

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱：探討殺蟲劑陶斯松對小鼠內皮細胞的毒性與氧化壓力之相關機制研究

報告類別：成果報告
執行計畫學生：桑郁慶
學生計畫編號：MOST 110-2813-C-040-062-B
研究期間：110年07月01日至111年02月28日止，計8個月
指導教授：李宣信

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學公共衛生學系（所）

中華民國 111年03月25日

研究計畫內容

題目：探討殺蟲劑陶斯松對小鼠內皮細胞的毒性與氧化壓力之相關機制研究

(一)摘要

陶斯松 (Chlorpyrifos, CPF) 為一種晶體有機磷殺蟲劑，於全球廣泛使用，在農業上用來控制蟲害，而在環境上用來防治蟑螂、跳蚤和白蟻。CPF 會導致人體多項傷害，其作用機制為抑制乙醯膽鹼此種酵素之活性，使其無法正常傳訊而導致神經系統異常。已有多項研究指出 CPF 會誘發人胚胎腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney Cells 293)、睪丸細胞等產生細胞毒性，而至今為止，仍未有研究探討 CPF 誘導血管內皮細胞產生之細胞毒性機制及氧化壓力。本研究將使用小鼠血管內皮細胞 (SVEC4-10 cells)，經由陶斯松 (CPF) 的作用下，探討其誘導的細胞毒性與氧化壓力之相關機制。經初步研究顯示，CPF 會誘導 SVEC4-10 cells 產生細胞毒性、細胞凋亡及增加其氧化壓力。本研究計畫試驗目標主要包含 (1) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 產生細胞毒性、基因毒性。(2) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 造成細胞凋亡。(3) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 的粒線體之完整性與 ROS 生成。(4) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 產生氧化壓力。

(二)研究動機與研究問題

有機磷化合物指含有碳-磷鍵的有機化合物，其基本結構為磷酸，與磷原子相連的氧 (O)、硫 (S)、碳 (C) 及氮 (N) 產生不同的組合。陶斯松 (CPF) 在全球被廣泛使用在農業及居家環境，主要用來當作殺蟲劑使用。在許多研究中已經證實陶斯松 (CPF) 會抑制乙醯膽鹼並造成神經上的中毒，更可透過影響體內其他生理機制而導致細胞異常，進而導致相關疾病或死亡。本次利用小鼠內皮細胞 (SVEC4-10 cells) 進行實驗，因為其基因組成、生物行為特徵與人類相似，且物種間的基因一致，因此選用小鼠內皮細胞 (SVEC4-10 cells) 以探討在陶斯松 (CPF) 對小鼠內皮細胞 (SVEC4-10 cells) 的毒性與氧化壓力之相關機制。本研究證實：

- (1) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 產生細胞毒性。
- (2) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 造成細胞凋亡。
- (3) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 的粒線體之完整性與 ROS 生成。
- (4) CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 產生氧化壓力。

(三)文獻回顧與探討

3-1.陶斯松 (Chlorpyrifos, CPF) 的相關介紹

陶斯松 (O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate) 為一種無色晶體有機磷殺蟲劑，於全球廣泛使用，在農業上用來控制病蟲害，而在環境上用來防治蟑螂、跳蚤和白蟻等害蟲。主要透過人類或動物接觸、吸入或食入引起嚴重的神經中毒，中毒時，會有痰多、流汗、腹痛、腹瀉、視力模糊、瞳孔縮小、心跳過慢、肌肉無力或呼吸麻痺等症狀，最終可能導致死亡。其作用機制為抑制

乙醯膽鹼之活性，使其無法正常傳訊而導致神經系統異常。除此之外，CPF 會提高細胞活性氧 (ROS) 的產生、降低抗氧化酶、過氧化氫酶 (Catalase) 的活性及基因的表現量，文獻指出會降低血管內皮生長因子的受體、缺氧誘導因子 1-alpha (HIF1- α)、過氧化物酶體增植物活化受體 γ 、人絨毛膜促性腺激素 (hCG) 的 β 次單元的基因表現量 [1]。另有文獻指出 CPF 會改變最內層為內皮細胞的血腦屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB) 的電位和酯解酶 (esterase)，進而使 BBB 之功能異常 [2]。

3-2.細胞凋亡相關介紹

細胞凋亡 (apoptosis)，是一種細胞程序性死亡，為細胞透過基因調控主動進行的反應，過程為不可逆。在凋亡過程，細胞膜會產生小泡 (Blebbing)，接著會進行核碎裂 (Karyorrhexis)，最後細胞會分裂成好幾個細胞膜包裹起來的空間，稱為凋亡小體 (Apoptotic Body)，其胞器仍具完整性，而後被巨噬細胞所清除。細胞凋亡的途徑有兩種，分為外在途徑 (Extrinsic pathway) 及內在途徑 (Intrinsic pathway)，外在途徑是當死亡配體 (Death ligand) 和特定死亡受器 (Death receptor) 結合之後，形成死亡誘導信號複合物 (Death-inducing signaling complex, DISC)，接著會活化半胱天冬酶 (Caspases) 引發細胞凋亡。而內在途徑為涉及各種各樣的非受體介導的刺激，受刺激的粒線體會釋出細胞色素 c (cytochrome c) 等蛋白，而細胞色素 c 會和凋亡蛋白酶活化因子 1 (Apoptotic protease activating factor 1, Apaf-1) 以及 Procaspase9 形成凋亡小體，接著活化 caspase-9 並進行細胞凋亡。粒線體的凋亡是通過 Bcl-2 蛋白所調控的，其又可分為促凋亡蛋白及抗凋亡蛋白，利用改變粒線體膜的通透性以調控細胞凋亡機制 [3-4]。

