原创精选
Selected article

TAM/Gas6 通路在石英粉尘致小鼠肺组织细胞凋亡中的作用

谢利，李伟，马继轩，程曼，徐以菊，樊烈阳，陈卫红

华中科技大学同济医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系，环境与健康教育部重点实验室，国家环境保护环境与健康重点实验室（武汉），湖北 武汉 430030

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19878

基金项目
国家自然科学基金项目（81872593，81372967）

作者简介
谢利（1995—），女，硕士生；
E-mail：xiemeili_27@163.com

通信作者
陈卫红，E-mail：wchen@mails.tjmu.edu.cn

伦理审批 已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2019-12-09
录用日期 2020-03-25

文章编号 2095-9982(2020)06-0573-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
谢利，李伟，马继轩，等. TAM/Gas6 通路在石英粉尘致小鼠肺组织细胞凋亡中的作用[J]. 环境与职业医学，2020，37（6）：573-578.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19878

Funding
This study was funded.

Correspondence to
CHEN Wei-hong, E-mail: wchen@mails.tjmu.edu.cn

Ethics approval Obtained
Competing interests None declared
Received 2019-12-09
Accepted 2020-03-25

▸To cite
XIE Li, LI Wei, MA Ji-xuan, et al. Role of TAM/Gas6 pathway in apoptosis in mouse lung tissues induced by silica[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(6): 573-578.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19878

摘要：

[背景] 石英粉尘吸入肺部后被肺泡巨噬细胞吞噬，触发内源性或外源性凋亡信号通路，导致肺损伤。近年来 TAM/ 生长抑制特异性蛋白 6（Gas6）通路与细胞凋亡的关系成为研究热点。Mer 是 TAM 的主要受体之一，前期研究显示 Mer 可能参与石英粉尘诱导的肺炎性反应及纤维化。

[目的] 通过动物实验探究 TAM/Gas6 通路在石英粉尘致细胞凋亡中的作用机制。

[方法] 实验采用 3 种雄性 C57BL/6 小鼠：野生型（WT），*Gas6*$^{-/-}$、*Mer*$^{-/-}$ 基因敲除小鼠，各种小鼠按照体重随机分为对照组和石英染尘组，共 6 组，每组 24 只。对照组气管单次滴注 50 μL 生理盐水，石英染尘组单次滴注 50 μL 的石英粉尘悬液（50 μg·μL^{-1}），分别在第 7 天、第 28 天、第 84 天各组处死 8 只小鼠并收集肺泡灌洗液（BALF）和肺组织。采用相应试剂盒检测 BALF 中的总蛋白（TP）、乳酸脱氢酶（LDH）、碱性磷酸酶（AKP）、酸性磷酸酶（ACP）水平；采用实时荧光定量 PCR 检测肺组织细胞凋亡因子 *Bcl2*、*Bax* mRNA 表达水平；采用 Western blotting 检测 Bcl2、Bax、半胱天冬酶 -3（caspase-3）、活化型半胱天冬酶 -3（cleaved-caspase-3）蛋白表达水平。

[结果] 与 WT 小鼠对照组相比，WT 小鼠染尘组在上述三个时间点 BALF 中 TP、LDH、AKP、ACP 水平均升高，抗凋亡因子 Bcl2 蛋白水平降低，促凋亡因子 Bax 蛋白水平升高，Bcl2 与 Bax 的 mRNA 和蛋白比值均下降（P<0.05）。与 WT 小鼠染尘组比较，*Gas6* 和 *Mer* 基因敲除小鼠在染尘后各时间点 BALF 中 TP（除第 84 天）、LDH（除第 28、84 天）、AKP、ACP 水平均明显下降，抗凋亡因子 Bcl2 蛋白表达升高，促凋亡因子 Bax 蛋白水平下降，Bcl2 与 Bax 的 mRNA 和蛋白比值均升高，cleaved-caspase-3 与 caspase-3 蛋白比值下降（P<0.05）。

[结论] 石英粉尘可诱导小鼠肺损伤和肺组织细胞凋亡水平升高。阻断 *Gas6* 或 *Mer* 基因后，可以抑制肺组织细胞凋亡水平，缓解石英粉尘引起的小鼠肺组织损伤。

关键词：石英；TAM/Gas6 通路；细胞凋亡；肺损伤

Role of TAM/Gas6 pathway in apoptosis in mouse lung tissues induced by silica XIE Li, LI Wei, MA Ji-xuan, CHENG Man, XU Yi-ju, FAN Lie-yang, CHEN Wei-hong (Key Laboratory of Environment and Health, Ministry of Education, State Key Laboratory of Environment Health (Incubating), Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract:

[Background] After being inhaled into the lungs, silica dust is ingested by alveolar macrophages, which triggers endogenous or exogenous apoptotic signaling pathways and leading to lung injury. In recent years, the relationship between TAM/growth arrest-specific protein 6 (Gas6) pathway and apoptosis has become a research hotspot. Previous studies have shown that Mer, one of TAM's main receptors, may be involved in the inflammatory response and fibrosis induced by silica.

