

铁死亡在煤尘诱导小鼠煤工尘肺形成中的作用

刘太阳, 孙岳, 宝瑞, 郝玮, 王秋实, 刘耀阳, 王梦, 畅思容, 李媛媛, 刘志宏

宁夏医科大学公共卫生与管理学院/国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏 银川 750004

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21169

摘要:

[背景] 煤工尘肺(CWP)是一种危害严重的职业病,铁死亡是一种细胞程序性死亡方式,它是否参与了煤尘诱导CWP的形成须进一步探讨。

[目的] 阐明铁死亡在煤尘诱导小鼠CWP形成中的作用。

[方法] C57BL/6J小鼠被随机分为生理盐水组和CWP模型组,每组8只。采用气管滴注法造模,分别予以0.1 mL生理盐水或煤尘悬液 $0.1\text{ mL}(50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1})$ 经气管注入。通过HE染色和Masson染色评价CWP模型组小鼠肺部损伤及纤维化情况;铁离子检测试剂盒检测小鼠肺部铁离子浓度;分别检测丙二醛(MDA)浓度和荧光强度、谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)值评价小鼠肺部脂质过氧化情况;通过Western blotting和实时荧光定量PCR评价谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX₄)、铁蛋白的mRNA和蛋白表达水平。

[结果] CWP模型组小鼠肺部正常结构受损,肺泡壁厚度增加,出现炎症细胞浸润,胶原蛋白沉积较生理盐水组明显增加。CWP模型组小鼠肺组织铁离子质量浓度 $[(10.75\pm 5.42)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}]$,较生理盐水组 $[(1.14\pm 0.37)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}]$ 增加($P<0.01$)。CWP模型组小鼠肺组织MDA浓度 $[(37.32\pm 12.18)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$ 较生理盐水组 $[(18.70\pm 8.22)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}]$ 增加($P<0.01$)。CWP模型组小鼠肺组织MDA荧光强度高于生理盐水组。CWP模型组小鼠肺组织GSH/GSSG值 (1.50 ± 1.70) 较生理盐水组 (4.95 ± 2.86) 降低($P<0.01$)。CWP模型组小鼠肺组织GPX₄、铁蛋白的mRNA相对表达水平 $(14.29\pm 7.21、106.70\pm 36.70)$ 均较生理盐水组 $(38.84\pm 15.61、225.90\pm 54.34)$ 降低(均 $P<0.01$),同时GPX₄、铁蛋白的蛋白相对表达水平 $(0.92\pm 0.22、0.97\pm 0.09)$ 也均较生理盐水组 $(1.47\pm 0.54、1.73\pm 0.34)$ 降低(均 $P<0.05$)。

[结论] 铁死亡可能参与了煤尘诱导小鼠CWP的形成。

关键词: 煤工尘肺;铁死亡;脂质过氧化;谷胱甘肽过氧化物酶4;铁蛋白

Role of ferroptosis in coal dust induced mouse models of coal workers' pneumoconiosis LIU Taiyang, SUN Yue, BAO Rui, HAO Wei, WANG Qiushi, LIU Yaoyang, WANG Meng, CHANG Sirong, LI Yuanyuan, LIU Zhihong (School of Public Health and Management/NHC Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular Diseases Research, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract:

[Background] Coal workers' pneumoconiosis (CWP) is a serious occupational disease. Whether ferroptosis, a form of necrotic regulated cell death, is involved in coal dust induced mouse models of CWP needs further survey.

[Objective] This experiment is designed to elucidate the role of ferroptosis in the formation of CWP induced by coal dust in mice.

