

## 线粒体相关内质网膜及检测方法

王爽<sup>1</sup>, 王雨凝<sup>2</sup>, 郝颖<sup>1</sup>, 王静<sup>2</sup>, 赵若凡<sup>1</sup>, 牛春雨<sup>2</sup>, 史海水<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>河北医科大学神经科学研究中心, 石家庄 050017; <sup>2</sup>河北医科大学基础医学院, 石家庄 050017;

<sup>3</sup>河北医科大学, 河北省神经生理学重点实验室, 石家庄 050017)

**摘要:** 线粒体相关内质网膜(mitochondria-associated ER membrane, MAM)是线粒体与内质网之间形成的具有一定功能的动态膜结构。MAM在维持内质网和线粒体正常功能的同时, 也广泛参与氧化应激、脂质代谢、自噬、Ca<sup>2+</sup>稳态等多种生理和病理生理过程调节。随着研究的开展, 透射电子显微镜、免疫荧光、邻近连接技术、基于分裂绿色荧光蛋白的接触位点传感器等技术逐渐被用于MAM功能和机制的相关研究, 为深入揭示MAM在疾病发生发展中的功能提供了技术支撑。本文主要就目前MAM相关检测方法作一综述, 为更好地开展MAM相关研究提供参考和借鉴。

**关键词:** 线粒体相关内质网膜; 透射电子显微镜成像; 邻近连接技术; 基于分裂绿色荧光蛋白的接触位点传感器

## Detection methods of mitochondria-associated ER membrane

WANG Shuang<sup>1</sup>, WANG Yuning<sup>2</sup>, HAO Ying<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>2</sup>,

ZHAO Ruofan<sup>1</sup>, NIU Chunyu<sup>2</sup>, SHI Haishui<sup>1,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Neuroscience Research Center, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

<sup>2</sup>Basic Medical College, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

<sup>3</sup>Hebei Key Laboratory of Neurophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract:** Mitochondria-associated ER membrane (MAM) is one kind of dynamic structure with certain functions between mitochondria and endoplasmic reticulum. MAM maintains the normal function of endoplasmic reticulum and mitochondria, and is also widely involved in the regulation of different physiological and pathophysiological processes, such as oxidative stress, lipid biosynthesis and trafficking, autophagy, and calcium homeostasis. With the deepening of research, transmission electron microscopy, immunofluorescence, proximity ligation assay (PLA) and split-GFP-based contact site sensor (SPLICS) are provided for detection and analysis of MAM, which provides technical support for further revealing the function of MAM in the occurrence and development of diseases. The present review mainly summarizes the recent progress of MAM-related detection methods, so as to provide more information for understanding the potential function of MAM.

**Key Words:** MAM; transmission electron microscopy; PLA; SPLICS

细胞器互作广泛参与了个体生理和病理生理过程, 已经成为生命科学领域的研究热点。作为

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(82171536); 河北省创新研究群体项目(H201206203)

第一作者: E-mail: wshuang411@163.com

\*通信作者: E-mail: shihs@hebmh.edu.cn

最早被发现的细胞器互作类型, 内质网和线粒体之间可通过某些蛋白质进行物理连接进而发生动态互作<sup>[1]</sup>, 两者互作产生的独特的膜结构被称作线粒体相关内质网膜(mitochondria-associated ER membrane, MAM)<sup>[2]</sup>。已有研究表明, MAM在细胞内环境稳态中扮演着重要角色<sup>[2]</sup>。MAM的改变或损伤与糖尿病<sup>[3]</sup>、肾脏疾病<sup>[4]</sup>、心血管疾病<sup>[5]</sup>、肿瘤<sup>[6]</sup>、阿尔兹海默症<sup>[7-9]</sup>等疾病的发生发展关系密切。随着人们对MAM潜在功能的关注, 包括透射电子显微镜成像法、荧光成像分析检测等在内的研究内质网与线粒体相互作用的技术方法体系日渐完善, 为更好揭示MAM的生物学功能提供了可能。本文主要就MAM研究进展及相关检测技术方法进行综述。