[Objective] This animal experiment aims to investigate the mechanism of TAM/Gas6 pathway on the apoptosis induced by silica.

[Methods] Three kinds of male C57BL/6 mice were used in the experiment, including wild-type (WT) mice, *Gas6*$^{-/-}$ mice, and *Mer*$^{-/-}$ mice. The mice of each kind were randomly divided into

a control group and a silica group with body weight matched, and there were a total of six groups with 24 mice in each group. The mice in the control groups were subjected to 50 μL normal saline instillation, while the mice in the silica groups received 50 μL silica suspension instillation (50 μg·μL^{-1}). Eight mice were sacrificed on day 7, 28, and 84, respectively, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue samples were collected. Total protein (TP), lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AKP), and acid phosphatase (ACP) levels were measured with corresponding kits; mRNA expression levels of apoptotic factors *Bcl2* and *Bax* were detected by quantitative real-time PCR; protein expression levels of Bcl2, Bax, caspase-3, and cleaved-caspase-3 were detected by Western blotting.

[Results] Compared with the WT control group, the levels of TP, LDH, AKP, and ACP in BALF were significantly elevated, the protein expression level of anti-apoptotic factor Bcl2 was decreased, the protein expression level of pro-apoptotic factor Bax was increased, and the mRNA and protein expression ratios of Bcl2 and Bax were decreased in the WT silica group at the three designed time points (P<0.05). Compared with the WT silica group, the levels of TP (except day 84), LDH (except day 28 and 84), AKP, and ACP were largely decreased, the protein expression level of anti-apoptotic factor Bcl2 was increased, the protein expression level of pro-apoptotic factor Bax was decreased, the mRNA and protein expression ratios of Bcl2 to Bax were increased, and the protein expression ratio of cleaved-caspase-3 to caspase-3 was decreased in the *Gas6*$^{-/-}$ or *Mer*$^{-/-}$ silica group at the three designed time points (P<0.05).

[Conclusion] Silica can induce injury and apoptosis in mouse lung tissues. Blockade of *Gas6* or *Mer* gene can partially inhibit the level of apoptosis and alleviate the lung tissue damage in mice caused by silica.

Keywords: silica; TAM/Gas6 pathway; apoptosis; lung injury

石英粉尘是我国危害最严重的职业有害因素之一，生产过程中长期吸入大量石英粉尘可引起职业病 —— 矽肺[1]。肺内沉着的石英粉尘可引起肺组织坏死、持续性炎性反应和纤维化，其病理特征通常表现为肺水肿、肺间质纤维化等[2]。石英粉尘引起的细胞凋亡被认为是导致肺部损伤的重要过程。细胞凋亡作为一种程序性细胞死亡途径，广泛参与多种疾病的发生，其在肺损伤过程中的作用日益受到重视，如肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞的凋亡，可加重毛细血管-肺泡损伤而参与肺损伤的发生过程[3]。生长抑制特异性蛋白 6（growth arrest-specific protein 6，Gas6）是维生素 K 依赖的分泌型多结构域蛋白质，广泛表达于多种器官组织和细胞。Gas6 可通过激活 Tyro3、Axl、Mer 受体酪氨酸激酶（后简称 TAM 受体），发挥多种生物学效应。有研究发现 TAM/Gas6 通路能够参与细胞凋亡过程，并介导巨噬细胞对凋亡细胞的识别作用[4-5]。Gas6 与细胞外表面的磷脂酰丝氨酸结合，再与 TAM 受体特异性结合并发生二聚化，导致胞内酪氨酸激酶发生去磷酸化而被激活，从而启动内源性或外源性细胞凋亡信号，诱导细胞凋亡水平上调，促进巨噬细胞的凋亡，导致炎性反应的持续性发生。我组前期研究发现 TAM 受体中主要是 Mer 受体参与石英引起的肺部炎性和纤维化[6]。Mer 作为 TAM 受体亚家族的一员，对于巨噬细胞吞噬凋亡细胞是必不可少的[7]。因此，本研究采用雄性野生型小鼠和其同型 *Mer*、*Gas6* 基因敲除小鼠进行石英染尘，深入分析 *Mer* 和 *Gas6* 是否影响石英粉尘引起的细胞凋亡及其与肺组织的损伤效应。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

