doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.20.003

TLR4-Nrf2/HO-1 信号通路在小鼠机械通气所致肺损伤的作用研究 *

李艳艳 潘频华△ 苏晓丽 胡成平 刘 帅
李海涛 黎皓思 李 毅 戴敏慧 毛 志 李 千
（中南大学湘雅医院呼吸危重症医学科 湖南 长沙 410008）

摘要 目的：机械通气作为一重要措施，拯救呼吸衰竭患者的生命，有致肺血管炎症及渗透增加等病变的可能，即 VILI。本研究旨在明确 VILI 是否受潮气量、Toll 样受体 4（Toll-like receptor-4,TLR4）基因敲除及核因子 -E2 相关受体 2/ 血红素氧化酶 -1(Nuclear factor-erythroid 2 related factor2/heme oxygenase 1，Nrf2/HO-1)表达的激活关联是否存在。**方法：**TLR4 基因缺失和野生型（WT)小鼠分别分为对照（CON)，低潮气量（low tidal volume，LTV)和高潮气量（high tidal volume，HTV)组。给小鼠禁食、禁水 12 小时后，麻醉小鼠，做气管切开，将气管导管经口插入，通气 4 小时，呼气末正压（PEEP)2 cm H_2O，R：100 次 / 分钟，吸呼比 1：2；CON 组仅气管插管。小鼠处死，测湿 / 干重比（W/D)。肺组织依次：HE 染色组织学评价；评价肺损伤评分；测定肺炎症因子表达：肿瘤坏死因子 -α(tumor necrosis factor-α，TNF-α) 及白介素 -1β(interleukin-1β，IL-1β)；免疫组化及免疫印迹法，测 Nrf2 蛋白值；测 HO-1 蛋白值。**结果：**在 WT+HTV 组，Nrf2 和 HO-1 的表达比较 WT+LTV 组明显升高，但受到 TLR4 基因敲除的调节，相应的 TLR4 基因敲除组升高更明显。肺损伤评分、湿 / 干比在 WT+HTV 组增加，相应的 TLR4 基因敲除组升高更显著。**结论：**HTV 通气可致小鼠 VILI。VILI 小鼠肺中的 Nrf2/HO-1 表达升高，TLR4 基因缺失可以升高 Nrf2/HO-1 表达，保护肺组织，减轻 VILI。

关键词：Toll 样受体 4；核因子 -E2 相关受体 2；血红素氧化酶 -1；机械通气相关肺损伤
中图分类号：R-33; R563.8 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2018)20-3812-05

TLR4 - Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in Ventilator-induced Lung Injury in Mice*

LI Yan-yan, PAN Pin-hua△, SU Xiao-li, HU Cheng-ping, LIU Shuai, LI Hai-tao, LI Hao-si, LI Yi, DAI Min-hui, MAO Zhi, LI Qian
(Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan, 410008, China)

ABSTRACT Objective: Mechanical ventilation is a life-saving procedure for patients with acute respiratory failure, although it may cause pulmonary vascular inflammation and leakage, leading to ventilator-induced lung injury (VILI). The purpose of this study was to determine the association between Nrf2/HO-1 expression in lung tissue in mice and the levels of VILI with different tidal volume. Futhermore, we examined the activation of Nrf2/HO-1 expression is linked to the presence of toll-like receptor 4 (TLR4). **Methods:** Both TLR4 KO and matched wild type (WT) mice were assigned to control, low tidal volume (LTV) and high tidal volume (HTV) groups. After given 12 hours of fasting and water-deprivation, mice were anesthetized, orotracheally intubated and ventilated for 4 hours with positive end-expiratory pressure of 2 cm H_2O, respiratory rate of 40 breaths per minute and inspiration /expiration ratio of 1:2. Control groups were only given intratracheal catheter but not given mechanical ventilation. After weaning, mice were sacrificed, the wet/dry (W/D) weight ratio and the lung injury score were evaluated, histological assessment were performed by hematoxylin-eosin (H&E) staining, the expression of TNF-αand IL-1β in lung tissue were examined and the expression of Nrf2 and HO-1 in lung tissue were examined by Immunohistochemistry and western blot. **Results:** The expression of Nrf-2, HO-1 in the lung tissue were elevated in mice of WT+HTV groups compared with the control groups and WT+LTV groups, which was largely attenuated by abrogation of TLR4. Also, an increase of lung injury score and W/D weight level seen in mice of WT+HTV groups were also alleviated in TLR4 KO mice. **Conclusion:** High tidal volume ventilation can induce ventilator-induced lung injury in mice. TLR4 mediates Nrf2/HO-1 signaling pathway during different tidal volume in ventilator-induced lung injury in mice, which may play an protectable role in the pathogenesis of VILI.