## 1 MAM概述

### 1.1 MAM相关蛋白

作为一种独特的膜结构, MAM占有所有线粒体膜的10%~15%。MAM的结构稳定和功能发挥依赖其结构内部的MAM相关蛋白(表1), MAM的改变

是细胞适应性稳态调节的结果。同时, MAM也是多种蛋白质功能发挥的结构基础<sup>[10]</sup>。MAM中线粒体与内质网膜之间的物理距离在10~100 nm的范围<sup>[11]</sup>。部分蛋白质除维持MAM物理距离外, 还参与Ca<sup>2+</sup>与胆固醇的转运、细胞自噬、炎性小体形成等生物学过程, 如肌醇1,4,5-三磷酸受体(inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R)、葡萄糖调节蛋白75(glucose-regulated protein 75, Grp75)以及电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)共同形成的蛋白复合体IP3R-Grp75-VDAC, 参与Ca<sup>2+</sup>从内质网至线粒体的转运, MAM相关蛋白表达的改变可引起MAM距离和IP3R-Grp75-VDAC复合体结构变化, 导致线粒体钙稳态失衡, 进而诱发一系列细胞功能改变。

### 1.2 MAM与疾病发生发展

MAM受细胞内外环境影响, 其改变涉及MAM相关蛋白构成和结构的动态改变, 与多种疾病发生发展关系密切。神经退行性疾病发生发展过程中出现的Ca<sup>2+</sup>稳态失衡、细胞自噬、凋亡水平增加和炎性小体形成等病理性改变均与MAM功能

表1 MAM相关蛋白及其功能

| 蛋白质                                                                            | 功能                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 线粒体融合蛋白2(Mitofusins 2, MFN2)                                                   | 调节线粒体融合 <sup>[12]</sup>                                     |
| 肌醇1, 4, 5-三磷酸受体(inositol 1,4,5 trisphosphate receptor, IP3R)                   | 调节Ca <sup>2+</sup> 转运 <sup>[11]</sup>                       |
| 葡萄糖调节蛋白75(glucose-regulated protein 75, Grp75)                                 | 调节Ca <sup>2+</sup> 转运 <sup>[11]</sup>                       |
| 电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)                              | 调节Ca <sup>2+</sup> 转运 <sup>[11]</sup>                       |
| 磷酸弗林蛋白酶酸性氨基酸簇分选2(phosphofurin acidic cluster sorting protein 2, PACS2)         | 参与MAM结构的形成、Ca <sup>2+</sup> 转运、脂质合成、自噬和细胞凋亡 <sup>[13]</sup> |
| 线粒体融合蛋白1(mitofusins 1, MFN1)                                                   | 调节线粒体融合 <sup>[14]</sup>                                     |
| 动力相关蛋白-1(dynammin-related protein-1, Drp-1)                                    | 调节线粒体分裂、Ca <sup>2+</sup> 转运 <sup>[15]</sup>                 |
| 囊泡相关膜蛋白B(vesicle-associated membrane protein-associated protein B, VAPB)       | 参与Ca <sup>2+</sup> 转运, 调节自噬 <sup>[16]</sup>                 |
| 蛋白质酪氨酸磷酸酶相互作用蛋白51(protein tyrosine phosphatase-interacting protein 51, PTPP51) | 参与MAM结构的合成, 调节Ca <sup>2+</sup> 转运、脂质转运、自噬 <sup>[16]</sup>   |
| sigma-1受体(sigma-1 receptor, Sig1R)                                             | 参与MAM结构的合成, 调节Ca <sup>2+</sup> 转运 <sup>[17]</sup>           |
| 线粒体分裂蛋白1(fission 1, Fis1)                                                      | 参与MAM结构的合成, 诱导细胞凋亡 <sup>[18]</sup>                          |
| B细胞受体相关蛋白31(B-cell receptor-associated protein 31, BAP31)                      | 参与MAM结构形成 <sup>[18]</sup>                                   |
| 蛋白激酶RNA样内质网激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)      | 参与MAM形成, 调节脂质、Ca <sup>2+</sup> 转运、活性氧的交换 <sup>[19]</sup>    |
| 肌醇必需蛋白1α(inositol-requiring protein 1α, IRE1α)                                 | 参与细胞凋亡 <sup>[20]</sup>                                      |
| 激活转录因子6(activating transcription factor 6, ATF6)                               | 参与细胞凋亡 <sup>[20]</sup>                                      |
| α-突触核蛋白(α-synuclein, α-Syn)                                                    | 维持MAM正常结构 <sup>[21]</sup>                                   |
| 磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶1(PTEN induced putative kinase1, PINK1)                      | 参与线粒体自噬 <sup>[22]</sup>                                     |

