

线粒体功能相关检测方法的研究进展

熊君^{1,2}, 范超², 王晓艳², 周云², 张颖^{2*}

¹西安医学院研究生工作部, 陕西 西安

²空军军医大学第二附属医院传染科, 陕西 西安

收稿日期: 2023年8月12日; 录用日期: 2023年9月6日; 发布日期: 2023年9月12日

摘要

线粒体(mitochondria)是真核细胞重要的细胞器, 是细胞的“能量工厂”。线粒体功能障碍主要表现为线粒体形态、结构和功能异常, 包括: 线粒体异常体积、数量的增加或减少、线粒体膜电位异常, 线粒体DNA损伤等。研究发现, 这些线粒体结构、功能的变化与多种疾病的发生发展密切相关。而随着生物检测技术的发展, 对线粒体结构和功能的检测方法也不断更新, 现就线粒体结构和功能相关的检测方法及其研究进展作一综述。

关键词

线粒体结构, 线粒体功能, 细胞能量代谢, 检测方法

Research Progress on Detection Methods Related to Mitochondrial Function

Jun Xiong^{1,2}, Chao Fan², Xiaoyan Wang², Yun Zhou², Ying Zhang^{2*}

¹Postgraduate Work Department of Xi'an Medical University, Xi'an Shaanxi

²Department of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital of Air Force Medical University, Xi'an Shaanxi

Received: Aug. 12th, 2023; accepted: Sep. 6th, 2023; published: Sep. 12th, 2023

Abstract

Mitochondria are important organelles of eukaryotic cells and the “energy factory” of cells. Mitochondrial dysfunction mainly manifests as abnormal mitochondrial morphology, structure, and function, including: abnormal volume, increase or decrease of mitochondrial number, abnormal

*通讯作者。

mitochondrial membrane potential, mitochondrial DNA damage, etc. Studies have found that these changes in mitochondrial structure and function are closely related to the occurrence and development of various diseases. With the development of bioassay technology, the detection methods of mitochondrial structure and function are constantly updated, and the detection methods and research progress related to mitochondrial structure and function are reviewed here.

Keywords

Mitochondrial Structure, Mitochondrial Function, Cellular Energy Metabolism, Detection Method

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

线粒体是一种存在于几乎所有真核细胞胞质的细胞器，其主要功能是以三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的形式产生能量供给细胞代谢使用。同时，线粒体也参与细胞自噬、钙离子稳态、免疫应答、信号转导和细胞凋亡等过程[1]。因此，维持线粒体功能和代谢平衡对细胞的功能和存活至关重要。线粒体稳态(mitochondrial homeostasis)是线粒体生物发生和降解之间的稳态平衡，主要与线粒体膜电位的稳定、钙离子平衡、线粒体 DNA (mtDNA)的完整性以及线粒体的分裂融合有关，线粒体稳态在调节细胞形态，数量，亚细胞分布和功能方面发挥重要作用。大量研究表明，在不同的致病因素影响下，线粒体结构和功能易受损，从而影响机体其他细胞组织的正常功能，导致多种疾病发生，例如帕金森病[2]、阿尔茨海默病[3]和心肌缺血-再灌注损伤等[4]。在相关研究中，研究者通过对线粒体形态结构及功能的检测分析了疾病发生和线粒体功能障碍的关系。其中，线粒体检测方法可分为对线粒体结构的初步检测和线粒体功能的具体分析。而线粒体功能分析包括：线粒体膜电位测定、线粒体耗氧量测定、线粒体 Ca^{2+} 检测、线粒体通透性转换孔检测、线粒体 ATP 检测、线粒体呼吸链复合体检测和线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)测量等。

2. 形态结构检测

线粒体是一种广泛存在于真核细胞内的双层膜细胞器，直径在 0.5 到 1.0 微米左右，一般呈短棒状和圆球状，其大小受细胞代谢水平限制[5]，不同组织在不同条件下可能产生体积异常膨大的线粒体，例如胰脏外分泌细胞、神经元细胞和人成纤维细胞中的线粒体等。