Key words: Toll -like receptor-4; NF-E2(Nuclear factor-erythroid 2)related factor2; Heme oxygenase 1; VILI
Chinese Library Classification(CLC): R-33; R563.8 Document code: A
Article ID: 1673-6273(2018)20-3812-05

前言

机械通气是治疗急性呼吸衰竭病人必不可少的治疗，虽然可能导致肺泡过度膨胀，导致肺水肿、炎症因子和氧自由基的

* 基金项目：国家自然科学基金项目（81470266）
作者简介：李艳艳，硕士研究生，研究方向：呼吸系统疾病的临床与基础研究
△ 通讯作者：潘频华，教授，博士生导师，主要从事呼吸系统疾病的临床与基础研究，E-mail: pinhuapan668@126.com，电话：0731-89753287
(收稿日期：2018-04-01 接受日期：2018-04-28)

释放,这被描述为呼吸机所致肺损伤(VILI)[1,2]。主要的生物学机制包括释放炎症介质和氧自由基,导致肺泡毛细血管屏障和器官功能障碍[3];有大量证据表明机械通气可诱发炎症反应[4,5]。核因子 2 相关因子 2(Nrf2)是一种主转录因子,上调抗氧化酶和细胞保护蛋白的表达[6]。Nrf2 对多种病变,诱导细胞救亡路径[7],发挥生物学活性。血红素氧合酶 -1(HO-1),该酶起到细胞保护作用。HO-1 基因属于驱动基因,对多种环境压力的响应非常敏感,包括促炎症细胞因子、氧化应激和一氧化氮[8,9]。既往研究示,Nrf2/HO-1 水平和多种肺部疾病关联 [10]。Toll 样受体(TLR)识别病原相关分子模式(PAMPs),由此引发炎性因子和免疫反应。已有研究发现 TLR4 介导的炎症反应包括很多种,如分别由脂多糖、失血性休克及机械通气所诱导产生的 ALI [11,12]。TLR4 结合配体,促炎细胞因子增高,如白细胞介素 IL-1 和 IL-6,肿瘤坏死因子(TNF-α),导致 ALI 病理变[13]。因此,TLR4 是炎症反应链的 " 关键阀 ",因其在氧化应激相关疾病中的重要性而备受重视。本研究旨在确定 VILI 是否受潮气量的影响,Nrf2/HO-1 在小鼠 VILI 肺组织表达水平之间的关系;TLR4 基因敲除与 VILI 及 Nrf2/HO-1 表达的激活关联是否存在。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

TLR4-/- 小鼠;野生型的 C57BL/6J(中南大学实验动物中心)。鼠龄均为 8-9W,体重大约 18-25 克,即鼠龄 9-10 周内采取干预措施。全部动物协定获动物护理及使用机构批准,且按国家卫生研究院指南进行。兔多克隆抗体(Nrf2 和 HO-1):北京 Bioss 公司。免疫组化试剂盒链霉亲和素 - 生物素复合物(SABC)、DAB 显色与免疫印迹试剂盒:武汉博士德生物公司。