3-3.活性氧物質 (Reactive oxygen species, ROS) 的相關介紹

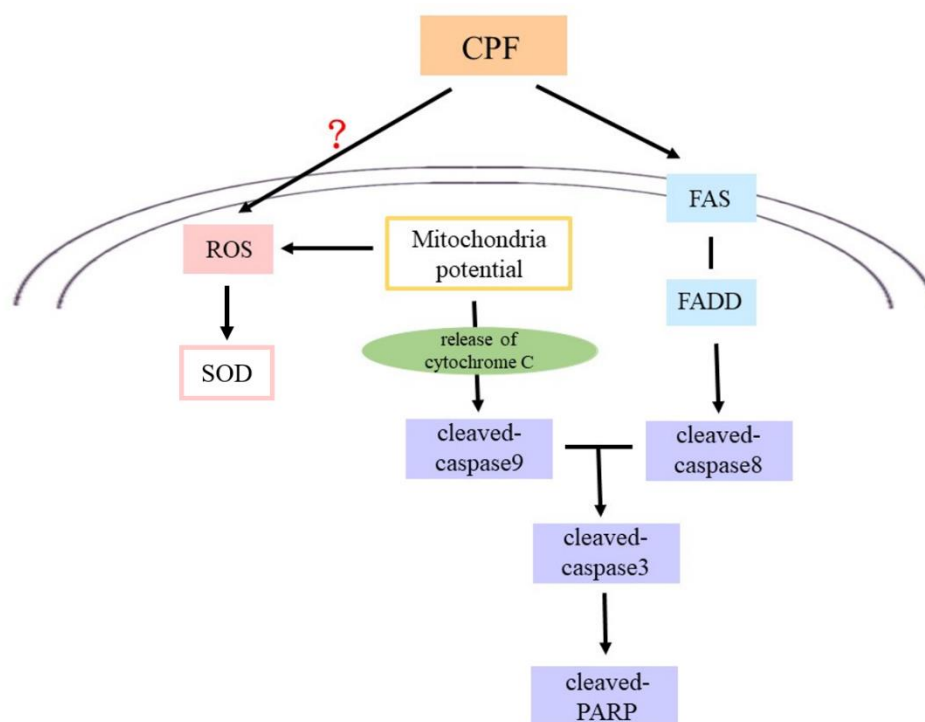
活性氧化物 (ROS) 為一種含氧的不穩定分子，是生物有氧代謝過程的一種副產物，包括超氧化物陰離子 (O_2^-)、氫氧自由基 (OH^\cdot)、過氧化氫 (H_2O_2)、單態氧 (1O_2)。在生物體內主要由粒線體電子傳遞鏈產生。其透過氧化性的破壞或細胞凋亡促進巨噬細胞毒殺，也當作分子的信號參與細胞內各種途徑 [5]，而 ROS 的增加會導致粒線體膜電位的喪失，而釋放一些調控凋亡的蛋白質，包括細胞色素 c，半胱天冬酶原等 [6]。文獻指出一旦 NADPH 氧化酶 (NOXs) 被活化，將會造成 ROS 的增加，可能會誘發生物體心血管、腎臟及胃腸道之相關疾病 [7-9]。