电子显微镜是观察真核细胞细胞器的重要工具，也是观察和分析线粒体结构的金标准[6]。但电子显微镜不能清晰地区分线粒体和其他膜结构，同时也无法观察线粒体的动态变化。原子力显微镜作为一种新兴的观察方法，在分辨率和实时成像方面具有优势，并且可以在液体环境下观察线粒体肿胀等动态变化，但适用范围较小[7] [8] [9] [10]。近年来荧光共聚焦显微镜技术不断提高，为线粒体结构观测提供了新的选择。在大多数情况下，显微镜可以用来观察和分析二维线粒体的形态和数量。三维共聚焦显微镜可以通过在 3D 水平观察特定标记的线粒体蛋白质来观察线粒体的形态[11]。宽视野荧光显微镜和高分辨共聚焦激光扫描显微镜可用于线粒体形态变化的成像分析，特异性高于电子显微镜，但不能观察到线粒体的动态变化。最近研制的 AiryScan 显微镜可以高速、高灵敏度地采集图像，有效地观察线粒体分裂、融合和自噬的动力学过程[12] [13] [14]。此外，在用特定的染料标记线粒体后，可使用免疫荧光染色和计

算机图像的组合来可视化线粒体形态[15][16]。

3. 线粒体功能检测

3.1. 线粒体膜电位的测定

线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP, $\Delta\psi_m$)指线粒体内膜两侧离子浓度不同所产生的负电位差(-180 mV~-200 mV), 与细胞动态平衡密切相关, 反映线粒体功能的完整性, 是评价线粒体功能的敏感指标[17]。

目前常采用流式细胞术结合荧光染料探针来检测 MMP。常用罗丹明 123 (Rhod123)、四甲基罗丹明甲酯(tetramethylrhodamine methyl ester, TMRM)、四甲基罗丹明乙酯(tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE)和四氯四乙基苯并咪唑羰花菁碘化物(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine, JC-1)等亲脂阳离子荧光染料。Rhod123 是最早使用的检测 MMP 的荧光探针。TMRM 是对细胞通透、无毒的阳离子荧光染料。其在线粒体积累仅源于 MMP 变化、相对毒性更小、与细胞器结合率低、适合做 MMP 的定量分析等。JC-1 是一种广泛用于检测 MMP 的阳离子型亲脂性荧光探针, 比 Rhod123 灵敏度更高。在 MMP 较低时, JC-1 以单体形式存在, 产生绿色荧光; 在线 MMP 较高时, JC-1 聚集在线粒体基质中, 形成聚合体 JC-1, 产生红色荧光。因此, 检测者可以非常方便地通过荧光颜色的转变来分析 MMP 的变化。

近年来, 荧光共振能量转移分子对(fluorescent resonance energy transfer pairs, FRET Pairs)也用于 MMP 比率荧光监测。FRET 供体分子(FRET donor molecule, FixD)通过将苜基氯基团连接到具有绿色荧光发光的荧光团来构建, 固定在线粒体中。FRET 受体分子(FRET acceptor, LA)吸收绿色荧光和发射深红色荧光, 且依赖于 MMP。当 MMP 正常时, FixD 与 LA 之间发生 FRET, 可以检测到深红色荧光发射, 而当 MMP 逐渐减少时, LA 从线粒体中逐渐脱落, 进而检测到深红色荧光发射逐渐减少和绿色荧光发射逐渐增加。因此, 研究者可通过两种荧光发射颜色的变化来监测 MMP 的动态变化, 为发展新型 MMP 荧光探针和对活体、组织和细胞中 MMP 的实时原位研究提供了新思路[18]。

值得注意的是, 线粒体膜上不同部位的 MMP 差异很大。精准测量局部 MMP 变化的方法还需深入研究。例如, 低浓度的半花菁衍生物(TPP-CY)可以精确检测亚细胞水平的 MMP 和线粒体形态的微量变化, 具有优异的选择性和高分辨率的特点。该方法的进一步优化, 有望成为在亚细胞水平评估线粒体功能的潜在工具[19]。