1.2 仪器与设备

小动物呼吸机:Harvard 器械公司 / 美国,倒置相差显微镜:Olympus/ 日本。

1.3 方法

1.3.1 活体实验设计 TLR4 KO 和匹配的野生型(WT)小鼠为对照,大潮气量(HTV)和小潮气量(LTV)组。经过了 12 小时的禁食、禁水、小鼠麻醉后,经口气管插管和机械通气 4 h 后在控制温度(36-38℃)与 2 cm H_2O 呼气末正压,每分钟 1:2 呼吸比,呼吸频率 100 次 / 分。对照组仅给予气管内导管却不给予机械通气。断奶后处死小鼠。用电子秤测定左肺下叶湿重(W),然后干燥的烤箱中 65℃ 48 h,测定干重(D)。通过计算 W / D 重量比得到肺含水量。由 hematoxylin eosin 进行组织学评价(H&E)染色,运用免疫组化及免疫印迹技术检测肺组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达。

1.3.2 组织学评价 新鲜的右肺叶立即经 10%福尔马林固定,用石蜡包埋技术处理。5 μm 厚的切片,苏木精 - 伊红染色。组织病理学变化是由对实验单盲的病理学家在显微镜下评估。把玻片放光学显微镜下观察,以示病理改变。对切片评价以下 4 个指标:① 肺毛细血管有无充血;② 肺出血情况;③ 肺泡壁增厚、透明膜的是否出现;④ 毛细血管壁内、肺间隙中,中性粒细胞的浸润与否。每项评分标准 0-4 分,损伤最轻为 0 分,代表无损害;其次为 1 分有轻度损害,损害占据视野 <25%的面积;评分计 2 分为中度损害,损害占据整个视野面积的 25%～50%的面积;重度损害占据了视野的 50%～75%,计 3 分;最重为 4 分,占据整个视野面积 >75%。

1.3.3 炎症因子评价 将右肺中下叶结扎,4 ℃生理盐水作肺泡灌洗:5 mL/ 次,肺内停留 20 s,重复 3 次抽吸,反复共 30 mL,离心后取上清,置 -80℃冰箱;IL-1β,TNF-α 用 ELISA 法检测。

1.3.4 免疫组织化学与免疫印迹 免疫组化法,测肺 Nrf2/HO-1 表达。Nrf2 的阳性表达的细胞,细胞核着色棕褐色或淡黄色,为主要部位,细胞质中散发。HO-1 同理。Image-Pro Plus 6 软件行图像分析。组织切片在光镜下观察。每组各随机抽取三张摄影视野,用 400 倍拍照。用 Image-Pro Plus 6 软件选择的颜色判断所有照片的统一标准,积分光密度(IOD)每张照片进行分析。积分光密度值与 Nrf2/HO-1 表达量呈正比关系。用免疫印迹法测 Nrf2/HO-1 表达。

1.4 统计学方法

SPSS 19 软件统计全部数据。计量表达:均数± 标准差。统计学比较:单因素方差分析以及双尾 t 检验两种方法。*P<0.05* 为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 HTV 组导致 VILI,TLR4 基因缺失使小鼠 VILI 减轻

肺组织病理学检查显示,WT+HTV 组肺部炎症加剧,白细胞浸润,肺泡间隔增厚,而 TLR4-/- + HTV 组小鼠肺部病变减轻(图 1A)。LTV 组、CON 组病理改变不显著。肺泡壁仍然保持完整(图 1B)。测算 W/D 比值,肺组织损伤评分 IL-1β,TNF-α 表达结果:在 WT+ HTV 组上值明显增加(图 1B,*P<0.05*;图 1C,*P<0.05*),TLR4-/-+HTV 组相对减轻(图 1B,*P<0.05*;图 1C,*P < 0.05*)。

2.2 TLR4 调节小鼠机械通气所致肺损伤及 Nrf2/HO-1 表达

要确定是否 Nrf2/HO-1 在 VILI 中的表达受到 TLR4 的调节,分别予 WT 和 TLR4 基因敲除小鼠,通气 4 h 后,将小鼠即刻处死,获取肺标本后,免疫组化技术,测 Nrf2/HO-1 表达量。如图 2 得出,运用免疫组化和免疫印迹技术:HTV+TLR4-/- 组小鼠肺段,检测 Nrf2/HO-1 的结果,计算 IOD 值。小鼠机械通气所致肺损伤过程中,HTV 组肺组织中 Nrf2 和 HO-1 表达相比 CON、LTV 组增加(图 2;*P<0.05*),上述因子均在 TLR4 缺失组比相应野生小鼠模型组更进一步升高(*P<0.05*)。CON 组和 LTV 组之间,没有显著差异。这些结果表明:Nrf2 和 HO-1 的表达在 VILI 升高,相应表达在 TLR4-/- 小鼠进一步升高。

