务平台项目(11DZ2292200)资助

摘要 线粒体对于真核细胞至关重要,除了为细胞提供能量,还参与细胞信号转导、分化与生长、凋亡等生命过程.许多疾病的发生与线粒体功能失常密切相关,包括神经退行性疾病、糖尿病、肥胖、肿瘤等.由于线粒体膜电位是反映细胞功能状态的重要指针,因此选用了代谢性细胞 L6 大鼠肌管细胞建立了一种快速且高效地分析线粒体膜电位的高通量筛选模型.通过对线粒体染料 JC-1 浓度及孵育时间、待筛选化合物孵育时间、阳性化合物 CCCP (carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone) 浓度等实验条件的优化,确立了筛选条件,并对鱼藤酮、丙二酸、抗霉素 A、寡霉素和黄连素(berberine)等线粒体抑制剂进行验证,证实该筛选体系的可靠性.以 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ CCCP 作为阳性对照,筛选体系的整体 CV 值(变异系数)为 5.92%, Z' 因子为 0.575,符合高通量筛选的要求. L6 肌管细胞线粒体膜电位高通量筛选模型的建立,将为发现治疗代谢综合征的新药先导化合物提供更多机会.

关键词

L6 肌管细胞
线粒体膜电位
高通量筛选
代谢综合征

线粒体是真核细胞最重要的细胞器之一,是储存和提供能量的场所、细胞生命活动所需能量的 80% 由线粒体供给.由于线粒体与许多疾病的发生发展密切相关,包括糖尿病、癌症、神经退行性疾病等^[1,2],因此线粒体已日益成为研究热点^[3].线粒体膜电位为维持线粒体功能和细胞存活所必需,能够最直接地衡量线粒体的能量状态及其功能,与线粒体内钙离子平衡、ATP 生成、代谢物及蛋白质转运和活性氧的生成相关^[4,5].Peter 的化学渗透学说认为,需氧细胞内糖类、脂质、氨基酸等通过各自的分解途径形成的还原性辅酶 NADH 和 FADH_2 通过线粒体电子传递链被重新氧化,其电子沿着一系列的电子载体传递的过程中,呼吸链复合体推动 H^+ 跨过线粒体内膜到膜间隙,这样就形成了内膜内外的电化学势梯度即膜电位.质子流通过 ATP 合成酶进入线粒体基质中,释放的自由能可推动 ATP 的合成^[6].

JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide) 是线粒体膜电位的特异性荧光染料,可用于多种类型细胞的检测,包括肌肉细胞、神经细胞等,同样也可以检测组织和分离的线粒体.它是一个带正电荷的亲脂性化合物,在单体的情况下呈现绿色荧光,聚合体的情况下呈现红色荧光.最后以红光与绿光的比值反映线粒体的膜电位状态,这一比值不受其他因素(如线粒体大小、形状及密度等)的干扰. JC-1 较罗丹明等其他线粒体染料的优势是可以检测到随膜电位升高荧光由绿色逆转回红色的过程,因此可用于线粒体的动态研究^[7].

随着现代生活水平的提高,代谢综合征已成为全球性疾病,日益威胁人类健康.代谢综合征是一系列代谢紊乱的统称,包括血脂升高、低密度脂蛋白升高、高密度脂蛋白降低、胰岛素抵抗、葡萄糖耐受降低及高血压等,病情进一步恶化可导致 II 型糖尿病、

引用格式: 陈冬妹, 邱蓓颖, 杨玲玲, 等. 代谢综合征药物高通量筛选模型的建立. 科学通报, 2013, 58: 321-328

Chen D M, Qiu B Y, Yang L L, et al. Development of a high-throughput screening assay for metabolic syndrome (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 321-328, doi: 10.1360/972011-2243

动脉粥样硬化、肾病、脂肪肝及心脏病等疾病^[8]。骨骼肌主要依靠氧化磷酸化提供能量，而骨骼肌中的胰岛素抵抗可引起氧化磷酸化调节异常^[9]。这时肌肉中糖原合成受阻，对外周组织中的葡萄糖摄入降低，导致身体将本该合成糖原的糖类中的能量转移到肝脏用于脂质合成，这就是骨骼肌中胰岛素抵抗导致代谢疾病的原因之一^[10]。目前已有报道指出代谢综合征中细胞的线粒体膜电位发生改变，导致线粒体功能紊乱^[11-13]。而许多有效的治疗代谢疾病的药物也至少部分是通过调节线粒体而起效，如黄连素、二甲双胍、罗格列酮、曲格列酮等^[14-17]。黄连素可以通过抑制线粒体电子传递链复合体 I，引起线粒体膜电位下降，进而激活单磷酸腺苷激活蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)，最终对糖脂代谢紊乱起到改善作用^[18]。由此可见，线粒体膜电位可以作为衡量细胞功能状态的一个重要指针。