3.2. 线粒体耗氧量测定

在所有细胞器中, 线粒体消耗的氧气最多, 这种氧气消耗往往反应线粒体的功能状态。常用氧电极极谱法检测线粒体耗氧量。这种方法在 30℃ 的磁场搅拌培养箱中操作, 通过在耗氧介质中孵育线粒体实现对线粒体耗氧的精确分析。简单地说, 鱼藤酮用于抑制电子传递链中的复合体 I, 然后加入琥珀酸来测量线粒体的状态 IV 呼吸。线粒体呼吸状态是指呼吸底物及 ADP 以不同浓度存在时线粒体的呼吸速率。在呼吸底物和 ADP 都存在时的呼吸速率称为状态 III 呼吸; ADP 被消耗殆尽但呼吸底物仍然剩余时的呼吸速率称为状态 IV 呼吸。状态 III 呼吸速率与状态 IV 呼吸速率之比, 称为呼吸控制率(respiration control rate, RCR) [20], RCR 降低表示线粒体 ATP 合成受损和线粒体功能障碍, 而 RCR 升高表示细胞活动旺盛和代谢加快。

此外, 研究者也开发出具有自动或半自动化的线粒体功能分析仪, 其中包括 Oxygraph-2k 线粒体功能测定仪和 Seahorse 细胞能量代谢分析仪, 用于检测线粒体功能和细胞代谢, 在代谢研究中广泛使用。例如, Seahorse 分析仪通过传感器测量溶解氧和酸碱度的变化, 自动计算速率, 提供细胞耗氧率(oxygen consumption rate, OCR)和细胞外酸化速率(extracellular acidification rate, ECAR)的实时数据。OCR 用于研

究线粒体的氧化磷酸化功能,通过测量基础呼吸和添加寡霉素后的质子泄漏,可计算出氧化磷酸化的耗氧率。ECAR 用于研究糖酵解等代谢情况,基础值反映非催化产酸,加入葡萄糖后的增加量代表糖酵解。添加寡霉素后,细胞通过乳酸发酵产生能量,产酸增加。ECAR 的直接测量存在一定偏差,因为添加葡萄糖会增强糖酵解和氧化磷酸化,导致计算出的糖酵解量偏高。

3.3. 线粒体 Ca^{2+} 检测

细胞内的 Ca^{2+} 主要储存在线粒体和内质网等细胞器中,在信号转导、凝血、跨膜离子转运和细胞分裂等生物过程中发挥关键作用[21]。而线粒体内的 Ca^{2+} 对于调控 ATP 生成起着关键作用。 Ca^{2+} 失衡可导致线粒体功能障碍,进而引起细胞损伤和死亡[22]。线粒体内 Ca^{2+} 积累促进 ATP 合成,减少则降低 ATP 水平。ATP 合成受损进一步导致 Ca^{2+} 失衡,可诱导机体内分泌功能障碍和疾病发生,如线粒体相关糖尿病的发生[22] [23]。因此,了解线粒体 Ca^{2+} 的动态变化对研究疾病机制和治疗具有重要意义。

线粒体 Ca^{2+} 的经典测定方法包括沉淀法、电化学法、EDTA 螯合滴定法、火焰光度法和原子吸收分光光度法。其中,电化学法最方便,该方法利用化学电池在溶液中的电化学性质及其变化,可用于有机物和无机物的定性和定量分析,但易受钠、钾、磷和硫酸盐等物质干扰,适用于实时监测和光敏度要求不高的实验。

随着免疫荧光技术的发展, Ca^{2+} 水平也可用荧光探针进行检测,相关探针包括:Quin-2AM、Fluo-3AM、Indo-1AM、Rhod-2、Fluo-4、Mag-Fluo-4 和钙-罗丹明 123 等。其中,Quin-2AM、Fluo-3AM、Indo-1AM 和 Fluo-4 用于胞内 Ca^{2+} 检测, Mag-Fluo-4 用于内质网 Ca^{2+} 检测,钙-罗丹明 123 通过荧光分光光度法定量测定线粒体 Ca^{2+} 含量。Fluo-3 是常用的单波长指示剂,适用于激光共聚焦成像研究,可定量分析单个完整活细胞中 Ca^{2+} 分布并区分线粒体 Ca^{2+} 。这些方法操作简便、性能稳定且特异性较高。