异常有关。研究发现,在阿尔兹海默症患者的成纤维细胞中,线粒体与内质网接触面积增大,线粒体和内质网之间的交互作用显著增加<sup>[23]</sup>,MAM功能出现紊乱<sup>[24]</sup>。 $\alpha$ -Syn突变可导致线粒体形态改变而引起MAM的功能下降,而 $\alpha$ -Syn过度聚集是帕金森氏综合征的主要病理学机制<sup>[21]</sup>。同时,帕金森氏综合征发病过程中,线粒体形态发生改变,引起线粒体与内质网的接触面积减少,MAM功能降低<sup>[25]</sup>。Sig1R突变伴随MAM功能降低<sup>[26]</sup>和 $\text{Ca}^{2+}$ 运输稳态失衡<sup>[17]</sup>,引起家族性肌萎缩侧索硬化。MAM受损可引起肌质网与线粒体之间的 $\text{Ca}^{2+}$ 转运增多,损伤心肌导致心肌细胞死亡<sup>[27]</sup>和心力衰竭<sup>[28]</sup>。此外,MAM还与动脉粥样硬化<sup>[29]</sup>、糖尿病<sup>[30]</sup>等代谢性疾病的发生发展密切相关(图1),MAM结构与功能的干预已成为多种疾病的潜在治疗靶点。

## 2 MAM检测方法

随着MAM研究的不断深入,MAM检测方法逐渐完善。包括透射电子显微镜成像技术、荧光成像技术、SPLICS技术、 $\text{Ca}^{2+}$ 检测技术、PLA技术、蛋白质印迹法<sup>[31]</sup>、二聚依赖荧光蛋白技

术<sup>[32]</sup>、蛋白质片段互补分析<sup>[33]</sup>、荧光共振能量转移技术<sup>[34]</sup>、免疫共沉淀<sup>[22]</sup>、质谱和蛋白质组学<sup>[35]</sup>等在内的研究方法被广泛应用,为深入揭示MAM功能及其与疾病发生发展的关系提供了强有力的技术支撑(表2)。

### 2.1 透射电子显微镜成像

透射电子显微镜技术可在保证组织样本形态不变的情况下,直接观察MAM的超微结构,具有分辨率高、直观性好等优点(图2)。应用透射电镜成像技术进行MAM形态学观察一般通过测量线粒体与内质网的接触长度或两者之间的接触距离来反映MAM的变化情况,进而反映MAM功能变化。两者之间物理联系区域的增加会相应地增强MAM的功能。Area-Gomez等<sup>[23]</sup>测量了电镜下内质网与线粒体的接触距离,即MAM长度,并将其分为三个等级:点状接触(<50 nm)、长接触(50~200 nm)、很长接触(>200 nm),通过量化接触等级来判断线粒体与内质网的接触情况。与Area-Gomez等<sup>[23]</sup>的研究结果类似,Liu等<sup>[15]</sup>采用测量接触长度法来反映MAM的功能。不同的是,Liu等<sup>[15]</sup>的分级为:较短长度(<200 nm)、中等长度(200~400 nm)和较长长度(>400 nm)。Filadi等<sup>[12]</sup>则采用了第二种