因此，对生理和病理状态下的线粒体功能进行评价，可为发现更多治疗代谢综合征的先导化合物提供机会。目前已经有一些利用线粒体膜电位进行的药物筛选和发现研究^[19-22]，但这些筛选模型多数是利用肿瘤细胞或是分离的线粒体，未见针对代谢性细胞的功能筛选。

本研究以代谢性细胞 L6 大鼠肌管细胞为基础建立了线粒体膜电位高通量筛选模型，旨在为进一步发现新的治疗代谢综合征的先导化合物奠定基础。

1 材料和方法

(i) 细胞株及细胞培养液。L6 大鼠成肌细胞株购自中国科学院细胞库；高糖 DMEM 培养基购自 GIBCO 公司；胎牛血清购自 Hyclone 公司。

(ii) 化合物及其他试剂。Carbonylcyanoide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP)、鱼藤酮(rotenone)、抗霉素 A(antimycin A)、寡霉素(oligomycin)、JC-1 购自 Sigma 公司(St Louis, USA)。所用随机的 80 个化合物来自国家新药筛选中心化合物库。其他普通化学试剂是国产分析纯(AR)试剂。

(iii) 仪器及耗材。Acumen eX3 高内涵细胞分析平台购自英国 TTP LabTech; Biomek FX 自动化加样系统购自 Beckman Coulter Inc (Fullerton, 美国); 细胞培养板购自 Greiner 公司(德国)。

(iv) 细胞培养。L6 成肌细胞在含有 10%胎牛血

清，100 U mL⁻¹ 青霉素，100 mg L⁻¹ 链霉素的高糖 DMEM 培养基中，置于 CO₂ 培养箱(37℃, 5% CO₂, 95%空气)培养，至密度 70%左右传代。以 6×10⁴ 细胞 mL⁻¹ 密度接入 96 孔黑色透明底的培养板中，培养 12 h 至 70%贴壁。然后换成含 2%胎牛血清，100 U mL⁻¹ 青霉素，100 mg L⁻¹ 链霉素的高糖 DMEM 培养基进行分化，每 48 h 换液一次。至分化第 5 天成肌细胞 70%以上可分化为肌管细胞，此时可用于实验。

(v) 线粒体膜电位检测。线粒体膜电位的检测参考 Wagner 等人^[23]的方法，并在此基础上略加修改。在 100 μL 含 2%胎牛血清的 HG-DMEM 中加入相应的化合物，弃去 96 孔板中的旧培养基，加入上述含化合物的培养基后处理所需时间。在化合物处理结束后加入含 JC-1 的 HG-DMEM (含 2%胎牛血清)100 μL，此时每孔中的培养基总体积为 200 μL。将 96 孔板避光置于 37℃培养箱孵育。孵育完后将板中培养液全部甩干，在吸水纸上放置片刻，而后用 200 μL Krebs-Ringer phosphate HEPES (KRPH, 包括 20 mmol L⁻¹ HEPES, 137 mmol L⁻¹ NaCl, 1 mmol L⁻¹ CaCl₂, 4.7 mmol L⁻¹ KCl, 1.25 mmol L⁻¹ MgSO₄, 5 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄, 5 mmol L⁻¹ 葡萄糖, pH 7.4) 溶液洗 3 遍。最后一次甩干溶液后，将 96 孔板倒置于吸水纸上轻拍几次，加入 100 μL KRPH 溶液，然后置于 Acumen eX3 检测荧光，选择 488 nm 激光模式，发射光 Lm1 (红光)波长范围设为 575~640 nm, Lm2 (绿光)波长范围设为 500~530 nm，最后总红色荧光强度(total red intensity)与总绿色荧光强度(total green intensity)的比值即代表线粒体膜电位的状态。