[Methods] C57BL/6J mice were randomly assigned to a saline group or a CWP group, with eight mice in each group. The mice were treated with 0.1 mL normal saline or 0.1 mL coal dust suspensions ($50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) via intra-tracheal instillation. HE staining and Masson staining were used to show lung injury and lung fibrosis. Iron concentration in mouse lung tissues was measured using iron assay kit. Lipid peroxidation was estimated in lung tissues by malondialdehyde (MDA) concentration and immunofluorescence intensity, and the ratio of glutathione (GSH) to L-glutathione oxidized (GSSG). Western blotting and real-time fluorescence-based quantitative PCR were used to test protein and mRNA expression levels of glutathione peroxidase 4 (GPX₄)

基金项目

国家自然科学基金项目(81960018, 82060264);宁夏回族自治区科学技术厅重点研发计划项目(2020BEG03008);宁夏医科大学校级科研项目(XT2018012)

作者简介

刘太阳(1989—),男,博士生;
E-mail: taiyangliu2021@163.com

通信作者

刘志宏, E-mail: zhihongliu2021@163.com

伦理审批

已获取

利益冲突

无申报

收稿日期

2021-04-25

录用日期

2021-09-09

文章编号

2095-9982(2021)11-1258-05

中图分类号

R114

文献标志码

A

►引用

刘太阳,孙岳,宝瑞,等.铁死亡在煤尘诱导小鼠煤工尘肺形成中的作用[J].环境与职业医学,2021,38(11):1258-1262.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21169

Funding

This study was funded.

Correspondence to

LIU Zhihong, E-mail: zhihongliu2021@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2021-04-25

Accepted

2021-09-09

► To cite

LIU Taiyang, SUN Yue, BAO Rui, et al. Role of ferroptosis in coal dust induced mouse models of coal workers' pneumoconiosis[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(11): 1258-1262.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21169

and ferritin in mice.

[Results] Coal dust injured pulmonary structure, thickened alveolar wall, and caused collagen deposition and infiltration of inflammatory cells in the CWP group. The iron concentration in the CWP group $[(10.75 \pm 5.42) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}]$ was higher than that in the saline group $[(1.14 \pm 0.37) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}]$ ($P < 0.01$). The MDA concentration in the CWP group $[(37.32 \pm 12.18) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ was higher than that in the saline group $[(18.70 \pm 8.22) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}]$ ($P < 0.01$). The immunofluorescence intensity of MDA in the CWP group was stronger than that in the saline group. The GSH/GSSG ratio decreased in CWP treated mice (1.50 ± 1.70) compared with the normal saline treated ones (4.95 ± 2.86) ($P < 0.01$). Compared with the saline group (38.84 ± 15.61 for GPX₄, 225.90 ± 54.34 for ferritin), the relative expression levels of GPX₄ and ferritin mRNA in the CWP group were downregulated (14.29 ± 7.21 for GPX₄, 106.70 ± 36.70 for ferritin) ($P < 0.01$). Compared with the saline group (1.47 ± 0.54 for GPX₄, 1.73 ± 0.34 for ferritin), the relative expression levels of GPX₄ and ferritin protein in the CWP group were also downregulated (0.92 ± 0.22 for GPX₄, 0.97 ± 0.09 for ferritin) ($P < 0.05$).

[Conclusion] Ferroptosis may be involved in the formation of coal workers' pneumoconiosis induced by coal dust in mice.

Keywords: coal workers' pneumoconiosis; ferroptosis; lipid peroxidation; glutathione peroxidase 4; ferritin

煤工尘肺(coal workers' pneumoconiosis, CWP)是一种由于在工作环境中长期吸入煤尘引起的肺部职业病,也被称为“黑肺病”^[1-3]。我国 2019 年新诊断的 15 947 名尘肺患者中, CWP 占新发尘肺的一半以上^[4]。由于 CWP 的发病机制尚未完全阐明, 目前临床上治疗手段主要为对症治疗及缓解并发症。

CWP 的发病机制复杂, 根据细胞类型及暴露时间不同, 涉及多种程序性细胞死亡方式及氧化损伤学说^[5-8], 包括凋亡、自噬等。凋亡在 CWP 的病程中扮演了重要角色。煤尘通过清道夫受体结合在巨噬细胞表面, 致使凋亡相关配体的表达上调, 诱导凋亡的发生。即使停止煤尘的暴露, 高水平的半胱氨酸蛋白酶和膜上调亡相关因子仍可促进疾病发展^[9]。自噬是细胞调节细胞组分合成和降解的方式, CWP 模型大鼠自噬活性增加, 在 CWP 患者巨噬细胞自噬溶酶体也可发现煤尘。本课题组在前期预实验中发现, 抑制 CWP 模型小鼠的凋亡、自噬后, CWP 的进展并未明显缓解, 因此猜想 CWP 的发生可能有其他机制参与。