(四)研究方法及步驟

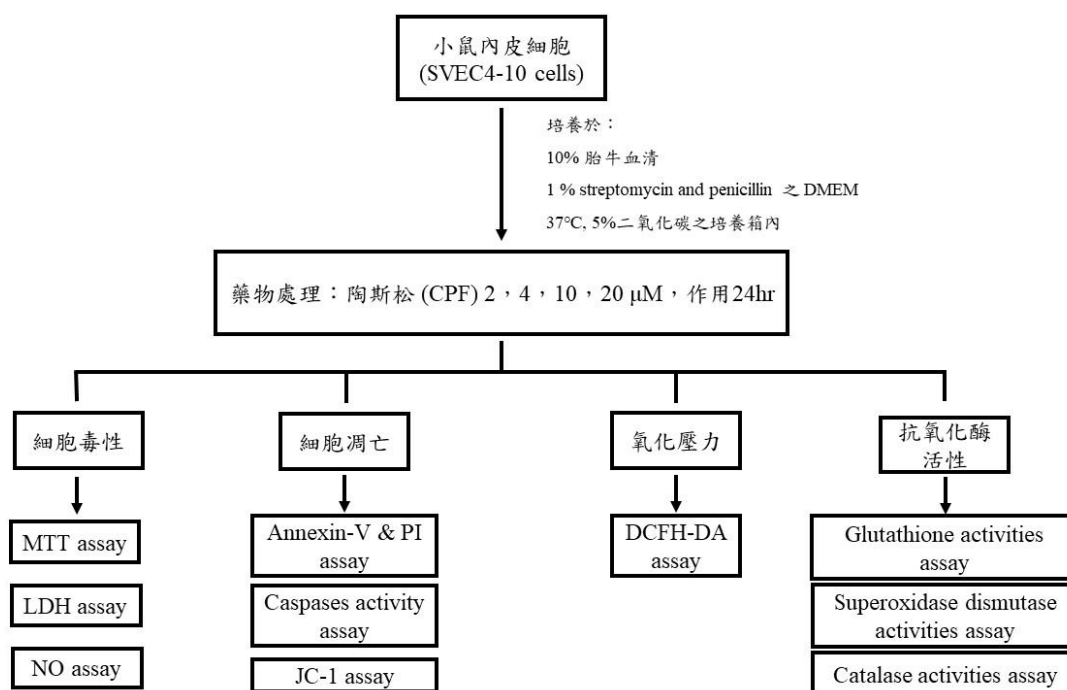
4-1.研究設計

陶斯松 (CPF) 會對神經細胞及內皮細胞造成細胞毒性，誘導細胞凋亡，氧化壓力的升高，產生過量 ROS，另外，亦會破壞粒線體的完整性。內皮細胞為組成生物體內之各血管，若損傷將可能造成生物體內的危害，故本研究使用小鼠內皮細胞 (SVEC4-10 cells) 以探討 CPF 對小鼠內皮細胞 (SVEC4-10 cells) 的毒性與氧化壓力之相關機制。

4-2.研究架構如下圖：



4-3.研究流程如下圖：



4-4.研究目標如下：

4-4.1.CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 產生細胞毒性。

利用細胞存活分析法及乳酸脫氫酶檢測法測定在不同濃度的 CPF 誘發 SVEC4-10 cells 之存活率及死亡率。

4-4.2.CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 造成細胞凋亡。

細胞為了維持有機體內環境穩定，透過基因控制細胞自主之程序性死亡，進而誘發氧化性的破壞及細胞凋亡。研究利用 Annexin-V&Propidium iodide assay 測定在不同濃度的 CPF 誘發 SVEC4-10 cells 之細胞凋亡。

當細胞受到刺激時，會使 Caspase 的表現量受到改變，進而導致細胞凋亡。利用 Caspase-3-8-9 活性試驗測定 SVEC4-10 cells 暴露在不同濃度的 CPF 中，所引發的 Caspase 的表現。當細胞接收到凋亡訊號時，會活化 Caspase 造成細胞凋亡。經由 Caspase-8 及 Caspase-9 等調控外在路徑 (extrinsic pathway)、內在路徑 (intrinsic pathway)，最終造成 Caspase-3 的活化。

4-4.3.CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 的粒線體之完整性與 ROS 生成。

當 SVEC4-10 cells 受到 CPF 的刺激時，會造成 ROS 的增加，進而促進氧化性的破壞或細胞凋亡。本研究利用 DCFH-DA 分析法。

粒線體完整性若受到破壞，會使粒線體膜電位產生改變，JC-1 具有粒線體膜電位改變時，會改變自己的型態而產生不同的顏色螢光的特性，當粒線體膜電位較高時，JC-1 就會聚集在粒線體的內膜，此時會偵測到紅色螢光；一旦粒線體膜電位產生漏失時，JC-1 便會在粒線體的內膜形成單體 (monomer)，此時會偵測到綠色螢光。

4-4.4.CPF 是否誘導 SVEC4-10 cells 產生氧化壓力。

氧化壓力為氧化劑和抗氧化劑之間的不平衡，干擾氧化還原間的信號傳遞及破壞分子間的作用，產生過氧化物及自由基誘導細胞毒性。當細胞受到傷害，會啟動自身的抗氧化機制，利用抗氧化酶 (Glutathione、Superoxidase dismutase 及 Catalase) 去除細胞中的 O、H₂O₂ 和過氧化物。其存在於細胞各處，並與其他蛋白質產生協同作用，以完全清除 O、H₂O₂ 和過氧化物並可恢復減少的蛋白質及脂質。[10-11]

4-5.實驗步驟

4-5.1.細胞培養

小鼠血管內皮細胞 (SVEC4-10 cells) 於 ATCC 購得。細胞培養於含 10% 胎牛血清與 1% streptomycin and penicillin 之 DMEM 培養基，於 37°C, 5% 二氧化碳之培養箱內培養。

4-5.2.藥物處理流程

將合適數量的 SVEC4-10 cells 培養於 6 well 或 24 well 中，加入 0.5% FBS 的二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 後，分別加入 2, 4, 10, 20 μM 的 CPF 於各個 well 中並放置培養箱等待 24 小時。

4-5.3.細胞存活分析 (MTT assay)

利用活細胞體中的琥珀酸脫氫酶 (succinate dehydrogenase) 將 tetrazolium 還原成藍色的 formazan 結晶，藉由測量吸光值得知細胞還原 MTT 的能力，可用來評估在某種藥物下細胞的生長情形，進而作為細胞存活率的指標。

待藥物處理時間結束，清除上清液並以 PBS 清洗一次，加入 1000 μ l MTT，置入培養箱 2 小時後取出，再加入 500 μ l DMSO 將藍色結晶溶解，利用 microplate reader 以 570nm 測吸光值，以對照組的吸光值為 100%，實驗組與對照組的比值即為相對的細胞存活率。

4-5.4.細胞死亡率分析 (LDH assay , NO assay)

當細胞膜破損時，原本存在於細胞質內的乳酸脫氫酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 即會被釋放至細胞培養液中。加入可與 LDH 反應形成水溶性紅色結晶物質的呈色試劑，即可測得細胞的死亡率。