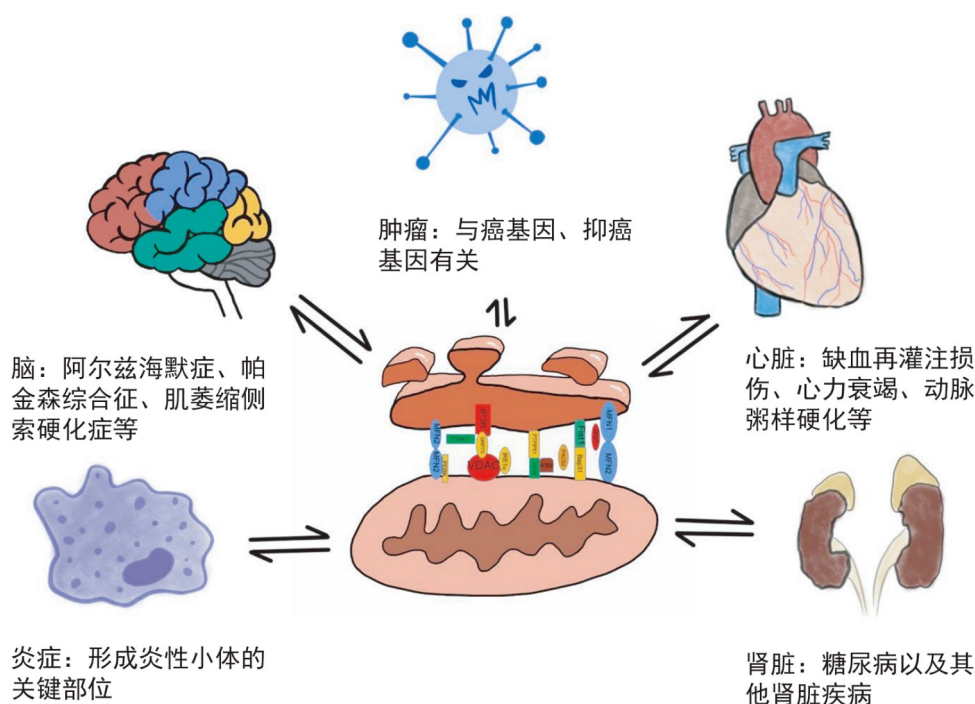


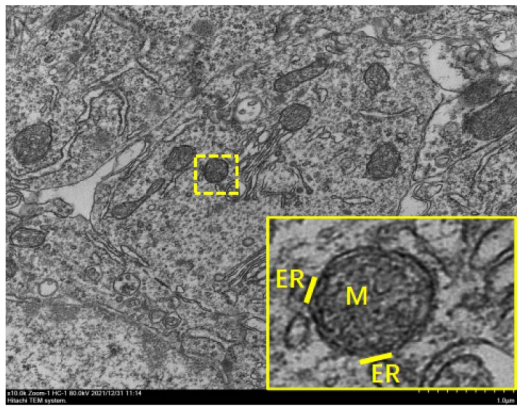
图1 MAM改变与疾病发生发展



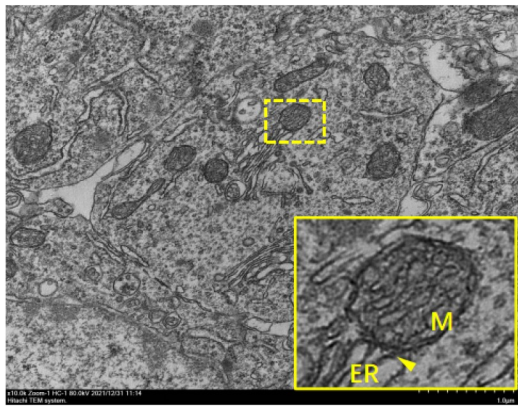
表2 MAM研究技术及其特点

| 研究方法                  | 名称        | 优缺点                                                   |
|-----------------------|-----------|-------------------------------------------------------|
| 形态学观察                 | 透射电子显微镜成像 | 观察方便、直观; 但相对较局限, 只能观察平面结构, 不能观测到立体细胞器且无法显示动态变化        |
| 荧光探针检测技术              | SPLICS    | 适用于活细胞观察, 对细胞器之间的接触极其敏感, 可部分检测接触部位动态变化; 但免疫荧光固定可能引入伪影 |
|                       | PLA       | 对细胞器距离的检测非常灵敏, 易检测到已知接触点; 但需提前确定检测蛋白以进行共定位            |
| Ca <sup>2+</sup> 检测技术 | 荧光探针      | 特异性高、荧光强度高、检测结果更直观                                    |
|                       | 流式细胞术     | 检测细胞数量多、敏感性高、检测全面                                     |
|                       | 钙成像技术     | 分辨率高、灵敏度高, 可实时监测神经元内Ca <sup>2+</sup> 的变化              |