铁死亡是 2012 年发现的一种调节性细胞死亡方式。铁离子过载是铁死亡发生的必备条件之一。游离铁介导的芬顿反应所产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和脂质过氧化被视为是铁死亡的经典事件。细胞组分发生脂质过氧化后将代谢为丙二醛(malondialdehyde, MDA), 因此 MDA 是评价脂质过氧化的灵敏指标之一。铁死亡由相关的蛋白执行^[10], 谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX₄)和铁蛋白被认为是触发铁死亡的重要执行蛋白, 其表达异常与铁死亡发生密切相关。研究已发现铁死亡与肺部疾病密切相关: Masahiro^[11]发现吸烟能够诱导肺部铁死亡的发生, 参与慢性阻塞性肺部疾病的病程; 研究人员利用电镜发现在放射线诱导的急性肺损伤模型中, 线粒体呈现出了典型的铁死亡形态, 提示急

性放射性肺损伤与铁死亡有关^[12]。煤尘中含有大量铁离子, 当煤尘被吸入肺部后, 巨噬细胞吞噬煤尘颗粒, 可引起铁离子在细胞及肺组织内沉积, 从而诱导铁死亡的发生。因此, 本研究建立小鼠 CWP 模型, 检测小鼠肺组织铁过载、脂质过氧化的情况, 探究铁死亡在 CWP 发病中是否发挥作用。

1 对象与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 宁夏医科大学实验动物中心提供 C57BL/6J 雄性小鼠, 体重(22 ± 2)g(8~10 周)。实验程序经宁夏医科大学实验动物中心实验动物伦理委员会审核, 编号: YXK(宁): 2020-493。

1.1.2 主要试剂 铁离子检测试剂盒、谷胱甘肽(glutathione, GSH)/L-氧化型谷胱甘肽(L-glutathione oxidized, GSSG)测试试剂盒(中国建成生物), MDA 检测试剂盒(中国贝博), 兔单克隆 GPX₄ 抗体、兔单克隆铁蛋白抗体、山羊多克隆 MDA-异硫氰酸荧光素(FITC)抗体(英国 abcam), 超敏化学发光试剂盒(中国亲科生物), 总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN, 中国), TB Green 嵌合荧光法试剂盒(日本 TaKaRa), 5×上样缓冲液(中国康为世纪), HE 染色试剂盒(中国北京雷根), Masson 染色试剂盒(中国索莱宝)。

1.1.3 主要仪器 酶标仪(130412C, 美国伯腾), 超微量分光光度计(SimpliNano, 美国通用), 激光共聚焦显微镜(LSM800, 日本蔡司), 化学发光成像系统(XBS+, 美国伯乐), 荧光定量 PCR 仪(qTower3G, 德国耶拿)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型建立 C57BL/6J 小鼠被随机分到生理盐水组或 CWP 模型组中, 每组 8 只。实验用煤尘采集自宁夏本地区石嘴山矿区, 高温高压灭菌后使用。采用气管滴注法复制小鼠动物模型, 操作过程如下: 将小

鼠置于充满异氟烷的塑料桶内进行麻醉(约 10~15 s), 麻醉后固定, 身体呈仰卧位, 脱毛膏去毛, 使用手术刀切开小鼠颈部皮肤, 小心分离周围脂肪组织, 将煤尘悬液 0.1 mL ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 或 0.1 mL 生理盐水迅速经气管滴注, 竖立小鼠, 保持小鼠直立体位, 轻轻晃动小鼠并按摩双肺 10 次, 使煤尘悬液或生理盐水进入肺内并均匀分布, 分层缝合, 标记并分笼饲养。造模后 8 周处死,

1.2.2 肺组织铁离子浓度测定 准确称取小鼠部分左肺肺组织, 按 1:9 的体积比与生理盐水混匀; 在 4°C 条件下机械匀浆, $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 离心半径 6 cm, 取上清液; 按说明书加入检测试剂, 在 520 nm 处测光密度值。