雄性野生型（wild-type，WT）C57BL/6 小鼠和同型 *Gas6* 基因敲除小鼠（*Gas6*$^{-/-}$）由南京大学动物研究中心提供，同型 *Mer* 基因敲除小鼠（*Mer*$^{-/-}$）购自美国杰克逊实验室。使用 Western blotting 技术鉴定 *Gas6* 和 *Mer* 基因敲除的有效性，采用 PCR 对 *Mer* 或 *Gas6* 基因敲除小鼠的后代进行基因分型。所有小鼠适应性喂养 1 周后，将 3 种小鼠（WT、*Gas6*$^{-/-}$、*Mer*$^{-/-}$）按照体重随机分为对照组和石英染尘组，共 6 组，每组 24 只。本实验沿用课题组前期已建立的成熟实验方法[6-7]，气管滴注法染毒，对照组单次滴注 50 μL 的生理盐水，石英染尘组单次滴注 50 μL 的石英粉尘悬液（50 μg·μL^{-1}）。所有实验小鼠均为 6~8 周龄，体重（18±1）g，动物房室温（24±1）°C，相对湿度（50±5）%。本实验经华中科技大学同济医学院医学伦理委员会批准，批准号为［2013］IEC（S017）。

1.2 主要试剂和仪器

中国标准石英粉尘（中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所，中国），总蛋白（total protein，TP）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，AKP）、酸性磷酸酶（acid Phosphatase，ACP）（南京建成生物工程研究所，中国），抗体 Bax、Bcl2、半胱天冬酶-3（caspase-3）、活化型半胱天冬酶-3（cleaved-caspase-3）

（Cell Signaling Technology，美国），抗体 GAPDH（Santa Cruz Biotechnology，美国），Trizol 试剂（Invitrogen，美国），超高速低温离心机（Eppendorf，德国），T-18 匀浆机（IKA，德国），ELX-800 酶标仪（Bio-Rad，美国），实时荧光定量 PCR 仪（7900 HT，ABI，美国），荧光化学发光凝胶成像系统（Syngene，英国）。

1.3 样本采集与处理

在染尘后第 7 天、第 28 天、第 84 天每组分别取 8 只小鼠称重，采用腹腔注射方式对小鼠进行充分麻醉（1% 戊巴比妥钠，0.01 mL·g^{-1}，以体重计），解剖暴露气管和肺部，用 1 mL 生理盐水从口腔插入气管冲洗肺部 3 次，收集肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid，BALF）装于 1.5 mL 离心管中，10 000×*g* 离心 10 min（4°C），收集上清，分装后保存于 -80°C。摘取小鼠肺组织分成两部分，分别放入 1.5 mL 装有 RNA 储存液的离心管和空白离心管，于 -80°C 保存，用于 mRNA 和蛋白质测定。

1.4 测试指标与方法

1.4.1 BALF 中 TP、LDH、ACP、AKP 含量的测定 使用相应试剂盒完成这几个指标的检测，具体步骤参照厂家提供的产品说明书。

1.4.2 肺组织 *Bax*、*Bcl2* mRNA 表达水平的测定 使用 Trizol 从肺组织分离出总 RNA，测定其浓度和纯度后，将提取的 RNA 逆转录成 cDNA。按照 SYBR Green 试剂盒说明书的操作步骤，以 *GAPDH* 为内参，在实时荧光定量 PCR 仪上分别定量检测 *Bax*、*Bcl2* mRNA 表达水平。*Bax* 引物：正向 5′-GCCTTTTTGCTACAGGGTTTCAT-3′，反向 5′-TATTGCTGTCCAGTTCATCTCCA-3′；*Bcl2* 引物：正向 5′-TGACTTCTCTCGTCGCTACCGT-3′，反向 5′-CCTGAAGAGTTCCTCCACCACC-3′；*GAPDH* 引物：正向 5′-CCTCGTCCCGTAGACAAAATG-3′，反向 5′-TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT-3′。反应体系为 10 μL，每个样品 2 个复孔，重复 3 次。

1.4.3 肺组织中 Bax、Bcl2、caspase-3、cleaved-caspase-3 蛋白表达水平的测定 取冻存的小鼠肺组织，加入含 1% 蛋白酶抑制剂 PMSF 的 RIPA 裂解液对肺组织进行裂解，冰上匀浆，12 000×*g* 离心 15 min（4°C），取上清并使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白样品（30 μg）按 Western blotting 操作步骤，分别检测 Bax、Bcl2、caspase-3、cleaved-caspase-3 和 GAPDH 的蛋白表达情况。使用 Image J 软件对蛋白条带的灰度值进行统计，以 GAPDH 作为内参蛋白，计算目的蛋白表达量。