NO assay 利用 Griess reagent 與 NO 形成的穩定亞硝酸鹽 (Nitrite) 作用，Nitrite 濃度的分析測定是利用和 Griess reagent(4% sulfanilic acid and 0.2% naphthylenediamide in 10% phosphoric acid) 反應，所生成的顏色變化，在 550nm 下測定吸光值，對照吸光值-濃度標準曲線後，即可得到 NO₂ 在組織培養液中的含量。

4-5.5.細胞凋亡與細胞壞死測定 (Annexin-V&Propidium iodide assay)

待藥物處理後，用 PBS 清洗細胞，收下細胞，裝入 1.5ml 離心管中。離心後去除上清液，加入 100 μ l Annexin-V Binding Buffer 後，再加入 Annexin-V 及 Propidium iodide (PI) 各 2 μ l，置於室溫 1 小時，移除上清液後加入 500 μ l 的 PBS，以流式細胞儀 (Flow Cytometry) 上機測試，並利用 BD flow Cytometer 軟體分析細胞凋亡及細胞壞死的細胞數。

4-5.6.Caspases 活性測定

待藥物處理時間結束後，用 PBS 清洗，收下細胞，裝入 1.5ml 離心管中，加入 50 μ l lysis buffer，置於冰上 10 分鐘。加入 50 μ l 含 1% DTT 的 2X reaction buffer，加入 5 μ l substrate，置於 37°C 培養箱 1 至 2 小時。在黑盤 96 well 內加入每格 100 μ l 的細胞懸浮液，利用 Microplate reader 以激發光螢光波長 400nm 及發射光螢光波長 505nm 讀取並分析結果。

4-5.7.活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS) 測定

加入具有細胞膜穿透性的 DCFH-DA(2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)，細胞內酯解酶會在兩個酯解鍵上切割 DCFH-DA，並產生相對極性和細胞不可滲透的產物 H₂DCF，此種非螢光分子累積在細胞內，接著在水解下產生綠色螢光的 DCF[12]，以測定細胞內 ROS 的含量。

將細胞種於 6 well 中，藥物時間結束前一小時，加入 1 μ l 的 DCFH-DA，時間結束後，以 PBS 清洗細胞 1 次，加入 1 μ l 冰 PBS 收下細胞，最後利用流式細胞儀 (Flow Cytometry) 上機測試，使用 BD Accuri C6 Software 進行分析。

4-5.8.細胞內粒線體膜電位分析 (JC-1 assay)

種細胞於 6 well 中，藥物時間結束前 30 分鐘，加入 1.5 μ l JC-1(1mg/ml)。時間結束後，以 PBS 清洗細胞，加入 1ml 的冰 PBS 收下細胞，以流式細胞儀 (Flow Cytometry) 上機測試，使用 BD Accuri C6 Software 進行分析。

4-5.9. 穀胱甘肽活性測定 (Glutathione activities assay)

穀胱甘肽是抗氧化系統中的一部份，會將過氧化氫還原成水，降低過氧化氫帶來的氧化壓力。待藥物處理時間結束後，以 PBS 收下細胞，使用細胞均質機均質化，每 well 加入 50 μ l 細胞均質液及 150 μ l freshly-prepares Reaction Mix，使用 Microplate reader 以吸光值 405nm 及 414nm 測量結果。

4-5.10. 超氧化物歧化酶活性測定 (Superoxidase dismutase activities assay, SOD)

待藥物處理時間結束後，收下細胞於 1.5ml 離心管中，使用細胞均質機將細胞均質化後以 4 $^{\circ}$ C，2000rpm 離心 5 分鐘，留取上清液。將 200 μ l Redical Detector 加入 96well 中，再加入 10 μ l Sample 以及 20 μ l 的 Xanthine Oxidase，室溫搖晃 30 分鐘，使用 Microplate reader 以吸收光 440-460nm 進行讀測。

4-5.11. 過氧化氫酶活性測定 (Catalase activities assay)

過氧化氫酶透過還原反應，將過氧化氫還原成水以及氧氣以達到降低氧化壓力的作用。

待藥物處理時間結束後，以 PBS 收下細胞，使用細胞均質機均質化，每 well 依序加入 100 μ l 1X Assay Buffer、20 μ l Methanol、20 μ l 細胞均質液以及 20 μ l Hydrogen Peroxide，室溫避光 20 分鐘，再依序加入 30 μ l Potassium Hydroxide (中止反應)及 30 μ l Catalase Purpald (呈色反應)，室溫避光 10 分鐘，最後加入 10 μ l Catalase Potassium Periodate 中止呈色反應，使用 Microplate reader 以吸光值 540nm 測量結果。

4-5.12. 統計方法

實驗數據以 Mean \pm standard deviation(SD) 表示，統計以 one-way ANOVA 進行分析，並以 Bonferroni's-test 事後檢定比較各組差異，分析結果若 p 小於 0.05，視為具有統計顯著意義。

(五) 結果

5-1. CPF 誘導 SVEC4-10 cells 產生細胞毒性。

利用細胞存活分析法 (Fig1.A) 及乳酸脫氫酶檢測法 (Fig1.B) 發現隨著 CPF 的濃度增加，細胞存活率下降，且達統計顯著。而依據乳酸脫氫酶法發現 CPF 僅在濃度為 20 μ M 時細胞死亡率達統計顯著，但仍可證實 CPF 會誘導 SVEC4-10 cells 產生細胞毒性。

