

溶酶体膜蛋白 *Sid2* 介导肝脏细胞的凋亡:不通过抑制自噬溶酶体途径

许家豪^{1,2,3}, 耿梦雅^{1,2,3}, 刘海军^{4,5}, 裴文俊⁴, 顾静^{1,2,3}, 漆梦湘³, 章尧^{4,5}, 吕坤^{6,7}, 宋迎迎^{1,2,3}, 刘苗苗⁴, 胡鑫^{1,2,3}, 余翠⁸, 何春玲¹, 王李卓^{4,5}, 高家林^{1,2,4,6,7}

皖南医学院¹弋矶山医院内分泌科,²弋矶山医院内分泌糖尿病研究所,³临床医学院,⁴安徽省活性生物大分子研究安徽省重点实验室,⁵基础医学院生化教研室,⁶中心实验室,⁷重大疾病非编码RNA转化研究安徽普通高校重点实验室,⁸皖南医学院第二附属医院内分泌科,安徽 芜湖 241002

摘要:目的 研究溶酶体膜蛋白 *Sid2* 敲除后在肝脏细胞中调控凋亡的途径。方法 利用 Crispr-Cas9 技术构建 *Sid2* 敲除的人肝脏(HL7702)细胞模型,检测 *Sid2* 和自噬关键蛋白 LC3-II/I、P62 蛋白水平,MDCC 染色观察自噬体形成情况,通过 EdU 和流式细胞实验观察 *Sid2* 对肝脏细胞增殖活性和凋亡的影响,并且使用 0、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的氯喹(CQ)摸索肝脏细胞 CQ 饱和和浓度,检测对其自噬流的影响,以及使用 CQ 进一步探索影响肝脏细胞的增殖活性其凋亡水平的机制。结果 成功构建 HL7702 细胞 *Sid2*^{+/+} 组及 *Sid2*^{-/-} 组。*Sid2* 基因缺失可导致肝脏细胞增殖被抑制和凋亡水平的增加,自噬关键蛋白 LC3-II/I 和 P62 在蛋白水平上的表达均增加且自噬体含量增加($P < 0.05$)。结果显示 50 $\mu\text{mol/L}$ CQ 作用下肝脏细胞自噬达到饱和状态,50 $\mu\text{mol/L}$ CQ 使 *Sid2* 基因缺失时 LC3B 和 P62 的表达均增加($P < 0.05$),且 CQ 进一步降低肝脏细胞活性,并促进其凋亡水平($P < 0.05$)。结论 在离体水平上,*Sid2* 基因剔除后,HL7702 细胞可表现自噬通路的异常,并且不通过抑制自噬溶酶体途径介导和调控凋亡。

关键词: *Sid2*; 人肝脏细胞; 凋亡; 自噬; 增殖

Lysosomal membrane protein *Sid2* knockout induces apoptosis of human hepatocytes *in vitro* independent of the autophagy-lysosomal pathway

XU Jiahao^{1,2,3}, GENG Mengya^{1,2,3}, LIU Haijun^{4,5}, PEI Wenjun⁴, GU Jing^{1,2,3}, QI Mengxiang³, ZHANG Yao^{4,5}, LÜ Kun^{6,7}, SONG Yingying^{1,2,3}, LIU Miaomiao⁴, HU Xin^{1,2,3}, YU Cui⁸, HE Chunling¹, WANG Lizhuo^{4,5}, GAO Jialin^{1,2,4,6,7}

¹Department of Endocrinology and Genetic Metabolism, ²Institute of Endocrine and Metabolic Diseases, Yijishan Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241002, China; ³School of Clinical Medicine, ⁴Anhui Provincial Key Laboratory of Biological Macro-molecules Research, ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, ⁶Central Laboratory, ⁷Anhui Provincial College Key Laboratory of Non-coding RNA Transformation Research on Critical Diseases, Wannan Medical College, ⁸Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