线粒体膜电位(%)

$$= \frac{(\text{样品的总红色荧光强度-blank}) / (\text{样品的总绿色荧光强度-blank})}{(\text{阴性对照的总红色荧光强度-blank}) / (\text{阴性对照的总绿色荧光强度-blank})} \times 100\%$$

其中, blank 表示不加 JC-1 的背景值。

(vi) 高通量筛选模型的建立。为检测高通量筛选系统的信噪比和稳定性，测定了微孔板的行间、列间、孔间的变异系数(coefficient of variability, CV)。模拟高通量筛选过程，细胞接板换液、加化合物及洗板均使用 Biomek FX。依据所得结果，计算相应的 CV 值。为评价高通量筛选的可信度，检测了衡量高通量筛选测量误差及信噪比的统计学参数 Z' 因子。若 Z'

因子大于 0.5, 则认为高通量筛选的体系是合格的。

(vii) 线粒体呼吸链抑制剂对 L6 肌管细胞线粒体膜电位的影响. 已分化好的 L6 肌管细胞, 分别加入线粒体呼吸链抑制剂, 包括 100 nmol L^{-1} 鱼藤酮、 $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ 丙二酸、 $0.6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ 抗霉素 A、 $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ 寡霉素及不同浓度黄连素. 置于 37°C 细胞培养箱中孵育 1 h, 然后加入 $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ JC-1 继续孵育 30 min 后检测荧光值。

(viii) 天然产物化合物库的高通量筛选. 样品准备: 用 Biomek FX 自动加样系统, 从国家新药筛选中心天然产物化合物样品库中取 $2.5 \text{ } \mu\text{L}$ 1 mmol L^{-1} (溶解于 DMSO 中) 的样品母液加入到 $122.5 \text{ } \mu\text{L}$ 培养基中充分混匀. 此时化合物浓度为 $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. 甩干细胞板, 每孔中用 Biomek FX 加入 $100 \text{ } \mu\text{L}$ 混入化合物的培养基. 其中 96 孔板第 1 和 12 列分别加入 2% DMSO (阴性对照) 和 $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ CCCP (阳性对照), 以备评价筛选过程中的信号稳定性和信噪比。

(ix) 数据分析. 数据均以 $\text{mean} \pm \text{SE}$ ($n=3$) 表示. 两组之间的差别检验方法为 *t*-test.

2 结果

2.1 线粒体膜电位高通量筛选模型的优化

(i) JC-1 浓度优化. 为挑选最适的 JC-1 浓度, $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ CCCP 处理 L6 肌管细胞 1 h, 然后加入不同浓度 JC-1 ($0.5\sim 5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) 孵育 30 min. 随着 JC-1 浓度的升高, 线粒体膜电位逐渐降低, 到 $2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ 后基本趋于稳定(图 1). Mathur 等人^[24]研究 JC-1 对心肌细胞线粒体膜电位影响, 指出线粒体膜电位与

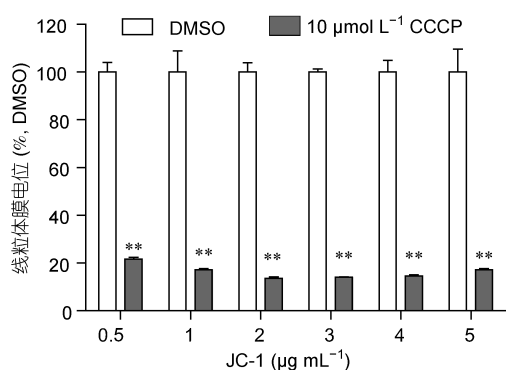


图 1 不同浓度 JC-1 对 L6 肌管细胞线粒体膜电位的影响
**, $P < 0.01$

JC-1 的浓度相关性很大, 在他们的实验条件下起效的最低浓度为 $0.5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (约为 $0.33 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). 最后综合实验的信号稳定性及成本, 选择 $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ JC-1 用于高通量筛选。

(ii) JC-1 孵育时间优化. JC-1 的孵育时间一般为 15~30 min. 我们利用 $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ CCCP 处理 L6 肌管细胞 1 h, 然后加入 $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ JC-1 分别孵育 15, 20, 25 和 30 min, 检测总的红光与绿光值, 计算线粒体膜电位. 结果表明随着 JC-1 处理时间的增加, 降线粒体膜电位程度逐渐增强, 至 25 min 已趋于稳定(图 2). 综合筛选的方便性及稳定性, 最终确定 JC-1 孵育时间为 30 min.