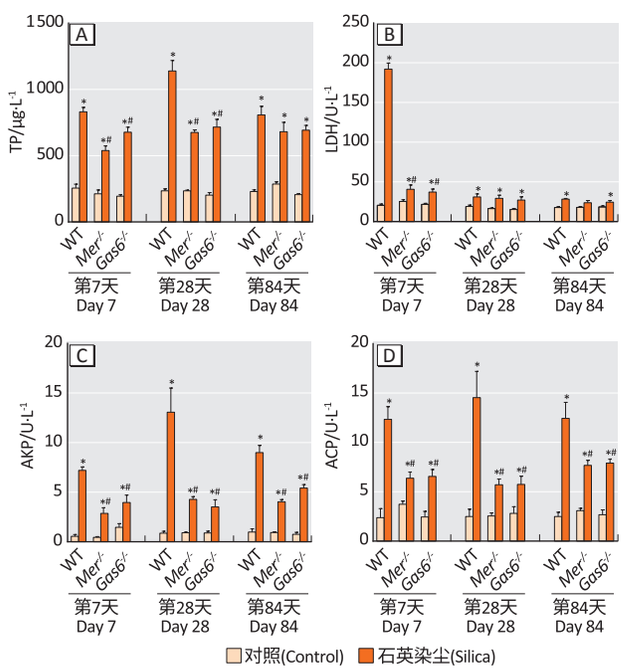
1.5 统计学分析

采用统计软件 SAS 9.4 进行分析。用 Shapiro-Wilk 检验数据的正态性分布。数据以均值 ± 标准误表示，多组样本均数间的比较用单因素方差分析，两两比较用 Student-Newman-Keuls *q* 检验。使用 Image J 软件对蛋白灰度值进行处理。应用 GraphPad Prism 7.0 软件对实验数据进行绘图。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 BALF 中 TP、LDH、AKP、ACP 的变化

由图 1 可知，与同时间点 WT 小鼠对照组相比，WT 小鼠染尘组 BALF 中 TP、LDH、AKP 和 ACP 水平在各时间点均有不同程度的升高（P<0.05）。其中 LDH 在气管滴注石英粉尘后第 7 天明显高于第 28 天和 84 天。与同时间点 WT 小鼠染尘组比较：气管滴注石英粉尘后第 7 天，*Mer*$^{-/-}$ 和 *Gas6*$^{-/-}$ 小鼠染尘组 BALF 中 TP、LDH、AKP、ACP 的表达水平均明显降低（P<0.05）；气管滴注后第 28 天，*Mer*$^{-/-}$ 和 *Gas6*$^{-/-}$ 小鼠 BALF 中 TP、



[注] *：与同时间点对照组相比，P<0.05；#：与同时间点 WT 小鼠石英染尘组比较，P<0.05。

[Note] *: Compared with the control group at the same time point, P<0.05; #: Compare with the WT mice silica group at the same time point, P<0.05.

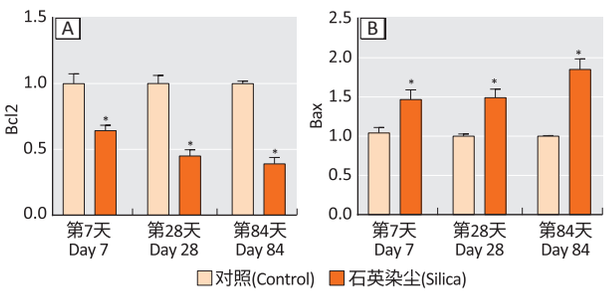
图 1 各组小鼠各时间点 BALF 中 TP（A）、LDH（B）、AKP（C）、ACP（D）水平（*n*=24）

Figure 1 TP (A), LDH (B), AKP (C), and ACP (D) levels in BALF of each group of mice at different time points (*n*=24)

AKP、ACP也下降（$P<0.05$）；气管滴注后第84天，*Mer*$^{-/-}$和*Gas6*$^{-/-}$小鼠BALF中AKP、ACP降低（$P<0.05$），而TP、LDH两个指标差异无统计学意义（$P>0.05$）。

2.2 凋亡相关基因mRNA和蛋白表达的变化

图2显示，WT小鼠染毒组肺组织中Bcl2蛋白水平在三个时间点均降低，且呈现随着暴露时间的延长而逐渐降低的趋势；而Bax蛋白水平在三个时间点均呈现上升趋势，在第84天达到峰值。由图3A和图4A可知，WT小鼠在石英粉尘暴露之后，*Bcl2*与*Bax* mRNA比值在三个时间点均降低（$P<0.05$），其中第7天最明显。



［注］*：与对照组相比，$P<0.05$。

［Note］*: Compared with the control group, $P<0.05$.