Abstract: Objective To explore the regulatory mechanism of human hepatocyte apoptosis induced by lysosomal membrane protein *Sid2* knockout. **Methods** The *Sid2* knockout (*Sid2*^{-/-}) cell model was constructed in human hepatocyte HL7702 cells using Crispr-Cas9 technology. The protein levels of *Sid2* and key autophagy proteins LC3-II/I and P62 in the cell model were detected using Western blotting, and the formation of autophagosomes was observed with MDC staining. EdU incorporation assay and flow cytometry were performed to observe the effect of *Sid2* knockout on cell proliferation and apoptosis. The effect of chloroquine at the saturating concentration on autophagic flux, proliferation and apoptosis of *Sid2* knockout cells were observed. **Results** *Sid2*^{-/-} HL7702 cells were successfully constructed. *Sid2* knockout significantly inhibited the proliferation and increased apoptosis of the cells, causing also increased protein expressions of LC3-II/I and P62 ($P < 0.05$) and increased number of autophagosomes. Autophagy of the cells reached a saturated state following treatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ chloroquine, and at this concentration, chloroquine significantly increased the expressions of LC3B and P62 in *Sid2*^{-/-} HL7702 cells. **Conclusion** *Sid2* gene knockout causes dysregulation of the autophagy pathway and induces apoptosis of HL7702 cells, and the latter effect is not mediated by inhibiting the autophagy-lysosomal pathway.

Keywords: *Sid2*; human liver cells; apoptosis; autophagy; proliferation

收稿日期:2022-07-12

基金项目:国家自然科学基金(81471002,81800766);安徽省自然科学基金(2108085MH267);安徽省大学生创新创业训练计划项目(202010368117);活性生物大分子研究安徽省重点实验室自主研究课题(LAB201808);2022年皖南医学院大学生科研资助项目(WK2022XS50);皖南医学院校级重点科研基金项(WK2020Z02);皖医弋矶山医院“高峰”培育计划(GF2019J07);皖医弋矶山医院“攀峰”培育计划(PF2019013)

Supported by National Natural Science Foundation of China (81471002, 81800766).

作者简介:许家豪,本科,E-mail: xjh1269894037@163.com

通信作者:高家林,博士,教授,E-mail: gaojialin@wnmc.edu.cn;王李卓,副教授,E-mail: 19277984@qq.com

目前,溶酶体为细胞稳态关键调节剂的角色^[1]。作为溶酶体中众多特殊蛋白质的一种,溶酶体膜蛋白的作用与机制以及相应的生理学功能在其维持细胞稳态中发挥了重要作用^[2]。研究报道,人肾优势蛋白 NCU-G1 作为一种高度保守的蛋白质,其缺失会导致小鼠自发性的肝纤维化^[3]。溶酶体相关膜糖蛋白 3 通过影响小鼠气道阻力,在调节肺表面活性剂稳态方面至关重要^[4]。在帕金森病相关的小鼠模型中,跨膜蛋白 175 能够影响运动损伤和多巴胺能神经元的数量,而在帕金森病中起到重要作用^[5]。因此,了解溶酶体膜蛋白参与的发生发展

机制对阐明其关键作用有重要价值。然而,尽管已有100多种溶酶体膜蛋白被发掘和深入研究^[6],但部分溶酶体膜蛋白的作用靶点和介导机制仍然未知。

作为细胞死亡的一种主动机制,细胞凋亡同时也是众多生物系统中的重要过程^[7]。程序性细胞死亡可在溶酶体膜透化和内容物的释放过程中发生,这样使得在溶酶体膜蛋白循环利用的同时,受损溶酶体功能也能得到逐渐恢复^[8]。这种特殊的生理过程在溶酶体膜蛋白中有不可替代的作用。研究发现溶酶体相关多跨膜蛋白5水平的下调抑制了细胞增殖和其活力^[8],溶酶体跨膜蛋白192的缺乏也会激活细胞凋亡的发生^[9]。可见溶酶体膜蛋白与凋亡密不可分的关系。

SID1跨膜家族成员2(*Sidt2*)被发现是一种新型多通道溶酶体膜蛋白^[10],已有研究发现*Sidt2*作为自噬-溶酶体降解途径中的关键蛋白,对维持同样是富含溶酶体的肾脏组织具有重要作用^[11]。研究指出*Sidt2*可通过调节终末期的自噬来影响肝细胞的脂质代谢^[12]和引发自噬受损^[13],但对于其凋亡的具体机制并未得到探究。溶酶体参与消化细胞内和细胞外的物质,是否涉及自噬调节和介导的相关步骤尚未知?因此,本研究旨在发掘*Sidt2*引起肝脏细胞凋亡的潜在机制,希望为相关疾病干预找到潜在的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