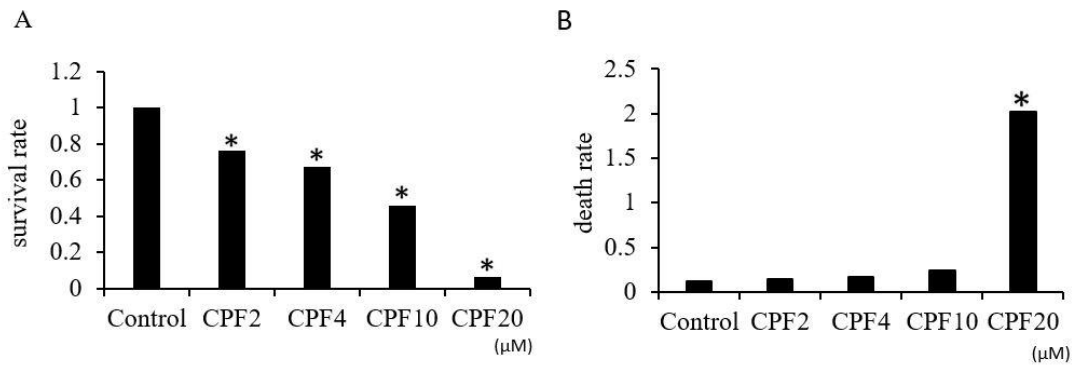
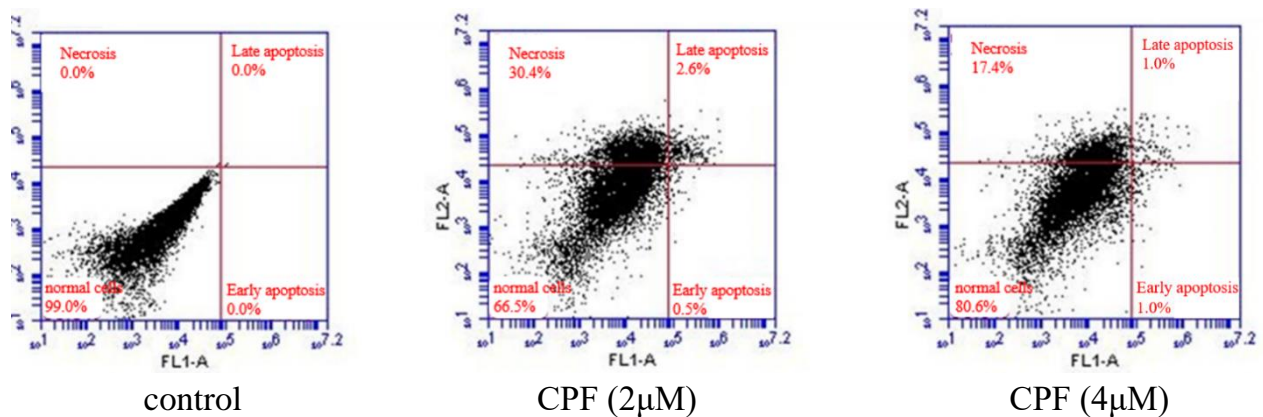


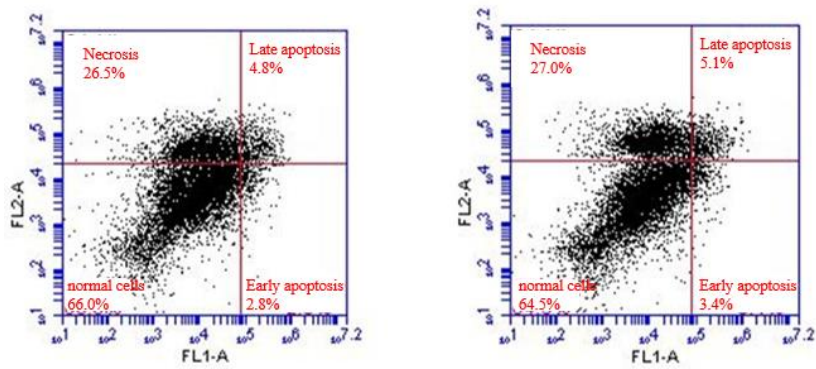
Fig1. (A)SVEC4-10 cells 在 24 小時不同濃度的 CPF 下的存活率，並且表示 CPF 能增加對 SVEC4-10 cells 產生的細胞毒性。(B) 透過乳酸脫氫酶測定法來檢測 SVEC4-10 cells 在 24 小時不同濃度的 CPF 下的死亡率，發現 CPF 能誘發細胞毒性。

5-2.CPF 誘導 SVEC4-10 cells 造成細胞凋亡。

利用 Annexin-V&Propidium iodide assay(Fig2.) 測定發現隨著 CPF 的濃度增加，細胞凋亡數量增加，進而誘發細胞凋亡。

利用 Caspase-3-8-9 活性試驗 (Fig3.) 測定 SVEC4-10 cells 暴露在不同濃度的 CPF 中，所引發的 Caspase 的表現。當細胞接收到凋亡訊號時，會活化 Caspase 造成細胞凋亡。經由 Caspase-8(Fig3. B) 及 Caspase-9(Fig3.C) 等调控外在路徑 (extrinsic pathway)、內在路徑 (intrinsic pathway)，最終造成 Caspase-3(Fig3.A) 的活化。經由測定 Caspases 活性實驗之結果，發現實驗達統計顯著，因此當細胞接收到細胞凋亡訊號時，會導致 Caspase 的表現上升。