3.4. 线粒体通透性转换孔检测

线粒体渗透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是存在于线粒体内外膜之间的一组蛋白复合体,具有高度选择性,是调控线粒体通透性的结构基础[24]。此外, MPTP 对细胞内离子浓度变化非常敏感,在细胞内信号转导系统中具有重要作用。MPTP 的异常开放与 Ca^{2+} 浓度的异常升高、氧化应激和 mtDNA 突变密切相关[25]。MPTP 适度开放可促进线粒体清除有害物质,持久开放则会导致不可逆损伤,诱导线粒体基质肿胀、内膜去极化、ATP 水解等,最终导致细胞死亡或凋亡[26]。

检测 MPTP 的经典方法有膜片钳、分光光度法和活性物质标记法等。膜片钳方法是最早使用的方法,该方法通过记录离子通道电流来反映离子通道的活动,以评估线粒体的功能。全自动膜片钳技术,操作简单高效,但仅适用于悬浮细胞检测。与活性物质标记法和膜片钳方法相比,分光光度法更简单且更常用。现在,原子力显微镜可直接观察 MPTP 开放,这对研究 MPTP 异常开放具有重要意义,但对实验室设备配备要求较高。钙黄绿素-钴荧光探针技术是一种新兴的 MPTP 检测方法,设备依赖性小,灵敏度高。该技术使用钙黄绿素-AM 荧光探针,其 AM 基团增强了染料的疏水性,使其可穿透质膜。探针实现跨膜后,AM 被胞内酯酶裂解,形成高荧光和极性的钙黄绿素。当细胞与钙黄绿素和 Co^{2+} 孵育时,二者进入细胞质,但钙黄绿素会进一步被线粒体捕获。线粒体中的钙黄绿素发出荧光,而细胞质中的钙黄绿素则被 Co^{2+} 迅速猝灭。正常情况下, MPTP 瞬时开放,使细胞质中的钙黄绿素迅速被熄灭。在病理状态下,如钙超载和氧化应激发生时, MPTP 持续开放, Co^{2+} 进入线粒体猝灭钙黄绿素荧光,导致线粒体荧光强度逐渐减弱,可用来反映 MPTP 的开放程度。

3.5. 线粒体 ATP 检测

ATP 通常被认为是细胞的主要能量来源,而线粒体是 ATP 的主要产生场所。线粒体对外界环境刺激

非常敏感,线粒体一旦受损,ATP生成减少,从而抑制许多细胞代谢过程,导致机体疾病发生。例如,帕金森病、心血管疾病和内分泌功能障碍等都与线粒体ATP生产减少相关[27][28]。因此,ATP水平是评估细胞能量代谢和线粒体功能的关键指标。

测量ATP水平需要新鲜提取的线粒体样品,以保证线粒体的完整性和连接状态[29]。目前常用的技术包括经典层析法、高效液相色谱法、酶分析法和荧光检测法等。经典层析柱使用大直径的玻璃管柱,用液位差输送流动相,但此方法效率低,耗时长。而高效液相色谱法在经典层析法基础上发展而来,填料颗粒更小且均匀,柱效高,配合自动化系统使用操作简单,灵敏度高,可测定不同状态下细胞能量物质的差异。酶学方法则是通过测量磷酸烯醇式丙酮酸中NADH氧化成NAD⁺的吸光度或荧光的降低来评估ADP的产生[30]。近年来,荧光检测技术在测定线粒体的ATP合成活性方面得到了改进。其中,荧光素-荧光素酶测定法是一种常用的方法。该方法应用Mito-Rh探针,可高选择性的实时监测线粒体中ATP的含量变化,其检测灵敏度可达0.1~10 mM [31]。此外,FRET还可用于检测标记了ATP合成酶亚单位后的ATP合成水平[32]。