(iii) 阳性化合物 CCCP 浓度优化. CCCP 是一种线粒体解偶联剂, 可以使质子不通过 ATP 合成酶而直接回到基质, 使氧化磷酸化与 ATP 的生成相分离^[25]. 为了得到最适的 CCCP 筛选浓度, 不同浓度 CCCP ($0.625\sim 20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) 加入到 L6 肌管细胞中处理 1 h 然后加入 $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ JC-1 继续避光孵育 30 min. 结果表明, CCCP 能够浓度依赖地降低 L6 肌管细胞的线粒体膜电位(图 3), 为确保药物筛选的可靠性与稳定性, 确定阳性对照物 CCCP 的工作浓度为 $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$.

(iv) 化合物孵育时间优化. 随机挑选国家新药筛选中心化合物库中 80 个化合物 (作用浓度 $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) 进行了时间梯度检测(30 min, 1 h). 统计学上一般认为, 超出对照平均值的上下 2 倍标准差的范围, 即可认为该样品与对照之间存在差异. 以对照组(DMSO)线粒体膜电位的 $2 \times \text{SD}$ 为标准, 对显著升高和降低线粒体膜电位的化合物数量进行统计. 随机筛选的化合物中没有发现明显升高线粒体膜电位

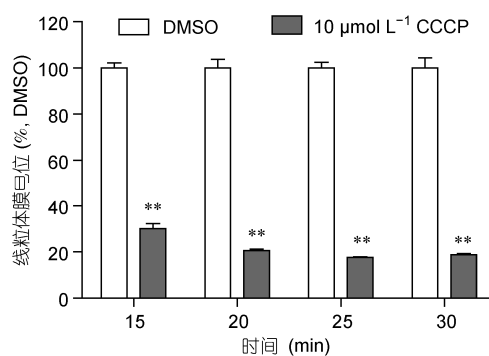


图 2 $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ JC-1 处理 L6 肌管细胞不同时间对膜电位的影响
**, $P < 0.01$

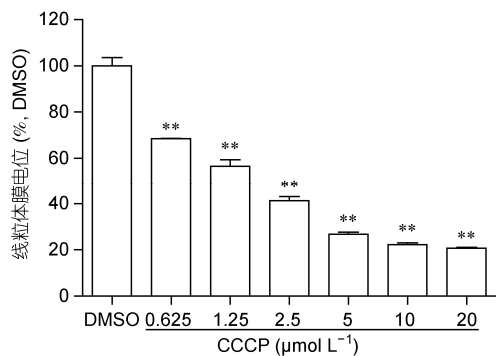


图3 不同浓度 CCCP 对 L6 肌管细胞线粒体膜电位的影响
**, $P < 0.01$

的化合物. 处理 30 min, 有 4 个化合物可以显著降低线粒体膜电位, 阳性率为 5%; 1 h 后有效的化合物数目降低到 3 个, 阳性率为 3.75%(表 1). 在处理过程中, 发现一些化合物处理的细胞膜电位表现出先降低再轻微升高的现象(数据未列出). 分析原因可能是, 化合物进入细胞以后, 抑制线粒体的电子传递链, 进而导致跨膜的质子减少, 这时线粒体膜电位降低. 为了产生足够量的 ATP 用以维持正常的生命活动, 细胞会启动一些反馈机制, 使得线粒体膜电位有所回升. 最后综合考虑筛选的随机效率及实验结果的稳定性, 可以确定化合物的作用时间为 1 h.

2.2 线粒体膜电位筛选模型的检验

因为建立的模型是针对于亚细胞器线粒体的, 所以有必要对线粒体呼吸链的抑制剂进行评价与验证. 因此选取了线粒体复合体 I 的抑制剂鱼藤酮(rotenone)、复合体 II 的抑制剂丙二酸(malonate)、复合体 III 的抑制剂抗霉素 A (antimycin A)及复合体 V 的抑制剂寡霉素(oligomycin)进行评价. 抑制剂处理 1 h, 然后加入 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ JC-1 于 37°C 避光孵育 30 min. 结果表明这些抑制剂都可以显著降低 L6 细胞的线粒体膜电位(图 4), 100 nmol L^{-1} 的鱼藤酮降膜电位的程度可以达到 30%, $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ 丙二酸可达到 70%以上,