图2 WT小鼠对照组和石英染尘组各时期肺组织Bcl2（A）、Bax（B）蛋白水平（*n*=24）

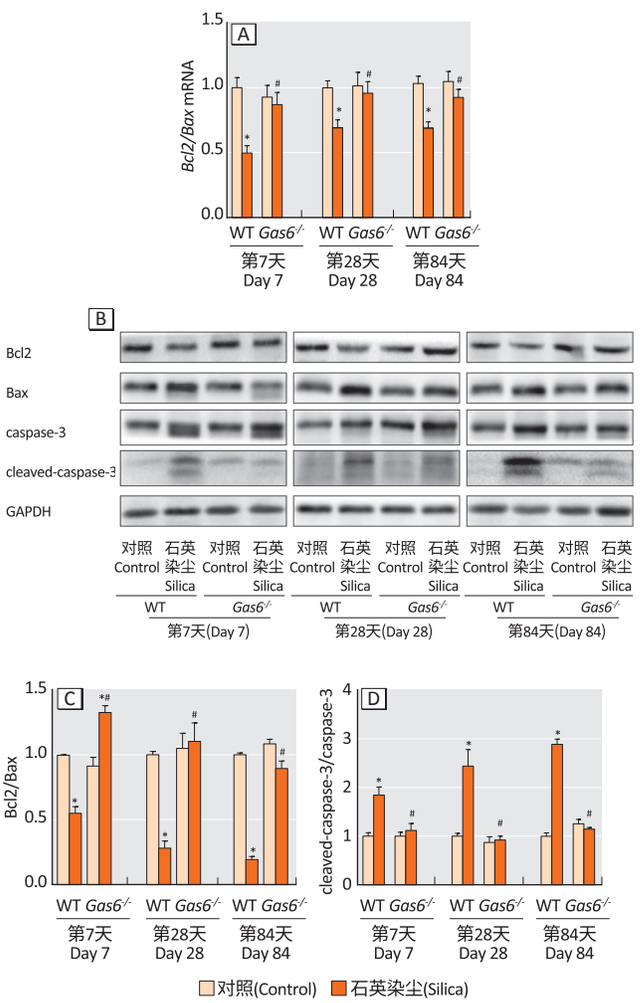
Figure 2 Bcl2 (A) and Bax (B) protein levels in lung tissues of control and silica groups of WT mice (*n*=24)

2.3 *Gas6*基因敲除后凋亡相关基因mRNA和蛋白表达的变化

与WT小鼠染尘组比较，*Gas6*$^{-/-}$小鼠染尘组肺组织中Bcl2与Bax蛋白比值在各个时间点均升高（$P<0.05$），但随着染尘时间的延长，*Gas6*$^{-/-}$小鼠染尘组Bcl2与Bax蛋白比值呈下降趋势，mRNA检测结果与蛋白结果基本一致（图3A、B、C）。与WT小鼠对照组相比，WT小鼠染尘组肺组织中cleaved-caspase-3与caspase-3蛋白比值在各时间点均升高（$P<0.05$），且在第84天达到峰值。与同时间点WT小鼠染尘组比较，*Gas6*$^{-/-}$小鼠染尘组肺组织中cleaved-caspase-3与caspase-3蛋白比值在各时间点均明显降低（$P<0.05$），在三个时间点均降至同期对照组水平（图3B、D）。

2.4 *Mer*基因敲除后凋亡相关基因mRNA和蛋白表达的变化

WT小鼠暴露于石英粉尘之后，与其同期对照组比较，在各个时间点Bcl2蛋白水平均明显下降，Bax、caspase-3、cleaved-caspase-3蛋白均水平明显升高，结果如图4B所示。与WT小鼠染尘组相比，*Mer*$^{-/-}$小鼠粉尘暴露组在各时间点肺组织中的Bcl2与Bax的mRNA和蛋白比值均升高（图4A、C）。而cleaved-caspase-3与caspase-3蛋白比值下降（$P<0.05$），在三个时间点均降至同期对照组水平（图4D）。