A



B



A: 正常小鼠心脏中紧密接触图像; B: 正常小鼠心脏中松散接触图像; M: 线粒体; ER: 内质网。两者于黄色标注处接触形成MAM

图2 正常ICR小鼠心脏MAM透射电镜成像

量化指标, 即测量线粒体和内质网之间的距离, 发现*MFN2*敲除前的线粒体和内质网之间的距离最短为15 nm, 并将其定义为紧密接触; *MFN2*敲除后, 线粒体与内质网之间的距离接触不紧密, 大多呈现为较为松散的接触, 最短距离为50~100 nm, 两个膜平行延伸至少100 nm, 紧密接触的MAM之间Ca<sup>2+</sup>转运量较松散接触多。近年来, 基于三维电子显微镜的电子断层扫描三维重建技术可以重建MAM在内质网与线粒体之间的立体结构, 为MAM的空间形态研究提供了可能<sup>[36]</sup>。

2.2 荧光成像技术

2.2.1 荧光探针检测技术

荧光探针检测技术采用某种能与目标靶分子特异结合的探针对细胞样品进行染色, 对靶分子的含量及亚细胞定位进行分析检测。组成MAM的蛋白质约有上千种<sup>[37]</sup>, 基于其存在部位分为三类: 特异性存在于MAM中的蛋白质、同时存在于

MAM及其他细胞器中的蛋白质、暂存于MAM中的蛋白质<sup>[38]</sup>。Wang等<sup>[39]</sup>分别用Mito Tracker和ER Tracker探针标记线粒体和内质网, 结合激光共聚焦显微镜观察及共定位分析, 结果显示, 血管内皮生长因子处理人脐静脉内皮细胞后, 显著促进了MAM形成。MAM上还存在IP3R-Grp75-VDAC复合体等Ca<sup>2+</sup>通道, 可介导Ca<sup>2+</sup>从内质网向线粒体转运。使用Fluo-3 AM、Fluo-4 AM、Fura-2 AM<sup>[3,4]</sup>等Ca<sup>2+</sup>探针可以检测细胞内Ca<sup>2+</sup>水平, 进而分析MAM上Ca<sup>2+</sup>相关通道蛋白的功能变化, 并可实现活细胞MAM定位和Ca<sup>2+</sup>动态监测<sup>[40]</sup>。

2.2.2 免疫荧光检测技术

免疫荧光检测技术(immunofluorescence technique)又称荧光抗体技术, 该技术利用抗原与抗体高度特异性结合的原理, 通过检测标记物的含量, 对样品中待检抗原或抗体进行定性、定位和定量检测。Lopez-Crisosto等<sup>[41]</sup>用强力霉素诱导

线粒体应激,用两种荧光抗体分别标记内质网和线粒体相关蛋白,共聚焦显微镜检测发现,在应激早期,曼德尔共定位系数(即两种荧光蛋白重叠比例)显著增加,进一步观察发现mitochondria-to-ER曼德尔系数随强力霉素作用时间持续而增加,而ER-to-mitochondria的曼德尔系数与强力霉素作用无时间依赖性关系,提示强力霉素诱导的线粒体应激引起的MAM接触增加是由于线粒体接近内质网造成的。

### 2.3 基于分裂绿色荧光蛋白的接触位点传感器

基于分裂绿色荧光蛋白的接触位点传感器(split-GFP-based contact site sensor, SPLICS)可以用来检测两个细胞器之间的接触位点。SPLICS传感器被设计为在单个载体中表达等摩尔量的细胞器上分别表达spGFP1-10和spGFP11蛋白<sup>[42]</sup>,即用spGFP1-10标记内质网,用spGFP11标记线粒体,当两个膜接近时,会显现出荧光。这个荧光表示的是两细胞器的接触点,可使用特定的软件进行量化。使用最小的靶向序列有助于靶向特异性和对细胞器膜的覆盖,避免了全长融合蛋白过表达造成的伪影,从而可能干扰细胞的生理<sup>[43]</sup>。SPLICS主要用于异形细胞器的并置,如内质网和质膜、线粒体和溶酶体等。这一技术可特异性识别10~50 nm范围内的内质网与线粒体接触<sup>[44]</sup>。已有学者通过SPLICS技术证明了内质网和线粒体的相互作用是一种动态结构,其重构是依据不同的细胞功能改变的。SPLICS可在生理或病理条件下将线粒体与内质网的接触可视化,有助于探索疾病相关基因如何通过调节线粒体和内质网的联系来影响细胞功能。