表 1 随机 80 个化合物处理不同时间对 L6 肌管细胞线粒体膜电位的影响

时间	Mean \pm 2 \times SD	数量	占总数的百分比(%)
30 min	Mean+2 \times SD	0	0
30 min	Mean-2 \times SD	4	5
1 h	Mean+2 \times SD	0	0
1 h	Mean-2 \times SD	3	3.75

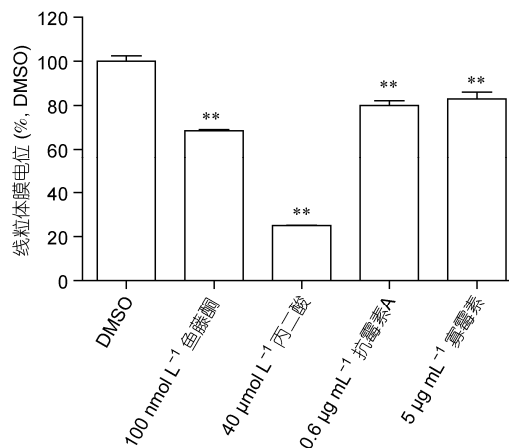


图 4 线粒体呼吸链抑制剂对 L6 肌管细胞线粒体膜电位的影响
**, $P < 0.01$

$0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ 抗霉素 A 和 $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 寡霉素降膜电位程度为 20%左右.

2.3 验证黄连素对 L6 肌管细胞线粒体膜电位的影响

为进一步验证筛选模型, 不同浓度黄连素加到 L6 肌管细胞处理 1 h, 然后加入 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ JC-1 孵育 30 min. 结果表明黄连素可以极显著地降低 L6 的线粒体膜电位(图 5). 与文献报道黄连素作用于线粒体氧化呼吸链的复合物 I, 抑制线粒体膜电位的结果是一致的^[14,18].

2.4 高通量筛选系统质量控制优化

在进行高通量筛选之前, 对该模型进行了质量

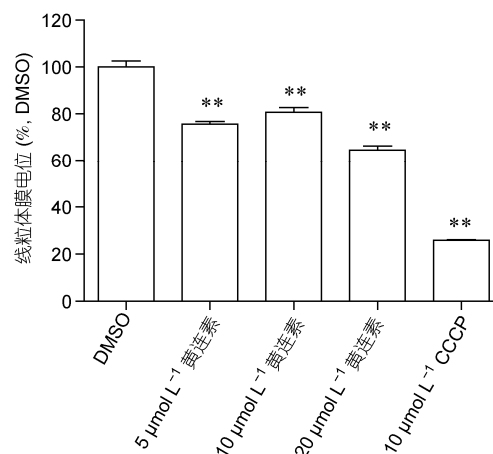


图 5 不同浓度黄连素对 L6 肌管细胞线粒体膜电位的影响
**, $P < 0.01$

控制优化. 以 DMSO 溶解化合物, 作为阴性对照(工作浓度 2%), 以解偶联剂 CCCP 为阳性化合物(工作浓度为 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$), 计算该模型的 Z' 因子和 CV 值. 化合物作用 1 h, 染料 JC-1 孵育 30 min 后检测细胞内线粒体膜电位, 整个体系的 CV 值为 5.92%, Z' 因子为 0.575, 符合高通量筛选的要求.

2.5 天然产物化合物库的高通量筛选

以国家新药筛选中心天然产物化合物库为来源, 对 3000 个天然产物进行了筛选, 筛选浓度为 $20 \mu\text{mol L}^{-1}$. 经过筛选, 得到一系列升高和降低 L6 肌管细胞线粒体膜电位的天然产物, 其中包括金圣草黄素(chrysoeriol)、杨梅素(myricetin)、姜黄素(curcumin)、白皮杉醇(piceatannol)等(表 2). 金圣草黄素降膜电位约为 10%; 杨梅素对线粒体膜电位的抑制程度约为 50%; 姜黄素抑制膜电位达到 80%. 而白皮杉醇可以升高线粒体膜电位, 程度约为 10%.