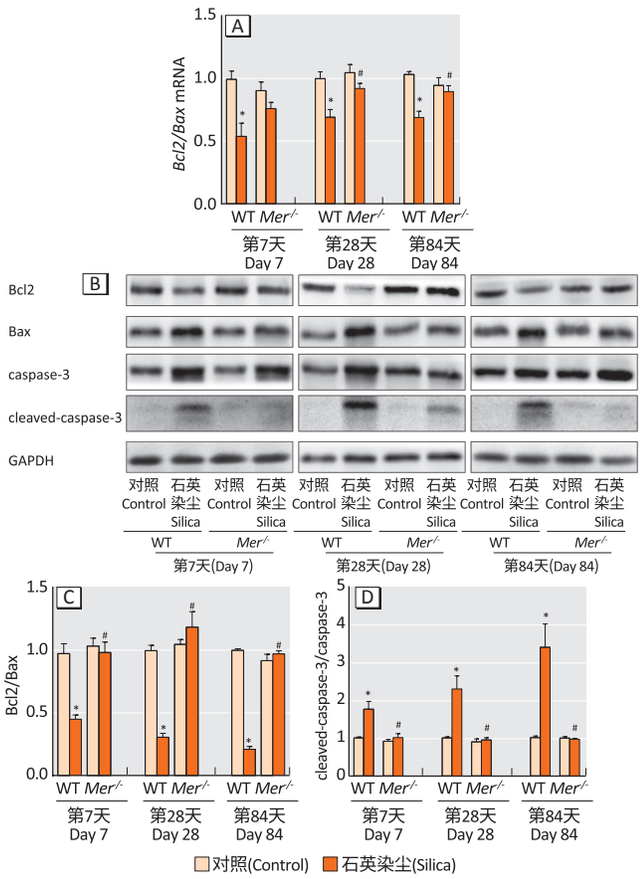


［注］A：*Bcl2*和*Bax* mRNA比值；B：各蛋白相对表达量；C：Bcl2和Bax蛋白比值；D：cleaved-caspase-3和caspase-3蛋白比值。*：与同时间点对照组相比，$P<0.05$；#：与同时间点WT小鼠石英暴露组比较，$P<0.05$。

［Note］A: Ratio of *Bcl2* to *Bax* mRNA; B: Relative protein expression levels; C: Ratio of Bcl2 to Bax protein; D: Ratio of cleaved-caspase-3 to caspase-3 protein. *: Compared with the control group at the same time point, $P<0.05$; #: Compare with the WT mice silica group at the same time point, $P<0.05$.

图3 *Gas6*基因敲除小鼠肺组织细胞凋亡相关因子mRNA和蛋白水平（*n*=24）

Figure 3 mRNA and protein levels of apoptotic factors in lung tissues of *Gas6* knockout mice (*n*=24)



[注] A：*Bcl2* 和 *Bax* mRNA 比值；B：各蛋白相对表达量；C：Bcl2 和 Bax 蛋白比值；D：cleaved-caspase-3 和 caspase-3 蛋白比值。*：与同时间点对照组相比，$P<0.05$；#：与同时间点 WT 小鼠石英染尘组比较，$P<0.05$。

[Note] A: Ratio of *Bcl2* to *Bax* mRNA; B: Relative protein expression levels; C: Ratio of Bcl2 to Bax protein; D: Ratio of cleaved-caspase-3 to caspase-3 protein. *: Compared with the control group at the same time point, $P<0.05$; #: Compare with the WT mice silica group at the same time point, $P<0.05$.

图 4 *Mer* 基因敲除小鼠肺组织细胞凋亡相关因子 mRNA 和蛋白水平（*n*=24）

Figure 4 mRNA and protein levels of apoptotic factors in lung tissues of *Mer* knockout mice (*n*=24)

3 讨论

本研究通过对小鼠气管滴注石英粉尘，探讨了石英粉尘致肺损伤的可能机制。结果发现石英粉尘导致 BALF 中 TP、LDH、AKP、ACP 水平增高。课题组前期实验已发现与 WT 小鼠对照组相比，WT 小鼠染尘组肺组织出现明显的损伤和炎性反应特征，具体表现为炎症细胞浸润以及肺泡结构的实质性破坏[6]，本结果与之共同提示肺损伤水平升高；并且石英粉尘可诱导促细胞凋亡相关因子 mRNA 和蛋白表达水平升高，抗凋亡因子 mRNA 和蛋白表达水平下降，说明石英粉尘引起肺组织细胞凋亡水平上升和肺部损伤。分别敲除 *Gas6* 或 *Mer* 基因的小鼠滴注石英粉尘悬液后，与单纯染尘小鼠比较，呈现 BALF 中 TP、LDH、AKP、ACP 水平下降，同时细胞凋亡水平下调；前期病理结果也显示，与 WT 小鼠相比，在暴露后的所有时间点上，石英粉尘诱导的炎症反应在 *Gas6*$^{-/-}$ 和 *Mer*$^{-/-}$ 小鼠肺组织中明显得到缓解[6]，提示阻断 *Mer* 或者 *Gas6* 可部分缓解石英粉尘导致的细胞凋亡和肺组织损伤。