CPF (10 μ M)

CPF (20 μ M)

Fig 2. 顯示 CPF 會誘導 SVEC4-10 cells 產生細胞凋亡。

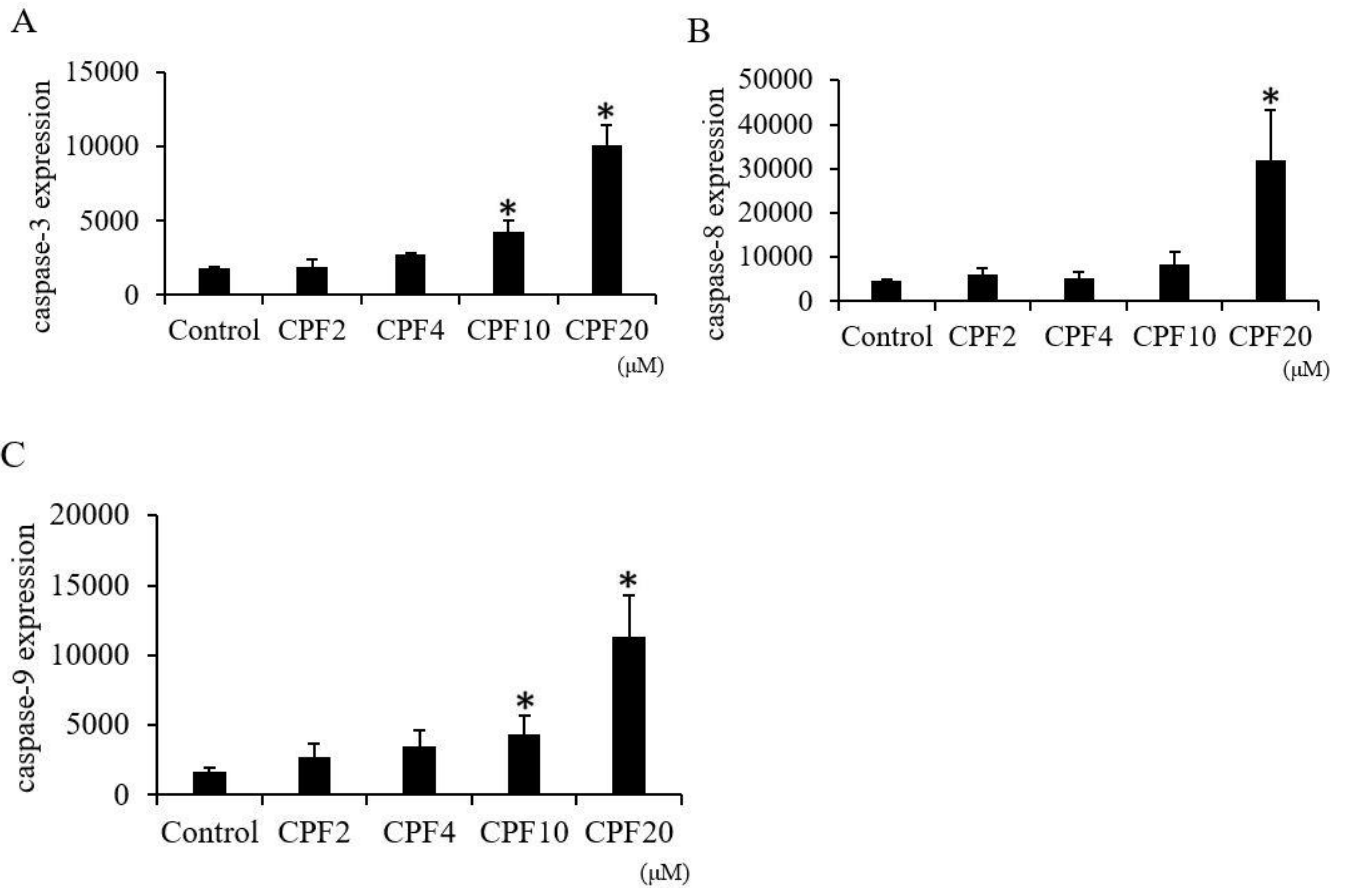


Fig3. 顯示 CPF 會促使 Caspase-3-8-9 的產生，誘導 SVEC4-10 cells 造成細胞凋亡。細胞凋亡起始訊號由上游的 (B)Caspase-8 及 (C)Caspase-9 活化下游的 (A)Caspase-3。