3 讨论与结论

Acumen eX3 具有全孔高速成像和多重荧光分析的能力, 兼有 CCD 成像系统和流式细胞仪的优点. 目前, 该平台已经成功地应用于各种细胞水平的研究, 包括对人类基因组 RNAi 文库的筛选研究, 癌症相关的研究(包括细胞周期、细胞增殖、克隆形成、细胞毒性、凋亡、细胞黏附、血管生成、蛋白激酶等), 以及干细胞分化的研究等^[26,27]. 应用 Acumen eX3 可以检测整个孔中荧光的总强度, 与其他的筛选机器相比, 整个筛选体系的窗口更大, 稳定性更高.

L6 成肌细胞株是 Richler 和 Yaffe^[28]从甲基胆蒽存在下的大鼠大腿肌的原代培养物最初 2 代中分离得到的. L6 细胞在培养基中融合形成多核的肌管和横纹肌纤维. L6 肌管细胞已被广泛应用于代谢等方面的研究, 包括葡萄糖吸收、脂肪酸氧化及线粒体的生物合成等^[29-32]. 因为它包括完整的胰岛素受体及相应的信号通路蛋白, 以及葡萄糖、长链脂肪酸和乳

酸转运蛋白, 并且还包含代谢相关的酶类^[33-35]. 作为最主要的胰岛素靶向的组织之一, 肌肉对维持整体的葡萄糖平衡起着至关重要的作用. 因此, 利用 L6 肌管细胞筛选治疗代谢综合征的先导化合物是非常直接而有效的.

为了得到最优的筛选参数, 我们对 JC-1 的浓度及孵育时间、阳性化合物 CCCP 的浓度及化合物孵育时间进行了优化. 结果表明, 随着 JC-1 浓度的升高, 线粒体膜电位逐渐降低, 于 $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ 趋于稳定; 线粒体膜电位随 JC-1 孵育时间的延长逐渐降低, 25 min 后基本不再变化; 阳性化合物 CCCP 降线粒体膜电位也呈现出明显的浓度依赖. 让人感觉意外的是, 对随机 80 个化合物进行孵育时间的优化, 在处理的 1 h 内, 发现随着处理时间的延长, 有些化合物的线粒体膜电位表现出先降低再轻微升高的趋势, 猜测可能是化合物进入细胞后, 导致细胞内线粒体电子传递链不能正常传递电子, 因此电子传递链复合体泵到膜间隙的质子量减少, 这时膜电位降低; 接着细胞启动体内的一些反馈调节机制使线粒体膜电位维持到正常的水平以产生足够的用以维持正常生命活动的 ATP. 1994 年 Richter 等人^[36]分离大鼠肝原代细胞, 指出线粒体膜电位先下降再恢复的过程与细胞溶质中钙离子的水平相一致. 此外 Waterhouse 等人^[37]通过对细胞凋亡过程的研究, 指出细胞色素 *c* 在细胞凋亡的初始阶段可阻止线粒体膜电位的下降. 接下来用线粒体呼吸链抑制剂包括鱼藤酮、丙二酸、抗霉素 A、寡霉素, 以及天然产物黄连素对该模型进行验证, 证明这些抑制剂都可以明显降低线粒体膜电位. 最后, 综合筛选效率、成本及结果稳定性等方面的考虑, 确定 JC-1 的浓度为 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, 孵育时间为 30 min, 阳性化合物 CCCP 的浓度为 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 化合物孵育时间为 1 h. 统计学上一般认为, CV 值小于 10%, Z' 因子大于 0.5 是衡量筛选模型合格的 2 个指标. 通过分析, 筛选体系 CV 值为 5.92%, Z' 因子为 0.575, 符合高通量筛选的要求.

通过对天然产物化合物库 3000 个天然产物进行筛选, 得到了一系列对线粒体膜电位有明显影响的化合物, 如金圣草黄素、杨梅素、姜黄素、白皮杉醇等. 金圣草黄素和杨梅素都为黄酮类化合物, 可促进葡萄糖的吸收利用, 降低糖尿病大鼠的血糖水平, 改善糖代谢紊乱^[38,39]. 姜黄素属酚类化合物, 有研究表明其在肝细胞中可以激活 AMPK 信号通路, 抑制糖

表 2 高通量筛选得到的天然产物

化合物名称	线粒体膜电位(%, DMSO)
金圣草黄素	87.50
杨梅素	58.23
姜黄素	20.64
白皮杉醇	111.23

异生基因的表达,是很有发展前景的治疗糖尿病的天然产物^[40].白皮杉醇也为酚类化合物,其可以与磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)结合,抑制 PI3K 活性,起到改善动脉粥样硬化的效果^[41].这些结果说明我们的筛选模型是准确可靠的.这些化合物中有的降低膜电位,有的升高膜电位,但都对代谢综合征有改善效果.