### 2.4 $\text{Ca}^{2+}$ 检测技术

$\text{Ca}^{2+}$ 是机体各项正常生理活动不可或缺的离子,在凝血、肌肉收缩、信号转导等方面发挥重要作用。内质网是细胞内最主要的 $\text{Ca}^{2+}$ 储存库,内质网腔中的 $\text{Ca}^{2+}$ 可通过MAM上的 $\text{Ca}^{2+}$ 通道进入线粒体。内质网膜上IP3R的激活可刺激 $\text{Ca}^{2+}$ 从内质网腔中释放出来,同时通过线粒体外膜上的离子通道蛋白VDAC摄取进入线粒体膜间隙,利用活细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 探针可以直接观察到这种现象。研究发现,增加内质网-线粒体的接触,可以促进 $\text{Ca}^{2+}$ 的单向转

运<sup>[27]</sup>。MAM接触面积增加可使 $\text{Ca}^{2+}$ 转运增加,从而激活线粒体内 $\text{Ca}^{2+}$ 依赖的各种功能,如调节肌肉收缩、神经元兴奋等。同时,MAM距离变远(>30 nm)将降低 $\text{Ca}^{2+}$ 转运速率,距离变近(约15 nm)将促进 $\text{Ca}^{2+}$ 传递,MAM距离过近(<7 nm)会影响IP3R-Grp75-VDAC复合体的正常结构,导致 $\text{Ca}^{2+}$ 转运减少<sup>[10]</sup>。除了 $\text{Ca}^{2+}$ 探针检测法外,流式细胞术可以一次性检测大量细胞的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度,敏感度高且分析较为全面,但不能解释某些复杂的动力学反应<sup>[45]</sup>。钙成像技术则是通过荧光指示剂与 $\text{Ca}^{2+}$ 结合前后的荧光信号强弱不同来观察 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度水平的变化,已应用于活体动物 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度动态检测<sup>[46]</sup>。

### 2.5 邻位连接技术

邻位连接技术(proximity ligation assay, PLA)首次报道于2002年,具有高灵敏度的特点<sup>[47]</sup>。PLA利用特异性抗体(直接或间接)识别两种感兴趣的蛋白质,利用与抗体共价连接的特异性DNA引物的荧光探针进行PCR扩增,可以通过荧光显微镜显示接近的斑点,进行内源性蛋白与蛋白相互作用的原位(距离<40 nm)检测。PLA可用来检测MAM相关蛋白的相互作用情况,同时也可反映MAM数量以及内质网和线粒体之间的距离。Thoudam等<sup>[48]</sup>利用PLA标记内质网靶向和线粒体靶向的蛋白质,发现敲低丙酮酸脱氢酶激酶4(pyruvate dehydrogenase kinases 4, PDK4)可导致IP3R-Grp75-VDAC复合体之间的相互作用减少,证明PDK4直接与IP3R-Grp75-VDAC复合体相互作用以调节肥胖诱导的MAM形成。Xue等<sup>[49]</sup>在高葡萄糖情况下培养了人近端肾小管上皮细胞,PLA结果显示,VDAC和Grp75或VDAC和IP3R的相互作用显著减少,破坏了细胞完整性。而Beaulant等<sup>[50]</sup>报道称,在肝脏中过表达胎儿和成人睾丸表达基因1(fetal and adult testis-expressed 1, FATE1)可导致VDAC1-IP3R1接触减少,细胞器互作及 $\text{Ca}^{2+}$ 转运受损,与饮食诱导的肥胖小鼠肝胰岛素抵抗和脂肪变性密切相关。而强化线粒体内质网互作可防止饮食诱导的葡萄糖不耐受。