1.2.3 MDA 的检测 分别采用 MDA 试剂盒和免疫荧光法检测肺组织 MDA 浓度。MDA 试剂盒检测法: 分别按说明书配置硫代巴比妥酸(TBA)工作液、抗氧化剂、MDA 检测液、MDA 分离液。取标准品稀释至 1、2、5、10、20、 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 根据空白管、标准管、测定管加入相应反应体系; 混匀后 95°C 煮沸 40 min; $3000 \times g$ 离心 15 min 后, 取上清在波长 532 nm 处检测光密度值。免疫荧光法: 切取部分右肺组织制成冰冻切片, 冰冻切片从 -20°C 取出, 待其恢复至室温; 冷丙酮固定 20 min; 免疫组化笔划圈; 0.3% Triton-X100 孵育 10~20 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次, 每次 3 min; 5%血清封闭 30 min; 山羊多克隆抗 MDA-FITC 抗体 ($1:100$) 孵育, 4°C 过夜; 回温后 PBS 洗 5 次, 每次 5 min; $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)孵育 5 min, PBS 洗 5 次。用共聚焦显微镜进行荧光图片拍摄。

1.2.4 GSH/GSSG 值的测定 制备好左肺组织匀浆, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 离心半径 6 cm。取上清, 按 GSH 及 GSSG 体系加样, 样品置于酶标仪中, 在 405 nm 处测光密度值。

1.2.5 蛋白含量的检测 采用 Western blotting 检测蛋白表达。准确称取左肺组织 50 mg, 加入裂解缓冲液 1 mL, 玻璃匀浆仪匀浆, 按说明书提取蛋白。用二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。取适量 $5 \times$ 上样缓冲液与蛋白混匀, 100°C , 5 min 煮沸变性, 用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳, 浓缩胶(恒压 80 V), 分离胶(恒压 120 V); 然后湿式转入聚偏二氟乙烯(PVDF)膜中, 5%脱脂奶粉封闭液封闭 2 h, 敷一抗 4°C 过夜, 洗膜后加入相应二抗, 孵育 2 h, PBS 洗 5 次。用化学发光法检测蛋白条带, 计算目标蛋白条带灰度与内参照(β -actin)条带灰度之间的比值, 即代表目标蛋白的相对含量。各组实验重复 3 次。

1.2.6 mRNA 表达的检测 采用实时荧光定量 PCR

(RT-qPCR) 检测 mRNA 的表达。引物如下: GPX₄, 上游 5'-TGTGCATCCCGCGATGATT-3', 下游 5'-CCCTGTACTTATCCAGGCAGA-3'; 铁蛋白, 上游 5'-CAAGTGCGCCAGAACTACCA-3', 下游 5'-ACAGATAGACGTAGGAGGCATAC-3'; GAPDH, 上游 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTG-3', 下游 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA-3'。RT-qPCR 反应体系如下: 30 s 变性 (95°C), 5 s 退火 (95°C), 30 s 延伸 (60°C), 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达水平。

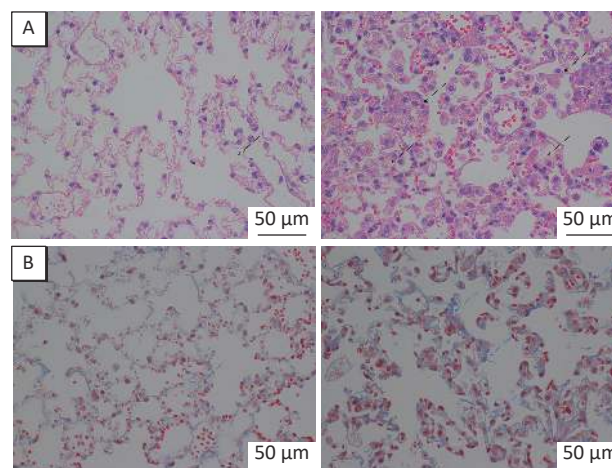
1.3 统计学方法

采用 GraphPad 8.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验; 双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肺组织病理学变化