本研究基于 L6 肌管细胞建立了筛选代谢综合征先导化合物的高通量筛选模型,但是还有一些问题值得进一步探讨,如线粒体膜电位为什么会随着某

些化合物处理时间的延长有所回复,这期间细胞中进行了什么样的调控,膜电位的回复对于细胞功能状态有什么样的影响;另外还有膜电位升高和降低对细胞意味着什么,根据筛选的结果看升高和降低都有有益的效果,要根据什么样的标准来判断膜电位升高或降低对于细胞的利弊等.

总之,利用 L6 肌管细胞筛选治疗代谢综合征的先导化合物是非常直接而有效的,此筛选模型适用于高通量筛选,操作过程简单,且结果稳定可靠,为发现更多治疗代谢综合征的先导化合物奠定了基础.

参考文献

- 1 Kin J, Wei Y Z, Sowers J R. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*, 2008, 29: 401–414
- 2 Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: What is so special about them? *Trends Cell Biol*, 2008, 18: 165–173
- 3 贾万忠, 闫鸿斌, 倪兴维, 等. 蠕虫线粒体基因组研究及其应用进展. *科学通报*, 2011, 56: 2358–2372
- 4 Smiley S T, Reers M, Mottola H C, et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 3671–3675
- 5 Wagner B K, Kitami T, Gilbert T J, et al. Large-scale chemical dissection of mitochondrial function. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 343–351
- 6 Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*, 1961, 191: 144–148
- 7 Reers M, Smith T W, Chen L B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochem*, 1991, 30: 4480–4486
- 8 Nicolson G L. Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J Cell Biochem*, 2007, 100: 1352–1369
- 9 Kelley D E, He J, Menshikova E V, et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2002, 51: 2944–2950
- 10 Petersen K F, Dufour S, Savage D B, et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12587–12594
- 11 Nicolson G L. Metabolic syndrome and mitochondrial function: Molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J Cell Biochem*, 2007, 100: 1352–1369
- 12 Hampton T. Mitochondrial defects may play role in the metabolic syndrome. *JAMA*, 2004, 292: 2823–2824
- 13 Duchon M R. Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes*, 2004, 53(Suppl 1): S96–S102
- 14 Pereira G C, Branco A F, Matos J A C, et al. Mitochondrially targeted effects of berberine [natural yellow 18, 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo(g)-1,3-benzodioxolo(5,6-a) quinolizinium] on K1735-M2 mouse melanoma cells: Comparison with direct effects on isolated mitochondrial fractions. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 323: 636–649
- 15 El-Mir M Y, Nogueira V, Fontaine E, et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem*, 2000, 275: 223–228
- 16 Wu J S, Lin T N, Kenneth K. Rosiglitazone and PPAR- γ overexpression protect mitochondrial membrane potential and prevent apoptosis by upregulating anti-apoptotic Bcl-2 family proteins. *J Cell Physiol*, 2009, 19: 58–71
- 17 Toogood P L. Mitochondrial drugs. *Curr Opin Chem Biol*, 2008, 12: 457–463
- 18 Turner N, Li J Y, Gosby A, et al. Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I. *Diabetes*, 2008, 57: 1414–1418
- 19 Huang S D. Development of a high throughput screening assay for mitochondrial membrane potential in living cells. *J Biomol Screen*, 2002, 7: 383–389
- 20 Dykens J A, Fleck B, Ghosh S, et al. High-throughput assessment of mitochondrial membrane potential *in situ* using fluorescence resonance energy transfer. *Mitochondrion*, 2002, 1: 461–473