5-3.CPF 誘導 SVEC4-10 cells 的粒線體之完整性與 ROS 生成。

利用 DCFH-DA 分析法 (Fig4.) 發現 CPF 在濃度為 20 μ M 會誘發 ROS 的生成。

利用細胞內粒線體膜電位分析 (Fig5.) 顯示 CPF 在 10 μ M 達統計顯著，會誘

導 SVEC4-10 cells 的粒線體膜電位之改變及破壞粒線體之完整性。

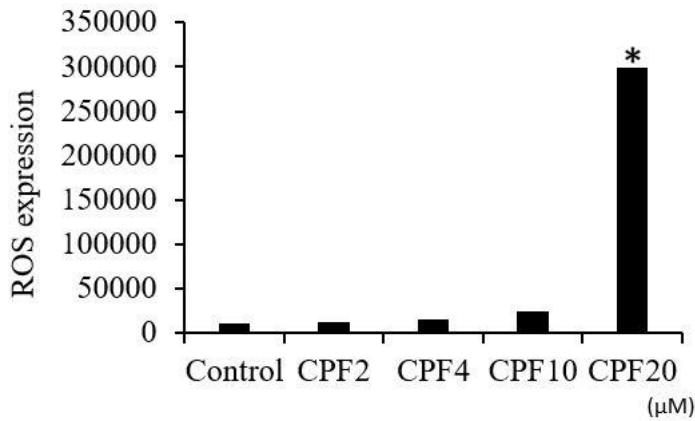


Fig4. 顯示 CPF 在濃度為 20μM 會誘發 ROS 的生成。

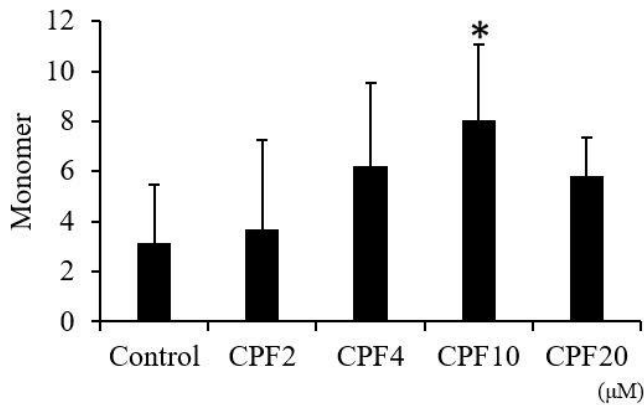


Fig5. 顯示 CPF 在 10μM 達統計顯著，誘導 SVEC 4-10 cells 的粒線體膜電位改變及破壞粒線體之完整性。

5-4.CPF 誘導 SVEC4-10 cells 產生氧化壓力。

穀胱甘肽活性測定 (Glutathione activities assay) (Fig6.A) 顯示 CPF 在 20μM 達統計顯著、超氧化物歧化酶活性測定 (Superoxidase dismutase activities assay, SOD) (Fig6.B) 顯示 CPF 具有劑量依存性，且達統計顯著、過氧化氫酶活性測定 (Catalase activities assay) (Fig6.C) 顯示 CPF 在 20μM 達統計顯著。綜合以上，發現 CPF 誘發 SVEC4-10 cells 的氧化壓力，降低抗氧化酶的活性。