3 讨论

机械通气在危重病人治疗中占有重要地位,但机械通气致肺泡被动运动,过度开 / 合致剪切伤及肺不张等[14,15]。即使使用最有利的呼吸机的设置的情况下,机械通气仍可导致 VILI [16]。目前,VILI 的机制是不明确的,而研究表明 VILI 实质上是一种生物损伤[17],其中涉及多因素相互作用。肺生物损伤是指炎症介质、细胞因子和炎性细胞引起的炎症损伤,以支气管肺泡灌洗液中促炎介质和中性粒细胞浸润水平增高为特征。VILI 可以早期出现机械损伤,然后转移到细胞因子诱导的生物损伤。其发病机制可能与细胞氧化应激受机械牵拉产生,炎症细胞移至

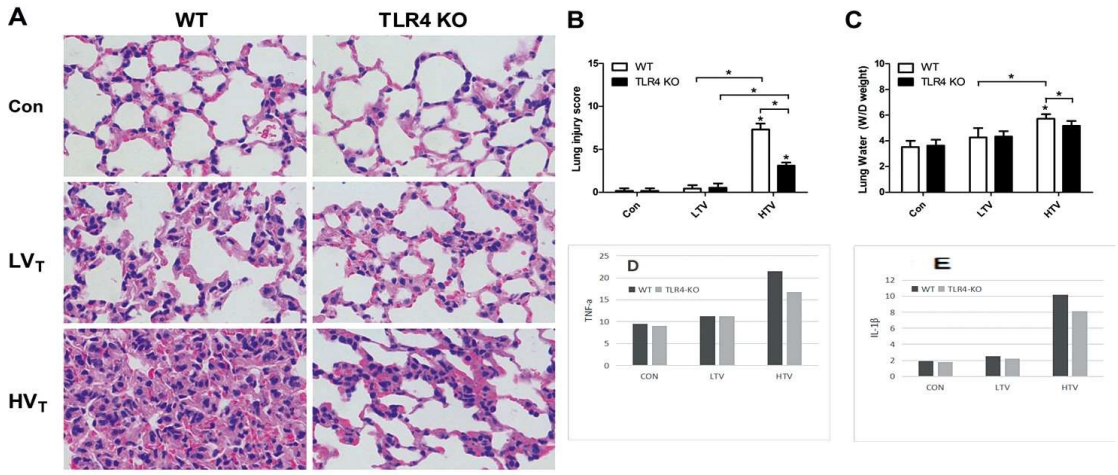

图 1 HVT 组导致 VILI，TLR4 基因缺失使小鼠 VILI 减轻

WT 和 TLR4 基因敲除小鼠分 CON 组、LVT 组和 HVT 组。4 小时机械通气后获取肺组织。（A）肺切片染色（× 400）。（B）肺损伤评分。（C）肺含水量。（n = 6，*P<0.05*）。（D）炎性因子 TNF-α 表达。（n = 6，*P<0.05*）。（E）炎性因子 IL-1β。（n = 6，*P<0.05*）。

Fig.1 TLR4 deletion attenuates ventilator-induced lung injury in mice

WT and TLR4-/- mice were treated with sham operation, LVT or HVT. Lung samples were harvested at 4 h post-mechanical ventilation. (A) H&E staining of lung sections (× 400).(B) Lung injury score. (C) Water content of lung. (n = 6/group, **P<0.05*, compared with the control at that time point or between the groups). (D) Expession of TNF-α. (n = 6/group, **P<0.05*, compared with the control at that time point or between the groups). (E) Expession of IL-β. (n = 6/group, **P<0.05*, compared with the control at that time point or between the groups).