此外,近年来,研究者开发了用于线粒体ATP检测的多色ATP指示剂。与以往只能特异性检测细胞内ATP的指示剂不同,多色ATP指示剂是基于红、绿、蓝三种颜色的单一荧光蛋白指示剂[33][34][35],可以同时检测同一细胞内不同细胞器中的ATP,并同时检测哺乳动物、植物甚至蠕虫细胞线粒体中的ATP动力学,对未来的能量代谢研究有一定的促进作用[31][36]。

3.6. 线粒体呼吸链复合体的检测

线粒体呼吸链位于线粒体内膜上,由5个复合物组成,其中包括:复合物I(NADH-Q氧化还原酶)、复合物II(琥珀酸-Q氧化还原酶)、复合物III(UQ-细胞色素C氧化还原酶)、复合物IV(细胞色素C氧化酶)和复合物V(ATP合成酶)。其通过一系列的氧化还原过程最终形成ATP。对线粒体呼吸链复合体的检测方法包括:分光光度法、蛋白质印迹法、近红外光谱技术等。

分光光度法是检测线粒体呼吸链复合物I~V活性的主要技术。为了比较不同细胞或组织中线粒体呼吸链复合物的活性,需同时测量Krebs循环中柠檬酸合酶的活性作为对照。复合物I和V的活性与NADH的氧化速率成正比,可通过测量NADH在340 nm处的吸光度来确定[37]。例如,复合体II催化琥珀酸氧化,以2,6-二氯靛酚(2,6-dichlorophenol indophenols, DCPIP)为底物,通过测定底物氧化后600 nm处吸光度值确定复合体II的活性。而复合体III和IV的活性通过测量细胞色素在550 nm处的吸光度来确定。此外,利用呼吸链复合体的特异性抗体反应,通过蛋白质印迹法可直接反映呼吸链复合体I-V的表达水平,从而间接反映呼吸链的状态。但蛋白质表达水平和蛋白质活性有时并不相关,分光光度法仍然是检测线粒体呼吸链复合体的首选方法。近年来,近红外光谱技术在线粒体复合体的非侵入性测量方面取得了很大进展,该方法原理上类似于分光光度法,但受外部环境的影响较小。例如,研究者应用此方法检测复合体IV活性,以判断抑郁症的严重程度[38][39]。然而,由于近红外光谱复制所需样本量大,仪器型号不同,具有严重的局限性,尚未广泛应用。

3.7. ROS的测量

线粒体是细胞内氧化磷酸化和产生ROS的主要场所。细胞内活性氧包括超氧阴离子自由基、过氧化氢及其下游产物。在生理条件下,细胞内抗氧化防御系统使自由基的产生和清除处于平衡状态。在病理条件下,细胞内抗氧化系统和氧自由基之间的平衡被破坏。当细胞内ROS水平过高时,线粒体结构和功能受损,细胞色素c通过MPTP释放,导致线粒体酶、脂类和核酸损伤以及氧化应激[40]。此外,ROS可导致mtDNA碱基氧化和增殖异常,从而引起线粒体ATP合成减少和MMP下降[41]。因此,线粒体的

功能状态可以通过测量 ROS 水平来确定。

常用的 ROS 检测方法有化学发光法、电化学生物传感器、分光光度法和荧光染色法等, 这些方法可进行定量或定性分析。化学反应法灵敏度高、成本低、操作简单, 但特异性较差, 易受某些氧化还原反应或酶催化反应影响。分光光度法通常采用四硝基甲烷、硝基四氮唑蓝(nitro blue tetrazolium, NBT) [42]、细胞色素 c、肾上腺素和还原辅酶 I 等试剂, 它们与超氧阴离子自由基反应生成具有特定吸光度的亚铁细胞色素(在 550 nm 处可检测到), 可用于测量 ROS 水平。NBT 法具有很高的灵敏度, 通常用于氧自由基的组织化学定位, 但很难测量活细胞或水体系中氧自由基的动态变化。细胞色素 c 具有氧化活性, 可用于检测氧自由基的产生。然而, 细胞色素 c 很容易被其他还原剂还原, 因此限制了氧自由基的检测灵敏度。在过去的十年中, 研究者已经开发了许多荧光素探针检测细胞内或线粒体内的 ROS 水平。细胞内 ROS 的测量通常使用荧光探针 DCHF-DA, 该可以自由穿过细胞膜。线粒体内 ROS 的测量通常使用荧光探针 MitoSOX, 该探针在线粒体内 ROS 具有高度特异性, 具有背景信号低、线性范围宽和检测效率高的特点, 但需要立即对检测结果进行成像和光保护, 防止荧光猝灭。另外, 电子顺磁共振(ESR)波谱技术是一种新兴技术, 是研究瞬态自由基的一种非常有用的工具。由于瞬态自由基寿命短、稳态浓度低, 检测瞬态自由基通常采用自由基捕捉技术与 ESR 技术相结合的方法, 该方法检测灵敏度高、特异选择性强、分析结果可靠, 目前被广泛用于瞬态自由基的检测[43]。