HE 染色发现, CWP 模型组小鼠肺部正常结构受损, 肺泡壁厚度增加, 出现炎症细胞浸润, 生理盐水组小鼠没有显著的病理变化(图 1A)。Masson 染色发现, CWP 模型组小鼠肺部胶原蛋白沉积较生理盐水组明显增加(图 1B)。CWP 模型组小鼠造模成功。



[注] A: HE 染色; B: Masson 染色; 1: 生理盐水组; 2: CWP 模型组。比例尺=50 μm 。红色箭头代表炎症细胞浸润, 黑色箭头代表破坏的肺泡结构, 蓝色箭头代表胶原沉积。

图 1 两组小鼠肺部损伤及纤维化情况

Figure 1 Lung injury and fibrosis of mice in each group

2.2 肺组织铁离子变化

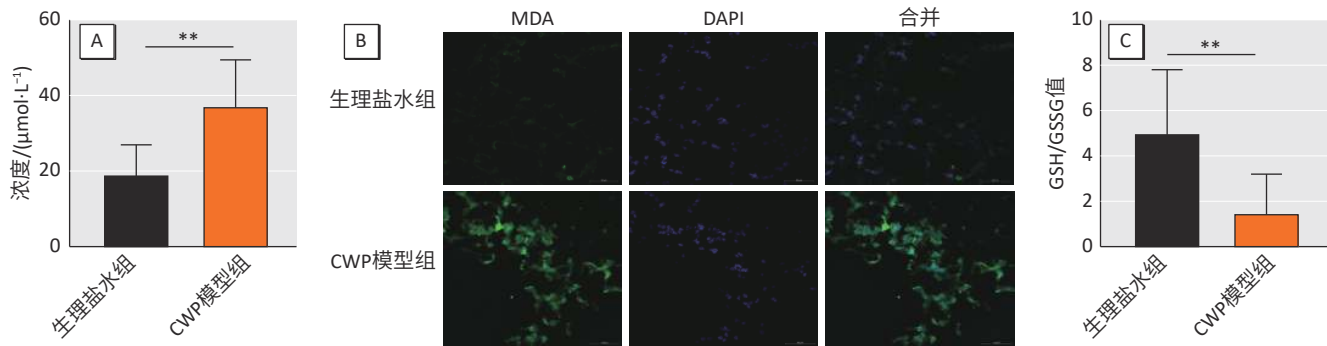
检测结果显示, CWP 模型组小鼠肺组织铁离子质量浓度 [$(10.75 \pm 5.42) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] 较生理盐水组 [$(1.14 \pm 0.37) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$] 增加 ($P < 0.01$)。

2.3 肺组织脂质过氧化指标变化

CWP 模型组小鼠肺组织 MDA 浓度 [$(37.32 \pm 12.18) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 较生理盐水组 [$(18.70 \pm 8.22) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]