HL7702人肝脏细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),用含有10%FBS(Excell Bio)的1640培养液培养,细胞培养箱的温度保持在37℃,CO₂浓度保持在5%。CQ(Sigma),用DMSO配制成CQ工作液,4℃冰箱保存。细胞自噬染色检测(MDC)试剂盒(碧云天)。

1.2 使用CRISPR/Cas9基因编辑慢病毒载体系统剔除*Sidt2*基因

购买Lenticrispr-v2(AddgenePlasmid49535)质粒,利用sgRNA在线设计工具(<http://crispr.mit.edu/>)设计靶向*Sidt2*的sgRNA,序列如下(F:5'-CACCGCAGGTGCCCCTAATCCTGCG-3', R:5'-AAACCGCAGGATTA GGGGCACCTGC-3'),通过生物公司(SangonBiotech)进行合成,使用CRISPR/Cas9 lentivirus system,将Lenticrispr-v2质粒线性化,与退火的sgRNA双链进行连接,构建Lenticrispr-v2-*Sidt2*重组质粒。使用Vigofect(VigorousBiotechnology, China)转染试剂,分别转染Lenticrispr-v2质粒和Lenticrispr-v2-*Sidt2*重组质粒构建慢病毒,将得到的慢病毒转染HL7702细胞,48h后使用嘌呤霉素筛选72h,生存下来的细胞即为转染成功的*Sidt2*^{+/+}组和*Sidt2*^{-/-}组。

1.3 Western blot 实验

将分组处理后的HL7702细胞,用冰PBS洗涤2次后加入含PMSF(碧云天)的细胞裂解液,收集全部细胞裂解液,使用超声波细胞粉碎机(新芝生物科技有限公司)裂解细胞2次,冰上静置裂解细胞30 min,收集裂解液,放入预冷4℃的超高冷冻离心机(Beckman)离心5~10 min,12 000 g。分装100 μL/管蛋白裂解液,加入25 μL 5×SDS-PAGE上样缓冲液充分混匀,100℃煮沸10 min后进行电泳。将电泳结束后分离的蛋白转印至PVDF膜上。用含有1 g脱脂奶粉和20 mL 1×TBST溶液的封闭液进行封闭2 h。TBST轻柔漂洗后加入相应的一抗4℃孵育过夜,兔抗LC3B(1:1000; Cell signaling technology),鼠抗β-actin(1:1000; Sigma-Aldrich),鼠抗P62(1:1000; abcam),兔抗SIDT2(1:1000; abnova),TBST清洗3次10 min/次后加入二抗中室温孵育1.5~2 h, TBST清洗3次、10 min/次后使用ECL发光液和成像系统进行显影实验结果。所有结果均使用Image J软件对蛋白的相对表达量进行统计。

1.4 EdU细胞增殖检测实验

取24孔板中各实验组处于对数生长期的细胞,加入用完全培养基1000:1稀释后的试剂A,混匀后孵育2 h,弃去培养基,用PBS清洗细胞2次,5 min/次,加入150 μL/孔多聚甲醛,根据细胞状态调整孵育时间,弃去固定液,每孔加入150 μL甘氨酸,孵育5 min后弃去,加入300 μL/孔PBS清洗5 min后弃去,加入300 μL/孔渗透剂(0.5% TritonX-100的PBS),孵育10 min, PBS清洗1次,5 min,加入300 μL/孔的1×Apollo染色液,避光孵育30 min后弃去,加入300 μL/孔渗透剂脱色清洗2~3次,10 min/次,弃去,加入100 μL/孔1×Hoechst33342反应液孵育0.5 h, PBS清洗3次,5 min/次,使用Olympus CKX53荧光倒置显微镜进行拍照记录。

1.5 流式细胞术

取12孔板中细胞数量不低于1×10⁵的实验组,用不含有EDTA的胰酶对贴壁的HL7702细胞进行消化收集,在预冷的4℃离心机中2000 r/min离心5 min收集悬浮细胞,4℃预冷的PBS洗涤细胞两次后,以2000 r/min离心5 min收集1×10⁵~5×10⁵后,每个离心管中加入500 μL的Binding Buffer进一步悬浮细胞,各实验组加入5 μL Annexin V-FITC混匀后,加入5 μL Propidium Iodide,混匀后室温避光孵育5~15 min,并在1 h内进行流式细胞仪(Beckman cytoflex)的上机检测。