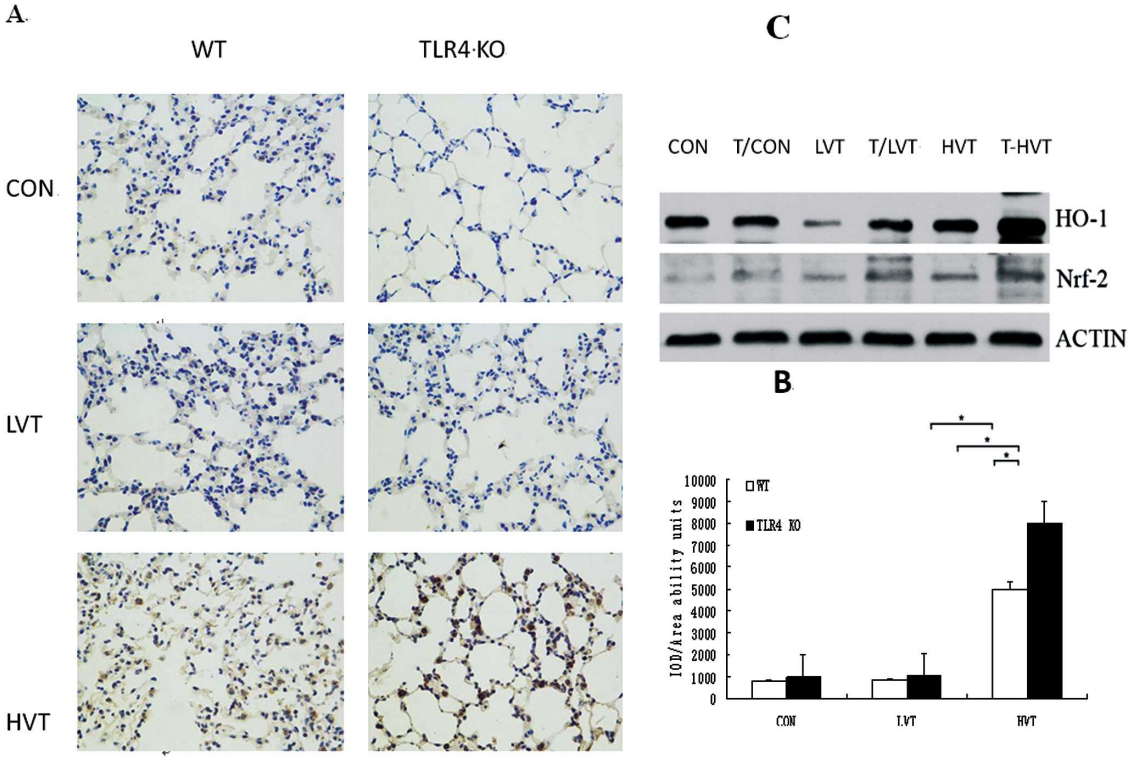

图 2 肺组织中 Nrf2 蛋白表达在 TLR4 缺失小鼠中升高

WT 和 TLR4 基因敲除小鼠分 CON、LVT 和 HVT。4 小时机械通气后获取肺组织。（A）免疫组化染色的肺切片 Nrf2 蛋白（× 400）。（B）Nrf2 蛋白 IOD 值（n=6/ 组，*P<0.05*）。（C）免疫印迹法 Nrf2 表达。

Fig. 2 TLR4 deletion enhanced Nrf2 expression in lung tissue during VILI in mice

WT and TLR4-/- mice were treated with sham operation（CON）, LVT or HVT. Lung samples were harvested at 4 h post-mechanical ventilation. (A) IHC staining of lung sections with Nrf2 antibody (× 400). (B) IOD of lung sections with Nrf2 antibody (n= 6/group, **P<0.05*, compared with the control at that time point or between the groups). （C）The expression of Nrf2 in western blot method.(n= 6/group, **P<0.05*, compared with the control at that time point or between the groups).