增加($P < 0.01$) (图 2A)。CWP 模型组小鼠肺组织 MDA 荧光强度高于生理盐水组 (图 2B)。CWP 模型组小鼠

肺组织 GSH/GSSG 值(1.50 ± 1.70)较生理盐水组(4.95 ± 2.86)降低($P < 0.01$) (图 2C)。



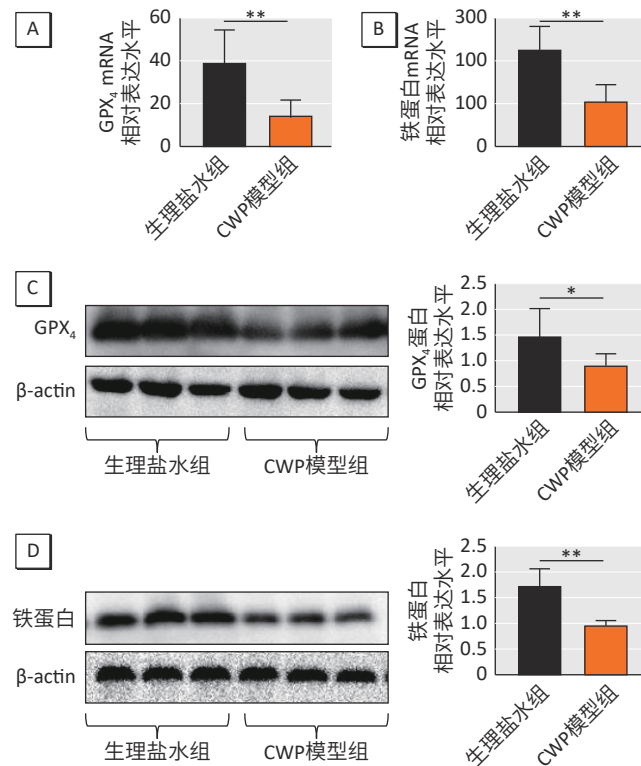
[注] A: MDA 浓度; B: 绿色荧光代表 MDA, 蓝色荧光代表细胞核, 比例尺=50 μm; C: GSH/GSSG 值。**: $P < 0.01$ 。

图 2 两组小鼠肺组织脂质过氧化指标变化情况 ($n=8$)

Figure 2 Lipid peroxidation of lung tissue sections of mice in each group ($n=8$)

2.4 GPX₄、铁蛋白的 mRNA 和蛋白表达变化

CWP 模型组小鼠肺组织 GPX₄、铁蛋白的 mRNA 相对表达水平 (14.29 ± 7.21 、 106.70 ± 36.70) 均较生理盐水组 (38.84 ± 15.61 、 225.90 ± 54.34) 降低 (均 $P < 0.01$) (图 3A、图 3B), 同时 GPX₄、铁蛋白的蛋白相对表达水平 (0.92 ± 0.22 、 0.97 ± 0.09) 也均较生理盐水组 (1.47 ± 0.54 、 1.73 ± 0.34) 降低 (均 $P < 0.05$) (图 3C、图 3D)。



[注] A: GPX₄ 的 mRNA 相对表达水平; B: 铁蛋白 mRNA 相对表达水平; C: GPX₄ 的蛋白电泳条带与相对表达水平; D: 铁蛋白的蛋白电泳条带与相对表达水平。*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ 。

图 3 两组小鼠 GPX₄、铁蛋白的 mRNA 和蛋白表达情况 ($n=8$)

Figure 3 mRNA and protein expressions of GPX₄ and ferritin of mice in each group ($n=8$)

3 讨论

本研究发现煤尘能增加 CWP 模型组小鼠模型中铁离子浓度, 并且能够诱导 CWP 模型组小鼠模型发生脂质过氧化, 导致 MDA 增加及 GSH/GSSG 值的降低, 诱导铁死亡相关的 GPX₄ 和铁蛋白发生改变。以上结果提示 CWP 的发病中涉及铁死亡的发生。

铁死亡是一种由脂质过氧化所诱导的程序性细胞死亡方式^[10]。细胞内环境中的铁离子累积可以触发芬顿反应, 产生过量 ROS, 进而导致胞内脂质过氧化物的发生^[13]。因此, 铁离子的代谢对铁死亡的敏感性有极其重要的影响。铁离子的代谢包括摄入、转出、储存。转铁蛋白和转铁蛋白受体负责从细胞外环境摄入铁离子, 可以调控铁死亡的发生^[14]。一旦敲除铁离子代谢的关键基因可以抑制铁死亡的发生^[10]。本研究发现, 在 CWP 模型组小鼠模型中铁离子浓度高于生理盐水组, 提示 CWP 模型组小鼠模型发生铁过载, 可能诱导铁死亡的发生。细胞发生脂质过氧化的主要原因是由于多不饱和脂肪酸结构容易被 ROS 攻击, 从而诱发铁死亡。本研究通过 MDA 和 GSH/GSSG 值检测发现, 煤尘诱导了 CWP 模型组小鼠脂质过氧化的发生。由于煤尘导致 CWP 模型组小鼠发生铁过载, 过载的铁离子通过芬顿反应产生的 ROS 诱导了脂质过氧化的发生, 进而促进铁死亡参与 CWP 的发生。因此推测铁过载及脂质过氧化在铁死亡参与 CWP 发病中都发挥了巨大作用。