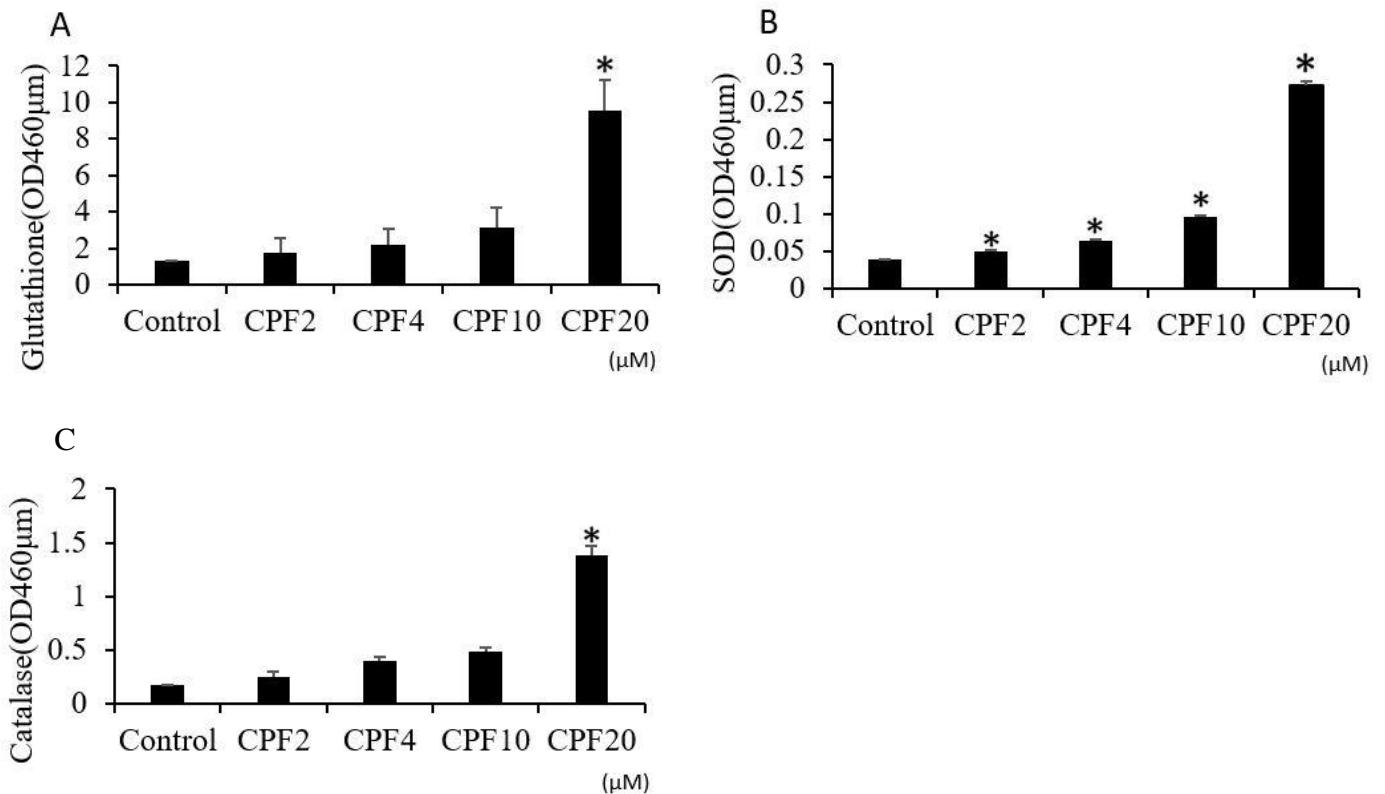


Fig6. 使用 (A) 穀胱甘肽活性測定 (Glutathione activities assay)、(B) 超氧化物歧化酶活性測定 (Superoxidase dismutase activities assay, SOD)、(C) 過氧化氫酶活性測定 (Catalase activities assay) 顯示 CPF 會降低 SVEC4-10 cells 抗氧化酶的活性，達統計顯著。

(六) 討論與結論

透過本次研究結果，隨著 CPF 的濃度增加，誘導細胞產生毒性，且細胞存活率的下降，死亡的細胞數量增加，導致細胞凋亡。細胞凋亡主要分成外途徑及內途徑，外途徑是經由一些可傳遞凋亡訊號的細胞膜蛋白，如 FAS，經由連接銜接蛋白如 FADD 與 Caspase-8 連接，進而釋放細胞凋亡的訊號。內途徑主要與細胞內之粒線體相關，粒線體為細胞內進行氧化還原的重要器官，主要透過 SOD 以去除體內的過多的活性氧自由基，當細胞受到 CPF 的刺激後，促進 ROS 的生成，造成氧化壓力的上升，而過多的 ROS 會破壞粒線體的完整性，其內質網收到凋亡訊號時將釋放能造成細胞凋亡的前驅物質如 cytochrome C，接著與 Caspase-9 組成凋亡體。Caspase-8 及 Caspase-9 為造成細胞凋亡的上游因子，從上游的 Caspase-8 及 Caspase-9 活化下游 Caspase-3，而 Caspase-3 亦會透過正回饋活化上游，透過不斷的循環，進而影響細胞內進行修復的重要蛋白 PARP，因此本研究測定 Caspase-3-8-9，並發現 CPF 會活化 SVEC4-10 cells 內之 Caspase 的活性。綜合上述可知 CPF 會造成 SVEC4-10 cells 細胞毒性、提高氧化壓力、降低抗氧化酶活性，並促使細胞的凋亡。

由此可知 CPF 對於小鼠內皮細胞具有一定的傷害，且目前也已有多項研究證實暴露於 CPF 可能導致疾病的發生，CPF 廣泛運用於農作物上，與人類之

生活息息相關，因此應儘量避免使用 CPF，若一定要使用則需適量，並對於人體的傷害降到最低。

期望未來透過本計畫結果，更進一步探討 CPF 對 SVEC4-10 cells 所誘發細胞毒性及基因毒性之相關分子路徑、發炎反應之相關分子 (如:環氧化酶 (Cyclooxygenase,COX)、腫瘤壞死因子- α (TNF- α)、核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子,NF κ B 等等)以及 mRNA 表現，以更了解 CPF 對細胞所造成的影響。

(六)參考文獻

1. Magali E Ridano, Ana C Racca, J sica B Flores-Martín, Luciana Reyna, Susana Genti-Raimondi, Graciela M Panzetta-Dutari. Effect of Chlorpyrifos on human extravillous-like trophoblast cells. *Reproductive Toxicology*. 2019 Dec;90:118-125.
2. Damani K. Parran, Geraldine Magnin, Wen Li, Bernard S. Jortner, Marion Ehrich. Chlorpyrifos Alters Functional Integrity and Structure of an In Vitro BBB Model: Co-cultures of Bovine Endothelial Cells and Neonatal Rat Astrocytes. *Neurotoxicology*. 2005 Jan;26(1):77-88.
3. Susan Elmore. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun;35(4):495-516.
4. Mark S D'Arcy. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592.
5. Shenshu Yang, Gaojian Lian. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Mol Cell Biochem*. 2020 Apr;467(1-2):1-12.
6. Jeong Eun Lee, Mi Sun Lim, Jae Hyeon Park, Chang Hwan Park, Hyun Chul Koh. Nuclear NF- κ B contributes to chlorpyrifos-induced apoptosis through p53 signaling in human neural precursor cells. *Neurotoxicology*. 2014 May;42:58-70.
7. Tao Xu, Wei Ding, Xiaoyu Ji, Xiang Ao, Ying Liu, Wanpeng Yu, Jianxun Wang. Oxidative Stress in Cell Death and Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Nov 4;2019:9030563.
8. Brian B Ratliff, Wasan Abdulmahdi, Rahul Pawar, Michael S Wolin. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016 Jul 20;25(3):119-46.
9. Gabriella Aviello, Ulla G Knaus. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. *Mucosal Immunol*. 2018 Jul;11(4):1011-1023.
10. Helmut Sies. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Redox Biol*. 2015;4:180-3. doi: 10.1016.
11. G Filomeni, D De Zio, F Cecconi. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ*. 2015 Mar;22(3):377-88. doi: 10.1038.
12. Evgeniy Eruslanov, Sergei Kusmartsev. Identification of ROS Using Oxidized

DCFDA and Flow-Cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010;594:57-72.