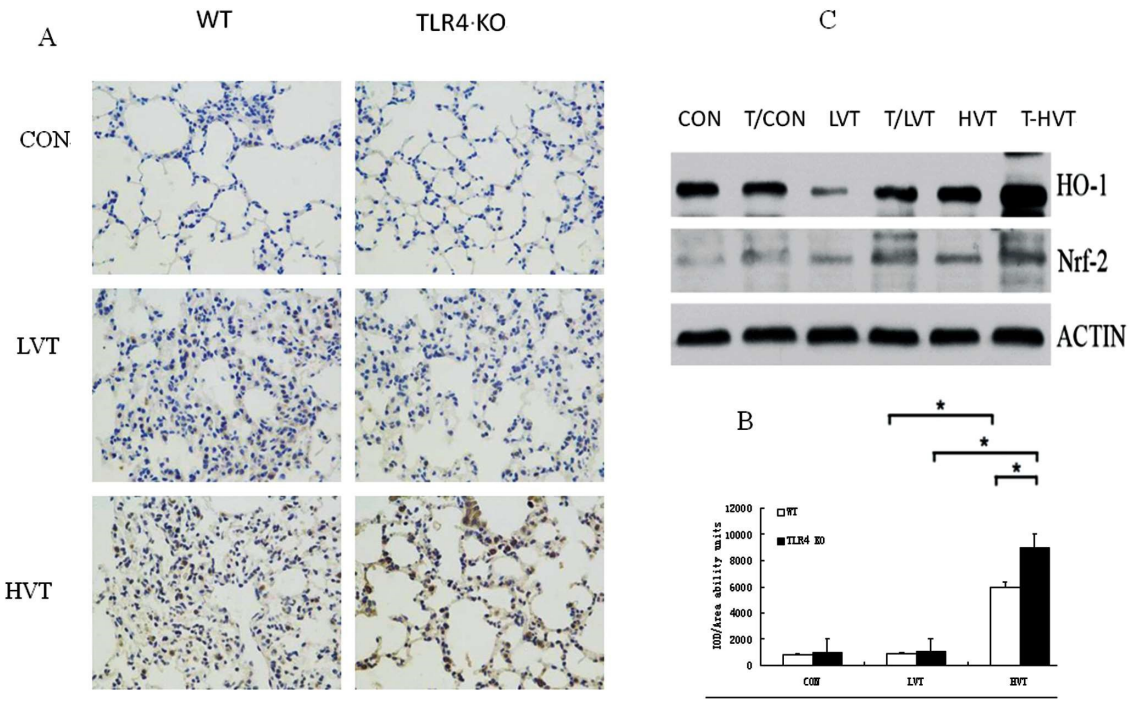

图 3 肺组织中 HO-1 蛋白表达在 TLR4 缺失小鼠中升高

WT 和 TLR4 基因敲除小鼠分 CON、LVT 或 HVT。4 小时机械通气后获取肺组织。(A)免疫组化染色的肺切片 HO-1 蛋白(× 400)。(B)HO-1 蛋白 IOD 值(n=6/ 组,*P<0.05*)。(C) 免疫印迹法 HO-1 表达。

Fig. 3 TLR4 deletion enhanced Ho-1 expression in lung tissue during VILI in mice.

WT and TLR4-/- mice were treated with sham operation(CON), LVT or HVT. Lung samples were harvested at 4 h post-mechanical ventilation. (A) IHC staining of lung sections with HO-1 antibody (× 400). (B) IOD of lung sections with HO-1 antibody (n = 6/group, **P < 0.05*, compared with the control at that time point or between the groups).(C)The expression of HO-1 in western blot method.(n= 6/group, **P<0.05*, compared with the control at that time point or between the groups).