1.6 细胞自噬染色检测试剂盒(MDC法)

将细胞接种在玻底培养皿上, PBS清洗1次后加入MDC染液,在细胞培养箱中37℃避光孵育15 min后,吸净MDC染色液, Assay Buffer清洗3次,再加入1 mL Assay Buffer,置于在激光共聚焦显微镜(Olympus,

Japan)在激发波长为330~360 nm,发射波长为510~540 nm观察自噬体的染色荧光强度。

1.7 统计学分析

使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析。数据表示为均数±标准差,两组间比较使用t检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。本研究各实验组的实验均至少独立重复3次。

2 结果

2.1 *Sid2*基因剔除HL7702细胞表现出细胞增殖活性下降

对HL7702细胞使用Crispr-Cas9技术进行*Sid2*基因的敲除,挑取单克隆细胞后进行测序,测序结果显示模型构建成功。Western blot结果显示,*Sid2*^{-/-}组较*Sid2*^{+/+}组蛋白水平降低($P < 0.05$,图1A、B),模型构建成功。EdU实验结果显示,与野生对照组细胞相比较,*Sid2*基因下调导致肝HL7702细胞增殖速率下降(图1C、D)。

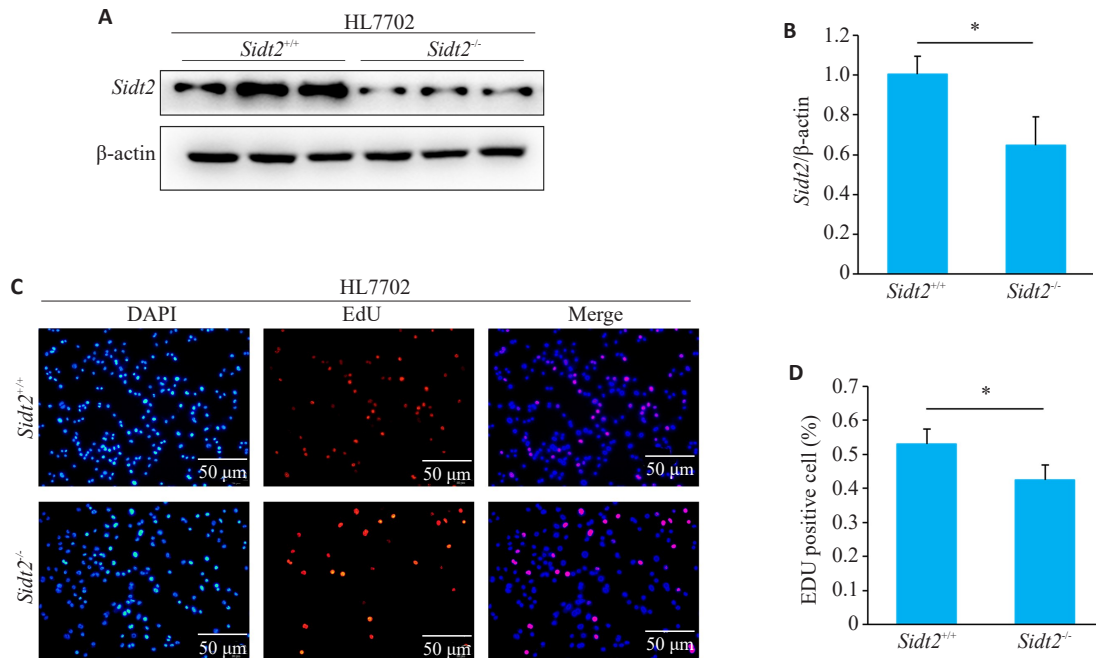


图1 *Sid2*剔除HL7702细胞表现出细胞增殖活性下降

Fig.1 *Sid2* knockout (*Sid2*^{-/-}) HL7702 cells exhibit decreased cell proliferation. A, B: Western blotting for detecting *Sid2* protein expression before and after *Sid2* knockout. C, D: EdU experiments for assessing cell proliferation rates in *Sid2*^{+/+} and *Sid2*^{-/-} HL7702 cells. * $P < 0.05$.