4. 结论与展望

综上所述, 线粒体是细胞氧化磷酸化的中心, 对细胞的生长发育以及组织器官的稳定至关重要。线粒体异常可引起细胞内环境紊乱, 并导致包括线粒体心脏病、线粒体脑病和线粒体肌病等多种疾病的发生。因此, 线粒体功能检测对我们理解疾病的发生发展机制至关重要。值得注意的是, 目前的检测和治疗策略并不能完全满足对线粒体疾病的临床诊治要求, 对线粒体的功能检测是研究者了解线粒体疾病的发生机制和开发新型治疗策略的重要手段。

基金项目

国家自然科学基金面上项目(81870414)。

参考文献

- [1] Kiriya, Y. and Nochi, H. (2017) Intra- and Intercellular Quality Control Mechanisms of Mitochondria. *Cells*, **7**, Article 1. <https://doi.org/10.3390/cells7010001>
- [2] Exner, N., Lutz, A.K., Haass, C. and Winklhofer, K.F. (2012) Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: Molecular Mechanisms and Pathophysiological Consequences. *The EMBO Journal*, **31**, 3038-3062. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.170>
- [3] Völgyi, K., Badics, K., Sialana, F.J., et al. (2018) Early Presymptomatic Changes in the Proteome of Mitochondria-Associated Membrane in the APP/PS1 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, **55**, 7839-7857. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-0955-6>
- [4] 申屠路媚, 牟艳玲. 线粒体功能障碍机制及其相关疾病研究进展[J]. 生命科学, 2018, 30(1): 87-93.
- [5] 肖义军, 俞如旺. 用高倍镜观察线粒体实验的建议[J]. 生物学教学, 2011, 36(2): 60.
- [6] Granata, C., Jammick, N.A. and Bishop, D.J. (2018) Training-Induced Changes in Mitochondrial Content and Respiratory Function in Human Skeletal Muscle. *Sports Medicine*, **48**, 1809-1828. <https://doi.org/10.1007/s40279-018-0936-y>
- [7] Hammond, K., Ryadnov, M.G. and Hoogenboom, B.W. (2021) Atomic Force Microscopy to Elucidate How Peptides Disrupt Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Biomembranes*, **1863**, Article ID: 183447. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2020.183447>
- [8] Heath, G.R., Kots, E., Robertson, J.L., et al. (2021) Localization Atomic Force Microscopy. *Nature*, **594**, 385-390. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03551-x>