肺损伤是由于肺受到外界刺激所引起的免疫反应导致的，主要病理特征为肺微血管通透性增高致富含蛋白质水肿液的肺泡水肿及透明膜的形成[8]。本研究发现小鼠经石英粉尘暴露后，BALF 中 TP、LDH、AKP、ACP 水平均升高。TP 是肺泡气血屏障完整性的标志，BALF 中 TP 的增加反映了肺泡上皮 - 毛细血管屏障的损伤程度加重[9]。早期 BALF 中 LDH 的升高主要来源于肺损伤后血液及组织液的渗漏，后期下降可能是由于 I、II 型肺泡上皮细胞进行自我修复，气血屏障功能恢复[10-11]。AKP 位于哺乳动物细胞质膜和 II 型肺泡细胞中，是反映肺泡细胞受损程度的特异标志物[12]。ACP 为溶酶体酶，BALF 中 ACP 升高主要是由肺巨噬细胞发挥吞噬作用而崩解死亡导致[13]。然而当 *Gas6* 或者 *Mer* 基因敲除之后，本研究发现 TP、LDH、AKP、ACP 水平均下降，表明肺损伤程度有所减轻。

细胞凋亡是指细胞为了维持机体内环境稳态而发生的一种主动性细胞死亡[14]。生理情况下，细胞凋亡是一种机体保护机制，但在受到某些外界刺激的条件下细胞凋亡过度激活，则会对机体产生不利影响。Bcl2 与 Bax 比值常用来反映细胞凋亡的水平，比值越大说明细胞凋亡受到抑制，反之细胞凋亡水平升高。本次研究结果显示，染尘后促凋亡因子 Bax 蛋白相对表达水平升高，抗凋亡因子 Bcl2 蛋白水平下降，Bcl2 与 Bax 的 mRNA 和蛋白比值均下降，这些变化在不同时间点均保持稳定，提示石英粉尘能够启动并提高小鼠肺组织细胞凋亡水平，与肺组织损伤同步。具体作用机制可能是：①石英粉尘与肺组织液接触后产生大量自由基，引起过度的氧化损伤，造成肺血管内皮细胞凋亡。内皮细胞损伤后，细胞间隙增大，血管通透性增加，液体和蛋白渗漏到肺泡内，引起 BALF 中上述多种蛋白酶水平升高。有研究表明，抗肺血管内皮细胞的凋亡可以减轻肺损伤[15-16]。②石英自身毒性可引起肺泡上皮细胞中 DNA 断裂、肺泡间隔增厚、中性粒细胞聚集、炎性因子分泌、蛋白含量增加，且 Bax 表达上调，Bcl-2 表达下降，肺损伤过程加重。研究表明，抑制肺泡上皮细胞凋亡是减轻肺损伤的有效途径之一[17]。

本研究从 TAM/Gas6 通路的角度观察到，Mer 受

体和Gas6参与了石英粉尘引起的细胞凋亡和肺组织损伤。既往研究显示，巨噬细胞表面的TAM受体，尤其是Mer受体，是石英粉尘识别并激活巨噬细胞的主要靶点，同时，Mer受体需要和Gas6配体结合后才能发挥作用[18]。因此，本研究推测*Gas6*和*Mer*基因敲除抑制了石英被巨噬细胞识别并吞噬，大大降低了肺部的炎性反应，进而下调凋亡因子*Bax*、*caspase-3*等的表达，同时降低了过度炎性反应对肺组织的损伤。另外，*Gas6*敲除后，TAM/Gas6通路被阻断，胞内酪氨酸激酶无法激活，导致细胞凋亡信号的启动受到抑制。研究发现对人单核细胞使用Mer受体抑制剂可以降低脂多糖对炎性因子的诱导作用[19]。Fourcot等[20]也发现*Gas6*缺乏可以预防小鼠肝脏炎症、脂肪性肝炎和肝纤维化。课题组前期研究也发现，通过对小鼠行*Gas6*或*Mer*基因敲除，可以明显减轻石英粉尘诱导的小鼠肺部炎性和肺纤维化[6]。