2.2 *Sid2*基因剔除HL7702细胞表现出凋亡增加

流式细胞术结果显示,在野生对照组细胞中,晚期凋亡和早期凋亡细胞的比例是2.80±0.50%,而在*Sid2*基

因缺失组的细胞中,晚期凋亡和早期凋亡细胞的比例是14.43±0.55%,即与野生对照组细胞相比较,*Sid2*基因下调导致肝HL7702细胞凋亡速率明显升高(图2, $P < 0.001$)。

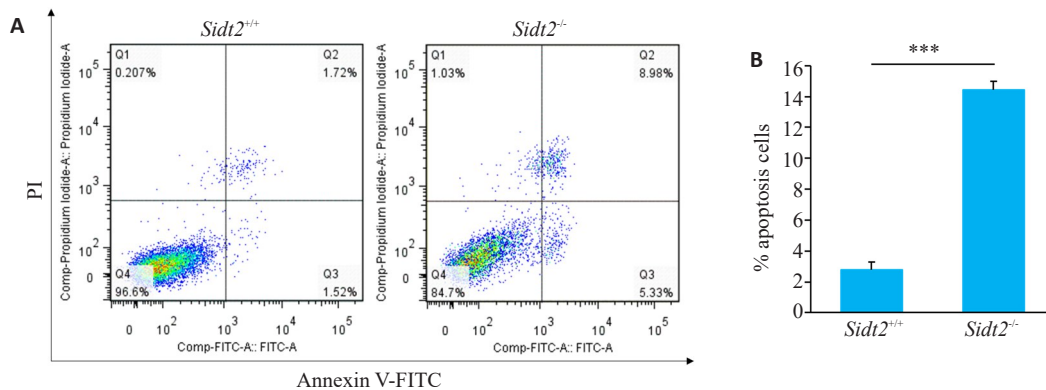


图2 *Sid2*剔除HL7702细胞表现出凋亡增加

Fig.2 *Sid2*^{-/-} HL7702 cells exhibit increased apoptosis. A: Detection of apoptosis rate of the cells by flow cytometry; B: Quantitative analysis of the results. *** $P < 0.001$.

2.3 *Sidt2* 基因剔除 HL7702 细胞表现出自噬紊乱

对 *Sidt2* 基因剔除 HL7702 细胞模型进行基础自噬水平的检测 (图 3A), 显示 *Sidt2*^{-/-} 细胞比较其对照细

胞, 出现了自噬关键蛋白 LC3B 和 P62 的堆积的现象 ($P < 0.05$, 图 3B), *Sidt2*^{-/-} 细胞的荧光强度大于对照组 ($P < 0.01$, 图 3C、D), 自噬小体含量较对照组增多。