- 21 Wong A, Cortopassi G A. High-throughput measurement of mitochondrial membrane potential in a neural cell line using a fluorescence plate reader. *BBRC*, 2002, 298: 750–754
- 22 Distelmaier F, Koopman W J, Testa E R, et al. Life cell quantification of mitochondrial membrane potential at the single organelle level. *Cytometry A*, 2008, 73: 129–138
- 23 Wagner B K, Kitami T, Gilbert T J, et al. Large-scale chemical dissection of mitochondrial function. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 343–351
- 24 Mathur A, Hong Y, Kemp B K, et al. Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2000, 46: 126–138
- 25 Kasianowicz J, Benz R, McLaughlin S. The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *J Membrane Biol*, 1984, 179–190
- 26 Swanton C, Nicke B, Schuett M, et al. Chromosomal instability determines taxane response. *PNAS*, 2009, 106: 8671–8676
- 27 Karlas A, Machuy N, Shin Y, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463: 818–822
- 28 Richler C, Yaffe D. The *in vitro* cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Dev Biol*, 1970, 23: 1–22
- 29 Yap A, Nishiumi S, Yoshida K, et al. Rat L6 myotubes as an *in vitro* model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology*, 2007, 55: 103–108
- 30 Kelly K R, Sung C K, Abbott M J, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent insulin regulation of long-chain fatty acid (LCFA) metabolism in L6 muscle cells: Involvement of atypical protein kinase C- ζ in LCFA uptake but not oxidation. *J Endocrinol*, 2008, 198: 375–384
- 31 Ojuka E O, Jones T E, Han D H, et al. Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283: E1040–E1045
- 32 杨亮, 迟戈, 张俊, 等. L6 细胞胰岛素抵抗的骨骼肌细胞模型. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13: 248–251
- 33 Hashimoto T, Hussein R, Brooks G. Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: Evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *Am J Physiol-Endoc M*, 2006, 290: 1237–1244
- 34 Beguinot F, Kahn R, Moses A, et al. The development of insulin receptors and responsiveness is an early marker of differentiation in the muscle cell line L6. *Endocrinology*, 1986, 18: 446–455
- 35 Tsakiridis T, McDowell H, Walker T, et al. Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transport in L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology*, 1995, 136: 4315–4322
- 36 Richter C, Gogvadze V, Schlapbach R, et al. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 205: 1143–1150
- 37 Waterhouse N J, Goldstein J C, Ahsen O, et al. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol*, 2001, 153: 319–328
- 38 Rauter A P, Martins A, Borges C, et al. Antihyperglycaemic and protective effects of flavonoids on streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res*, 2010, 24: S133–S138
- 39 Liu I M, Liou S S, Lan T W, et al. Myricetin as the active principle of *Abelmoschus moschatus* to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Med Jul*, 2005, 71: 617–621
- 40 Kim T, Davis J, Zhang A J, et al. Curcumin activates AMPK and suppresses gluconeogenic gene expression in hepatoma cells. *BBRC*, 2009, 388: 377–382
- 41 Choi K H, Kim J E, Song N R, et al. Phosphoinositide 3-kinase is a novel target of piceatannol for inhibiting PDGF-BB-induced proliferation and migration in human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 2010, 85: 836–844

Development of a high-throughput screening assay for metabolic syndrome

CHEN DongMei¹, QIU BeiYing², YANG LingLing¹ & Li JingYa²

¹ School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

² National Center for Drug Screening, State Key Laboratory of New Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 201203, China

Mitochondria are one of the most important organelles in eukaryotic cells. In addition to supplying energy to cells, mitochondria are involved in a range of other processes, such as signaling, cellular differentiation and growth, and cell death. They have been implicated in several human diseases, including diabetes, obesity, neurodegenerative diseases and cancer. Mitochondrial membrane potential provides an index of mitochondrial functions. We developed a high-throughput screening assay for mitochondrial membrane potential in metabolic L6 myotubes. We optimized the concentration and processing time for JC-1 dye, the processing time for compounds, and the concentration of the uncoupler carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). The screening assay was verified with the mitochondrial inhibitors rotenone, malonate, antimycin A, oligomycin and berberine. The coefficient of variation (*CV*) with 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CCCP was 5.92%, and the *Z'* factor was 0.575; thereby meeting the strict quality control criteria for high-throughput screening assays. Our results indicate that L6 myotubes are appropriate, sensitive and efficient for measuring mitochondrial function, and could increase the likelihood of finding novel lead compounds for the treatment of metabolic syndrome.

L6 myotube, mitochondrial membrane potential, high-throughput screening, metabolic syndrome

doi: 10.1360/972011-2243