目前研究揭示, 铁死亡与一些特异性的基因或蛋白密切相关。GPX₄ 是一种硒蛋白家族成员, 细胞为了维持氧化还原稳态, GPX₄ 将 GSSG 还原为 GSH, 防止细胞脂质过氧化发生。目前认为 GPX₄ 是调节铁死亡的

关键蛋白之一,将其敲除后小鼠胚胎细胞死亡率会相应增加,导致胚胎的死亡^[15-17]。本研究发现,在 CWP 模型组小鼠中,GPX₄ 表达较生理盐水组明显减少。GPX₄ 减少意味着煤尘可能诱导 CWP 模型组小鼠铁死亡的发生。细胞通过转铁蛋白受体将铁离子摄入后,释放于胞内的不稳定铁池中,过量的铁则储存在铁蛋白中。因此铁蛋白含量的减少,暗示了更多的游离铁释放于不稳定铁池中,利于芬顿反应的发生。本次实验也发现在 CWP 模型组小鼠中,铁蛋白明显减少,可释放更多的游离铁,驱动铁死亡的发生。

本研究首次证实了在 CWP 的发病机制中涉及铁死亡的发生。但本研究没有就煤尘如何诱导 CWP 发生铁死亡提出一个准确的理论,未来将针对铁死亡在 CWP 发生的具体机制进行进一步研究。

参考文献

- [1] LI X, DUAN L, YUAN S, et al. Ferroptosis inhibitor alleviates radiation-induced lung fibrosis (RILF) via down-regulation of TGF- β 1[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2019, 16: 11.
- [2] LONGSTRETH GF, THOMPSON WG, CHEY WD, et al. Functional bowel disorders[J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(5): 1480-1491.
- [3] BLACKLEY DJ, CRUM JB, HALLDIN CN, et al. Resurgence of progressive massive fibrosis in coal miners —eastern Kentucky, 2016[J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2016, 65(49): 1385-1389.
- [4] National Health Commission of the PRC. The national occupational disease report[R]. Beijing: National Health Commission of the PRC, 2019.
- [5] ZHOU QF, ZHU YP, WU DC, et al. Study on the relationship between nitric oxide, antioxidants, antioxidant enzymes and silicosis[J]. *Environ Occup Med*, 1999, 43(1): 7-33.
- [6] VALLYATHAN V, SHI X, CASTRANOVA V. Reactive oxygen species: their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis[J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106(Suppl5): 1151-1155.
- [7] KALLINY MS, BASSYOUNI MI. Immune response due to silica exposure in Egyptian phosphate mines[J]. *J Health Care Poor Underserved*, 2011, 22(4Suppl): 91-109.
- [8] MAEDA M, NISHIMURA Y, KUMAGAI N, et al. Dysregulation of the immune system caused by silica and asbestos[J]. *J Immunotoxicol*, 2010, 7(4): 268-278.
- [9] YAO SQ, ROJANASAKUL LW, CHEN ZY, et al. Fas/FasL pathway-mediated alveolar macrophage apoptosis involved in human silicosis[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(12): 1195-1204.
- [10] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [11] YOSHIDA M, MINAGAWA S, ARAYA J, et al. Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3145.
- [12] PETSONK EL, ROSE C, COHEN R. Coal mine dust lung disease. New lessons from an old exposure[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013, 187(11): 1178-1185.
- [13] STOCKWELL BR, ANGELI JP F, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [14] GAO M, MONIAN P, QUADRI N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 298-308.
- [15] SAKAI O, UCHIDA T, IMAI H, et al. Glutathione peroxidase 4 plays an important role in oxidative homeostasis and wound repair in corneal epithelial cells[J]. *FEBS Open Bio*, 2016, 6(12): 1238-1247.
- [16] SAKAI O, UCHIDA T, ROGGIA MF, et al. Role of glutathione peroxidase 4 in glutamate-induced oxytosis in the retina[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0130467.
- [17] IMAI H, HIRAO F, SAKAMOTO T, et al. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 305(2): 278-286.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)