- [9] Müller, D.J., Dumitru, A.C., Lo Giudice, C., *et al.* (2021) Atomic Force Microscopy-Based Force Spectroscopy and Multiparametric Imaging of Biomolecular and Cellular Systems. *Chemical Reviews*, **121**, 11701-11725. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00617>
- [10] Vogt, N. (2021) Atomic Force Microscopy in Super-Resolution. *Nature Methods*, **18**, 859. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01246-9>
- [11] Nikolaisen, J., Nilsson, L.I.H., Pettersen, I.K.N., *et al.* (2014) Automated Quantification and Integrative Analysis of 2D and 3D Mitochondrial Shape and Network Properties. *PLOS ONE*, **9**, e101365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101365>
- [12] Kolossov, V.L., Sivaguru, M., Huff, J., *et al.* (2018) Airyscan Super-Resolution Microscopy of Mitochondrial Morphology and Dynamics in Living Tumor Cells. *Microscopy Research and Technique*, **81**, 115-128. <https://doi.org/10.1002/jemt.22968>
- [13] Rocha, E.M., De Miranda, B. and Sanders, L.H. (2018) α -Synuclein: Pathology, Mitochondrial Dysfunction and Neuroinflammation in Parkinson's Disease. *Neurobiology of Disease*, **109**, 249-257. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.04.004>
- [14] Szymański, J., Janikiewicz, J., Michalska, B., *et al.* (2017) Interaction of Mitochondria with the Endoplasmic Reticulum and Plasma Membrane in Calcium Homeostasis, Lipid Trafficking and Mitochondrial Structure. *International Journal of Molecular Sciences*, **18**, Article 1576. <https://doi.org/10.3390/ijms18071576>
- [15] Bastian, C., Day, J., Politano, S., *et al.* (2019) Preserving Mitochondrial Structure and Motility Promotes Recovery of White Matter after Ischemia. *NeuroMolecular Medicine*, **21**, 484-492. <https://doi.org/10.1007/s12017-019-08550-w>
- [16] Csordás, G., Weaver, D. and Hajnóczky, G. (2018) Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions. *Trends in Cell Biology*, **28**, 523-540. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.009>
- [17] Correia-Álvarez, E., Keating, J.E., Glish, G., Tarran, R. and Sassano, M.F. (2020) Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Membrane Potential, and Cellular Membrane Potential Are Predictors of E-Liquid Induced Cellular Toxicity. *Nicotine & Tobacco Research*, **22**, S4-S13. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntaa177>
- [18] Feng, R., Guo, L., Fang, J., *et al.* (2019) Construction of the FRET Pairs for the Visualization of Mitochondria Membrane Potential in Dual Emission Colors. *Analytical Chemistry*, **91**, 3704-3709. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05822>
- [19] Wang, C., Wang, G., Li, X., *et al.* (2017) Highly Sensitive Fluorescence Molecular Switch for the Ratio Monitoring of Trace Change of Mitochondrial Membrane Potential. *Analytical Chemistry*, **89**, 11514-11519. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02781>
- [20] Rossow, H.A., Acetoze, G., Champagne, J., *et al.* (2018) Measuring Liver Mitochondrial Oxygen Consumption and Proton Leak Kinetics to Estimate Mitochondrial Respiration in Holstein Dairy Cattle. *Journal of visualized experiments*, **141**. <https://doi.org/10.3791/58387>
- [21] Zhang, H., Chang, Z., Mehmood, K., *et al.* (2018) Nano Copper Induces Apoptosis in PK-15 Cells via a Mitochondria-Mediated Pathway. *Biological Trace Element Research*, **181**, 62-70. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1024-0>
- [22] Marchi, S., Patergnani, S., Missiroli, S., *et al.* (2018) Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Calcium Homeostasis and Cell Death. *Cell Calcium*, **69**, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.003>
- [23] Boyman, L., Karbowski, M. and Lederer, W.J. (2020) Regulation of Mitochondrial ATP Production: Ca^{2+} Signaling and Quality Control. *Trends in Molecular Medicine*, **26**, 21-39. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.10.007>
- [24] Wacquier, B., Combettes, L. and Dupont, G. (2020) Dual Dynamics of Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening. *Scientific Reports*, **10**, Article No. 3924. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60177-1>
- [25] 程明月, 郭海, 郑宏. 糖尿病心肌中线粒体膜通透性转化孔变化的研究进展[J]. 新医学, 2016, 47(2): 73-75.
- [26] Morciano, G., Naumova, N., Koprowski, P., *et al.* (2021) The Mitochondrial Permeability Transition Pore: An Evolving Concept Critical for Cell Life and Death. *Biological Reviews*, **96**, 2489-2521. <https://doi.org/10.1111/brv.12764>
- [27] Lee, P., Chandel, N.S. and Simon, M.C. (2020) Cellular Adaptation to Hypoxia through Hypoxia Inducible Factors and Beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **21**, 268-283. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0227-y>
- [28] 张鑫, 黎萍, 王钰涵, 等. 血管性痴呆认知功能障碍与海马线粒体功能异常的机制研究进展[J]. 中国全科医学, 2022, 25(23): 2910-2916.
- [29] Schönfeld, P. and Wojtczak, L. (2016) Short- and Medium-Chain Fatty Acids in Energy Metabolism: The Cellular Perspective. *Journal of Lipid Research*, **57**, 943-954. <https://doi.org/10.1194/jlr.R067629>
- [30] Mcfarlane, C.R. and Murray, J.W. (2020) A Sensitive Coupled Enzyme Assay for Measuring Kinase and ATPase Kinetics Using ADP-Specific Hexokinase. *Bio-Protocol Journal*, **10**, e3599. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3599>
- [31] Tan, K.Y., Li, C.Y., Li, Y.F., *et al.* (2017) Real-Time Monitoring ATP in Mitochondrion of Living Cells: A Specific