## 3 总结与展望

作为细胞器间交互而形成的特殊膜结构,

MAM在细胞内的Ca<sup>2+</sup>稳态、脂质代谢、炎症反应、细胞自噬与凋亡等生理与病理生理过程中发挥重要作用, 已经成为生命科学领域尤其是医学领域重要的研究内容之一。在MAM相关的各种检测方法中, 透射电子显微镜技术可直接观察MAM结构并可实现MAM间隙测量和ER-线粒体接触点量化, 三维电镜可重建MAM结构, 为MAM空间形态结构的研究提供了便利。透射电子显微镜与荧光显微镜相结合, 可实现结构与功能的研究。免疫印迹、免疫荧光、质谱、蛋白质组学等方法, 可以对MAM的分子组成进行定性和定量分析。虽然MAM相关检测方法很多, 但是每种方法都具有一定的局限性, 如免疫荧光固定时可能会引入伪影, 影响观察。在实际研究中要根据研究目的选择合适的一种或几种方法相结合, 同时还要考虑相关方法涉及的仪器设备及人员操作技能的限制。随着MAM相关研究技术方法的创建和改进, MAM的研究逐渐深入, 最终也会为推动其他细胞器互作及其在疾病发生发展中的功能研究提供技术支持和借鉴。

### 参考文献

- [1] Cho IT, Adelmant G, Lim Y, et al. Ascorbate peroxidase proximity labeling coupled with biochemical fractionation identifies promoters of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts. *J Biol Chem*, 2017, 292(39): 16382-16392
- [2] Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, et al. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(2): 81-88
- [3] Tubbs E, Theurey P, Vial G, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes*, 2014, 63(10): 3279-3294
- [4] Gao P, Yang W, Sun L. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs) and their prospective roles in kidney disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2020. doi: 10.1155/2020/3120539
- [5] Gao P, Yan Z, Zhu Z. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in cardiovascular diseases. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 604240
- [6] Yu H, Sun C, Gong Q, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in breast cancer. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 629669
- [7] Pera M, Montesinos J, Larrea D, et al. MAM and C99, key players in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol*, 2020, 154: 235-278
- [8] Area-Gomez E, Schon EA. Mitochondria-associated ER membranes and Alzheimer disease. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 38: 90-96
- [9] Purtilo DT. Lymphotropic viruses, Epstein-Barr virus (EBV) and human T-cell lymphotropic virus-I (HTLV-I)/adult T-cell leukemia virus (ATLV), and HTLV-III/human immune deficiency virus (HIV) as etiological agents of malignant lymphoma and immune deficiency. *AIDS Res*, 1986, 2 Suppl 1: S1-6
- [10] Giacomello M, Pellegrini L. The coming of age of the mitochondria-ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ*, 2016, 23(9): 1417-1427
- [11] 高鹏, 杨明, 孙林. 线粒体相关内质网膜(MAM)钙转运及调节蛋白介导线粒体钙稳态. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(4): 585-593
- [12] Filadi R, Greotti E, Turacchio G, et al. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(17): E2174-2181
- [13] Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, et al. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J*, 2005, 24(4): 717-729
- [14] McFie PJ, Ambilwade P, Vu H, et al. Endoplasmic reticulum-mitochondrial interaction mediated by mitofusin-1 or mitofusin-2 is not required for lipid droplet formation or adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(1): 392-397
- [15] Liu Y, Ma X, Fujioka H, et al. DJ-1 regulates the integrity and function of ER-mitochondria association through interaction with IP3R3-Grp75-VDAC1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(50): 25322-25328
- [16] Gomez-Suaga P, Paillusson S, Stoica R, et al. The ER-mitochondria tethering complex VAPB-PTPIP51 regulates autophagy. *Curr Biol*, 2017, 27(3): 371-385
- [17] Watanabe S, Ilieva H, Tamada H, et al. Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in *SIGMAR1*- and *SOD1*-linked ALS. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(12): 1421-1437
- [18] Iwasawa R, Mahul-Mellier AL, Datler C, et al. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J*, 2011, 30(3): 556-568