综上，石英粉尘可诱导小鼠肺损伤和肺组织细胞凋亡水平升高。阻断*Gas6*或*Mer*基因后，能够抑制石英粉尘引起的细胞凋亡，并在一定程度上缓解肺组织损伤水平。石英粉尘对呼吸系统及肺部的损伤是一个复杂的过程，并且细胞凋亡也受到其他多种基因的调控，如自由基、一氧化氮、兴奋性氨基酸等；由于凋亡是时间依赖性的过程，若要准确反映细胞凋亡典型的生物化学和形态特征，还需借助其他实验方法，如TUNEL法、流式细胞术、DNA凝胶电泳等，TAM/Gas6通路发挥作用的下游路径也需要进一步研究。

参考文献

[1] STEENLAND K，WARD E. Silica：a lung carcinogen [J]. CA Cancer J Clin，2014，64 (1)：63-69.

[2] SLUTSKY A S，RANIERI V M. Ventilator-induced lung injury [J]. N Engl J Med，2013，369 (22)：2126-2136.

[3] SEGAWA K，NAGATA S. An apoptotic ‘Eat Me’ signal：phosphatidylserine exposure [J]. Trends Cell Biol，2015，25 (11)：639-650.

[4] ESPINDOLA M S，HABIEL D M，NARAYANAN R，et al. Targeting of TAM receptors ameliorates fibrotic mechanisms in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Crit Care Med，2018，197 (11)：1443-1456.

[5] NGUYEN K Q，TSOU W I，KOTENKO S，et al. TAM receptors in apoptotic cell clearance，autoimmunity，and cancer [J]. Autoimmunity，2013，46 (5)：294-297.

[6] LI W，XIE L，MA J，et al. Genetic loss of Gas6/Mer pathway attenuates silica-induced lung inflammation and fibrosis in mice [J]. Toxicol Lett，2019，313：178-187.

[7] SCOTT R S，MCMAHON E J，POP S M，et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER [J]. Nature，2001，411 (6834)：207-211.

[8] 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征研究现状与展望 [J]. 解放军医学杂志，2003，28 (2)：97-101.

[9] FARINA F，SANCINI G，MANTECCA P，et al. The acute toxic effects of particulate matter in mouse lung are related to size and season of collection [J]. Toxicol Lett，2011，202 (3)：209-217.

[10] SHVEDOVA A A，KISIN E，MURRAY A R，et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice：inflammation，fibrosis，oxidative stress，and mutagenesis [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol，2008，295 (4)：L552-L565.

[11] DRENT M，COBBEN N A，HENDERSON R F，et al. Usefulness of lactate dehydrogenase and its isoenzymes as indicators of lung damage or inflammation [J]. Eur Respir J，1996，9 (8)：1736-1742.

[12] 刘宏，赵金垣，王世俊，等. 急性肺损伤大鼠肺灌洗液及血清中LDH，ALP，TC，TG及PL变化研究 [J]. 中国工业医学杂志，1995，8 (4)：196-199.

[13] 柏珺，崔琰，张青碧，等. 基于多次非暴露式气管滴注的染毒法研究温石棉致大鼠肺损伤的作用 [J]. 岩石矿物学杂志，2017，36 (6)：916-924.

[14] MAJTNEROVÁ P，ROUŠAR T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation [J]. Mol Biol Rep，2018，45 (5)：1469-1478.

[15] KOH H，TASAKA S，HASEGAWA N，et al. Protective role of vascular endothelial growth factor in endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. Respir Res，2007，8：60.

[16] LIU H，LIU L，FLETCHER B S，et al. Novel action of indoleamine 2，3-dioxygenase attenuating acute lung allograft injury [J]. Am J Respir Crit Care Med，2006，173 (5)：566-572.

[17] CHEN H，ZHANG L，JIN Z，et al. Anti-apoptotic PTD-FNK protein suppresses lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. Exp Mol Pathol，2007，83 (3)：377-384.

[18] LEMKE G，LU Q. Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors [J]. Curr Opin Immunol，2003，15 (1)：31-36.

[19] BARTH ND，MARWICK JA，HEEB MJ，et al. Augmentation of human monocyte responses to lipopolysaccharide by the protein S and Mer/Tyro3 receptor tyrosine kinase axis [J]. J Immunol，2018，201 (9)：2602-2611.

[20] FOURCOT A，COUCHIE D，CHOBERT M N，et al. Gas6 deficiency prevents liver inflammation，steatohepatitis，and fibrosis in mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol，2011，300 (6)：G1043-G1053.

（**英文编辑**：汪源；**责任编辑**：王晓宇）