肺组织,导致肺损伤相关[18]。

HO-1 的表达在正常情况下少,但显著增加剪切应力下,热休克、IR、缺氧、炎症等因素下,HO-1 发挥对器官的抗氧化保护作用 [19]。最近的研究还发现在人体肺部健康和代谢调节中 HO-1 的作用。研究人员使用氯血红素(血红素加氧酶 -1 受体激动剂)进行干预,发现高氧提高动物耐受,肺水肿以及死亡率的降低,和保护效果可以通过 HO-1 抑制剂的抑制,证实肺抗氧化 HO-1 的保护作用[20]。HO-1 有利于肺部调节过度的炎症反应。由于肺接口直接与氧化环境,预计血红素加氧酶 1 可能参与肺的健康和疾病的许多方面。剪切力产生的机械通气可激活肺细胞异常凋亡途径,也可通过 HO-1 保护。因为它与 VILI 的发病关系密切,对身体的内部保护系统对疾病的使用可能成为肺保护的新方法。NRF-2,作为上游的中介依赖 II 相酶,进入细胞核,结合 HO-1。有研究表明,氧化应激刺激,Nrf2/ HO-1 通路启动,发挥抗氧化作用[21]。Nrf2 诱导细胞救援途径对抗氧化肺损伤、异常炎症、免疫反应与细胞凋亡。Nrf2 抗氧化通路已被证明对包括 ARDS 在内的多种肺部疾病有保护作用,成为被广泛研究的新的治疗靶点[22-23]。本研究结果表明,Nrf2/HO-1 的表达在 HTV 组明显升高(图 2 和图 3);提示 Nrf2/HO-1 可能持续被 HTV 机械刺激激活, 其表达异常可能参与小鼠肺损伤的病理生理过程。它也被证实, 基因敲除 TLR4 可通过升高 Nrf-2 / HO-1 的表达减轻肺损伤(图 1-3)。该发现与其它肺部气道炎症相关疾病的研究结果:TLR4 基因缺失对 VILI 起到保护作用,Nrf2/HO-1 表达对机体起保护作用相一致。

本研究探讨了 Nrf2/HO-1 通路在 VILI 的作用,及 TLR4 缺失对 VILI 的保护作用,并提示其与 Nrf2/HO-1 通路的相关性。基于本研究结果, 我们认为 TLR4 在控制 VILI 中起着关键的作用,和 Nrf2/HO-1 表达有一定相关性。通过识别 TLR4 介导的分子机制 Nrf2/HO-1 和相关的炎症表现,为我们研究一种新的治疗方法提供了指导,但其联系机理目前不明确。基于此,目前 VILI 尚无确切有效的药物治疗措施,Nrf2/HO-1 机制及 TLR4 抑制可为该病的治疗提供新的药物治疗靶点。

参 考 文 献(References)

[1] Matthay MA, Bhattacharya S, Gaver D. Ventilator-induced lung injury: in vivo and in vitro mechanisms [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(4): 678-682

[2] Tsuno K, Miura K, Takeya M. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures [J]. Am Rev Respir Dis, 1991, 143(5 Pt 1): 1115-1120

[3] Yang WC, Song CY, Wang N. Hypercapnic acidosis confers antioxidant and anti-apoptosis effects against ventilator-induced lung injury[J]. Lab Invest, 2013, 93(12): 1339-1349

[4] Gao W, YN Ju. Budesonide Attenuates Ventilator-induced Lung Injury in a Rat Model of Inflammatory Acute Respiratory Distress Syndrome [J]. Arch Med Res, 2016, 47(4): 275-284

[5] Scheiermann J, DM Klinman. Suppressive oligonucleotides inhibit inflammation in a murine model of mechanical ventilator induced

lung injury[J]. J Thorac Dis, 2016, 8(9): 2434-2443

[6] Zhao H, Eguchi S, Alam A. The role of Nuclear factor-erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) in the protection against lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2016: ajplung.00449.2016

[7] Cho HY, SR Kleeberger. Nrf2 protects against airway disorders [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 244(1): p. 43-56

[8] Regev D, Surolia R, Karki S, et al. Heme oxygenase-1 promotes granuloma development and protects against dissemination of mycobacteria[J]. Lab Invest, 2012, 92(11): 1541-1552

[9] Biswas C, Shah N, Muthu M, et al. Nuclear heme oxygenase-1 (HO-1) modulates subcellular distribution and activation of Nrf2, impacting metabolic and anti-oxidant defenses [J]. J Biol Chem, 2014, 289(39): 26882-26894