- Fluorescent Probe for ATP by Dual Recognition Sites. *Analytical Chemistry*, **89**, 1749-1756. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04020>
- [32] De Col, V., Fuchs, P., Nietzel, T., *et al.* (2017) ATP Sensing in Living Plant Cells Reveals Tissue Gradients and Stress Dynamics of Energy Physiology. *eLife*, **6**, e26770. <https://doi.org/10.7554/eLife.26770>
- [33] Klier, P.E.Z., Martin, J.G. and Miller, E.W. (2021) Imaging Reversible Mitochondrial Membrane Potential Dynamics with a Masked Rhodamine Voltage Reporter. *Journal of the American Chemical Society*, **143**, 4095-4099. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c13110>
- [34] Mita, M., Sugawara, I., Harada, K., *et al.* (2022) Development of Red Genetically Encoded Biosensor for visualization of Intracellular Glucose Dynamics. *Cell Chemical Biology*, **29**, 98-108.E4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.06.002>
- [35] Murata, O., Shindo, Y., Ikeda, Y., *et al.* (2020) Near-Infrared Fluorescent Probes for Imaging of Intracellular Mg²⁺ and Application to Multi-Color Imaging of Mg²⁺, ATP, and Mitochondrial Membrane Potential. *Analytical Chemistry*, **92**, 966-974. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03872>
- [36] Arai, S., Kriszt, R., Harada, K., *et al.* (2018) RGB-Color Intensiometric Indicators to Visualize Spatiotemporal Dynamics of ATP in Single Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, **57**, 10873-10878. <https://doi.org/10.1002/anie.201804304>
- [37] Formosa, L.E., Dibley, M.G., Stroud, D.A. and Ryan, M.T. (2018) Building a Complex Complex: Assembly of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **76**, 154-162. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.011>
- [38] Vankayala, R. and Hwang, K.C. (2018) Near-Infrared-Light-Activatable Nanomaterial-Mediated Phototheranostic Nanomedicines: An Emerging Paradigm for Cancer Treatment. *Advanced Materials*, **30**, e1706320. <https://doi.org/10.1002/adma.201706320>
- [39] Wang, S., Zhang, Z., Wei, S., *et al.* (2021) Near-Infrared Light-Controllable MXene Hydrogel for Tunable on-Demand Release of Therapeutic Proteins. *Acta Biomaterialia*, **130**, 138-148. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.027>
- [40] Bock, F.J. and Tait, S.W.G. (2020) Mitochondria as Multifaceted Regulators of Cell Death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **21**, 85-100. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>
- [41] Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N.V., Zucca, P., *et al.* (2020) Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, **11**, Article 694. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>
- [42] Caliskan, S., Oldenhof, H., Brogna, R., *et al.* (2021) Spectroscopic Assessment of Oxidative Damage in Biomolecules and Tissues. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **246**, Article ID: 119003. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119003>
- [43] 王翠平, 姚梦宇, 叶柳, 等. 电子自旋共振技术在生物领域的应用进展[J]. 大学物理实验, 2020, 33(1): 29-33.