- [19] Fan P, Jordan VC. PERK, beyond an unfolded protein response sensor in estrogen-induced apoptosis in endocrine-resistant breast cancer. *Mol Cancer Res*, 2022, 20(2): 193-201
- [20] Kumar V, Maity S. ER stress-sensor proteins and eR-mitochondrial crosstalk-signaling beyond (ER) stress response. *Biomolecules*, 2021, 11(2): 173
- [21] Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Rub C, et al. alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J Neurosci*, 2014, 34(1): 249-259
- [22] Gelmetti V, De Rosa P, Torosantucci L, et al. PINK1 and BECN1 relocate at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. *Autophagy*, 2017, 13(4): 654-669
- [23] Area-Gomez E, del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J*, 2012, 31(21): 4106-4123
- [24] Eysert F, Kinoshita PF, Mary A, et al. Molecular dysfunctions of mitochondria-associated membranes (MAMs) in alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(24): 9521
- [25] Hattori N, Arano T, Hatano T, et al. Mitochondrial-associated membranes in Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 997: 157-169
- [26] Bernard-Marissal N, Médard JJ, Azzedine H, et al. Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain*, 2015, 138(4): 875-890
- [27] Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, et al. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*, 2013, 128(14): 1555-1565
- [28] Bertero E, Maack C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(8): 457-470
- [29] Moulis M, Grousset E, Faccini J, et al. The multi-functional sorting protein PACS-2 controls mitophagosome formation in human vascular smooth muscle cells through mitochondria-ER contact sites. *Cells*, 2019, 8(6): 638
- [30] Giorgi C, Ito K, Lin HK, et al. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science*, 2010, 330(6008): 1247-1251
- [31] Khodzhaeva V, Schreiber Y, Geisslinger G, et al. Mitofusin 2 deficiency causes pro-inflammatory effects in human primary macrophages. *Front Immunol*, 2021, 12: 723683
- [32] Alford SC, Abdelfattah AS, Ding Y, et al. A fluorogenic red fluorescent protein heterodimer. *Chem Biol*, 2012, 19(3): 353-360
- [33] Tchekanda E, Sivanesan D, Michnick SW. An infrared reporter to detect spatiotemporal dynamics of protein-protein interactions. *Nat Methods*, 2014, 11(6): 641-644
- [34] Naon D, Zaninello M, Giacomello M, et al. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(40): 11249-11254
- [35] Zhang A, Williamson CD, Wong DS, et al. Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(10): M111.009936
- [36] Thai TQ, Nguyen HB, Sui Y, et al. Interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum in demyelinated axons. *Med Mol Morphol*, 2019, 52(3): 135-146
- [37] Ma JH, Shen S, Wang JJ, et al. Comparative proteomic analysis of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) in a long-term type 2 diabetic rodent model. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2062
- [38] Janikiewicz J, Szymaski J, Malinska D, et al. Mitochondria-associated membranes in aging and senescence: structure, function, and dynamics. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 332
- [39] Wang C, Dai X, Wu S, et al. FUNDC1-dependent mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes are involved in angiogenesis and neoangiogenesis. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2616
- [40] Csordas G, Várnai P, Golenár T, et al. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell*, 2010, 39(1): 121-132
- [41] Lopez-Crisosto C, Díaz-Vegas A, Castro PF, et al. Endoplasmic reticulum-mitochondria coupling increases during doxycycline-induced mitochondrial stress in HeLa cells. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 657
- [42] Yang Z, Zhao X, Xu J, et al. A novel fluorescent reporter detects plastic remodeling of mitochondria-ER contact sites. *J Cell Sci*, 2018, 131(1): jcs208686
- [43] Cali T, Brini M. Quantification of organelle contact sites by split-GFP-based contact site sensors (SPLICS) in living cells. *Nat Protoc*, 2021, 16(11): 5287-5308
- [44] Cieri D, Vicario M, Giacomello M, et al. SPLICS: a split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell*

- [Death Differ](#), 2018, 25(6): 1131-1145
- [45] June CH, Abe R, Rabinovitch PS. Measurement of intracellular calcium ions by flow cytometry. [Curr Protocols Cytometry](#), 2001, doi: 10.1002/0471142956
- [46] Yang W, Yuste R. *In vivo* imaging of neural activity. [Nat Methods](#), 2017, 14(4): 349-359
- [47] Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, et al. Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. [Nat Biotechnol](#), 2002, 20(2005): 2473-2477
- [48] Thoudam T, Ha CM, Leem J, et al. PDK4 augments ER-mitochondria contact to dampen skeletal muscle insulin signaling during obesity. [Diabetes](#), 2019, 68(3): 571-586
- [49] Xue M, Fang T, Sun H, et al. PACS-2 attenuates diabetic kidney disease via the enhancement of mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane formation. [Cell Death Dis](#), 2021, 12(12): 1107
- [50] Beaulant A, Dia M, Pillot B, et al. Endoplasmic reticulum-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis. [J Hepatol](#), 2022. doi: 10.1016/j.jhep.2022.03.017