[10] Cho HY, SP Reddy, SR Kleeberger. Nrf2 defends the lung from oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(1-2): 76-87

[11] Imai Y, Kuba K, Neely GG, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury[J]. Cell, 2008, 133(2): 235-249

[12] Wu D, Pan P, Su X. Interferon Regulatory Factor-1 Mediates Alveolar Macrophage Pyroptosis During LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice[J]. Shock, 2016, 46(3): 329-338

[13] Deng Y, Yang Z, Gao Y. Toll-like receptor 4 mediates acute lung injury induced by high mobility group box-1 [J]. PLoS One, 2013, 8 (5): e64375

[14] Verbrugge SJ, Lachmann B, Kesecioglu J. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application [J]. Clin Physiol Funct Imaging, 2007, 27(2): 67-90

[15] Beitler JR, A Malhotra, BT Thompson. Ventilator-induced Lung Injury[J]. Clin Chest Med, 2016, 37(4): p. 633-646

[16] Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice[J]. Crit Care, 2009,13(1): R1

[17] dos Santos CC, Shan Y, Akram A, et al. Neuroimmune regulation of ventilator-induced lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011,183(4): 471-482

[18] Wagener FA, Volk HD, Willis D, et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation [J]. Pharmacol Rev, 2003, 55(3): 551-571

[19] Hosick PA, Stec DE. Heme oxygenase, a novel target for the treatment of hypertension and obesity?[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012, 302(2): R207-14

[20] Morse D, AM Choi. Heme oxygenase-1: from bench to bedside [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(6): 660-670

[21] Shi Y, Liang XC, Zhang H. Quercetin protects rat dorsal root ganglion neurons against high glucose-induced injury in vitro through Nrf-2/HO-1 activation and NF-kappaB inhibition[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(9): 1140-1148

[22] Li N, Wang M, Barajas B, et al. Nrf2 deficiency in dendritic cells enhances the adjuvant effect of ambient ultrafine particles on allergic sensitization[J]. Journal of Innate Immunity, 2013, 5(6): 543-554

[23] Mehla K, Balwani S, Agrawal A, et al. Ethyl gallate attenuates acute lung injury through Nrf2 signaling [J]. Biochimie, 2013, 95 (12): 2404-2414

（上接第 3804 页）

[14] Ma L, Jia J, Niu W, et al. Mitochondrial CB1 receptor is involved in ACEA-induced protective effects on neurons and mitochondrial functions[J]. Sci Rep, 2015, 5: 12440

[15] Sun B, Cai Y, Li Y, et al. The nonstructural protein NP1 of human bocavirus 1 induces cell cycle arrest and apoptosis in Hela cells [J]. Virology, 2013, 440(1): 75-83

[16] Yang Y, Luo L, Cai X, et al. Nrf2 inhibits oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via protection of mitochondrial function [J]. Free Radic Biol Med, 2018, 120: 13-24

[17] Ruiz A, Alberdi E, Matute C. Mitochondrial Division Inhibitor 1 (mdivi-1) Protects Neurons against Excitotoxicity through the Modulation of Mitochondrial Function and Intracellular Ca²⁺ Signaling[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 3

[18] Grivennikova VG, Kareyeva AV, Vinogradov AD. Oxygen-dependence of mitochondrial ROS production as detected by Amplex Red assay[J]. Redox Biol, 2018, 17: 192-199

[19] Angelova PR ,Abramov AY. Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration [J]. FEBS Lett, 2018, 592(5): 692-702

[20] Bleier L, Wittig I, Heide H, et al. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 78: 1-10

[21] Guo R, Gu J, Zong S, et al. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain[J]. Biomed J, 2018, 41(1): 9-20

[22] Hassanpour SH, Dehghani MA, Karami SZ. Study of respiratory chain dysfunction in heart disease[J]. J Cardiovasc Thorac Res, 2018, 10(1): 1-13

[23] Sanderson T H, Reynolds C A, Kumar R, et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(1): 9-23