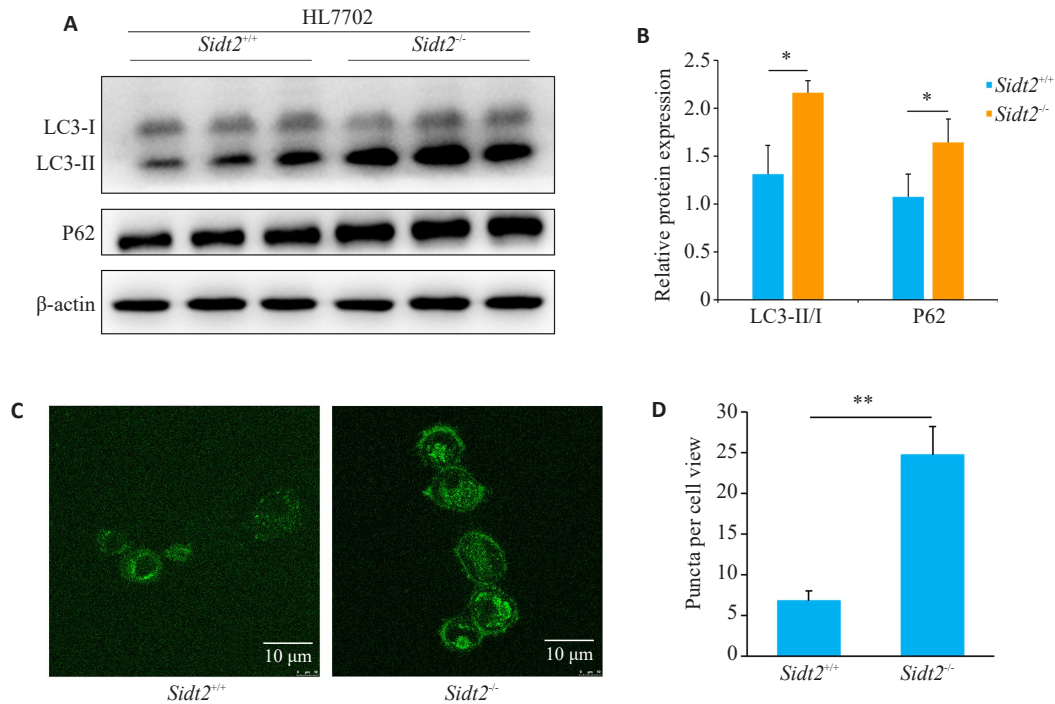


图3 *Sidt2* 剔除 HL7702 细胞表现出自噬紊乱

Fig.3 *Sidt2*^{-/-} HL7702 cells exhibit autophagy disturbances. **A, B**: Western blotting for detecting the expression of the key autophagy proteins before and after *Sidt2* knockout. **C, D**: Effects of *Sidt2* on the formation of autophagosomes of HL7702 cells and quantitative analysis of the results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 CQ 可以纠正 *Sidt2* 下调引起的 LC3B 和 P62 的升高异常

通过设置 0、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 的不同 CQ 浓度梯度干预, 结果显示当 CQ 作用浓度达到 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 继续增加 CQ 的作用浓度, LC3B 和 P62 的相对表达量不再增加, 即 CQ 的饱和浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ (图 4A~C)。经过 50 $\mu\text{mol/L}$ 饱和浓度的 CQ 处理 16 h 后, HL7702 细胞中的 LC3B 的降解被充分阻断。此时, 发现 *Sidt2*^{+/+} 和 *Sidt2*^{-/-} 组间原有的 LC3B 丰度差异消失 (图 4D~F)。

2.5 CQ 进一步抑制细胞增殖, 并使凋亡进一步恶化

经 50 $\mu\text{mol/L}$ 饱和浓度的 CQ 处理 16 h 后, 结果显示, 不管是对 *Sidt2*^{+/+} 或 *Sidt2*^{-/-} 细胞而言, 饱和浓度的 CQ 作用下, 两组细胞的增殖活性均明显受到抑制 ($P < 0.05$, 图 5A、B), 其凋亡率均明显受到促进 ($P < 0.05$, 图 5C、D)。

3 讨论

已有研究证据指出, 溶酶体膜蛋白与肝脏功能和结构稳态密切相关^[3, 14, 15]。不仅如此, 作为溶酶体膜蛋白, *Sidt2* 还被证实在系膜细胞的炎症通路^[16], 糖脂代谢^[17] 以及骨骼肌中线粒体质量控制^[18] 中都发挥了重要的作

用。而在同为溶酶体膜蛋白相关的研究中, 凋亡相关蛋白 3 参与到维甲酸诱导细胞凋亡的过程中^[19], 溶酶体相关膜蛋白 3 通过介导溶酶体膜透化引发细胞死亡^[20], 这些研究提示 *Sidt2* 可能与细胞凋亡密切相关。因此, 本研究使用 Crispr-Cas9 技术构建了 *Sidt2* 敲除的人肝脏 HL7702 细胞模型, 并且研究了 *Sidt2* 缺失对人肝脏细胞凋亡发生的影响及作用机制。通过 EdU 细胞增殖检测实验和流式细胞术检测细胞的活性, 研究表明 *Sidt2* 缺失后可导致人肝脏细胞状态有所下调, 使其增殖活性下降和凋亡率的增加。

自噬作为细胞和身体代谢的关键参与者^[21], 常见的自噬类型有: 巨自噬, 伴侣介导的自噬以及微自噬^[22, 23], 巨自噬即为本文中的自噬。有研究发现自噬与溶酶体膜蛋白的关系也密不可分, 例如跨膜 7 超家族成员 1 被证实是小鼠足细胞中重要的自噬调节蛋白^[24]。对此, 我们展开了 *Sidt2* 对自噬影响的深入研究。结果显示, 自噬关键蛋白 LC3B 和自噬底物 P62 的水平在 *Sidt2* 敲除后升高, 即 *Sidt2* 缺失后出现自噬体的积累, 这可能意味着自噬体数量增加或通过自噬体和溶酶体的融合阻断自噬溶酶体的形成^[25]。在影响肾脏的结构和自噬的研

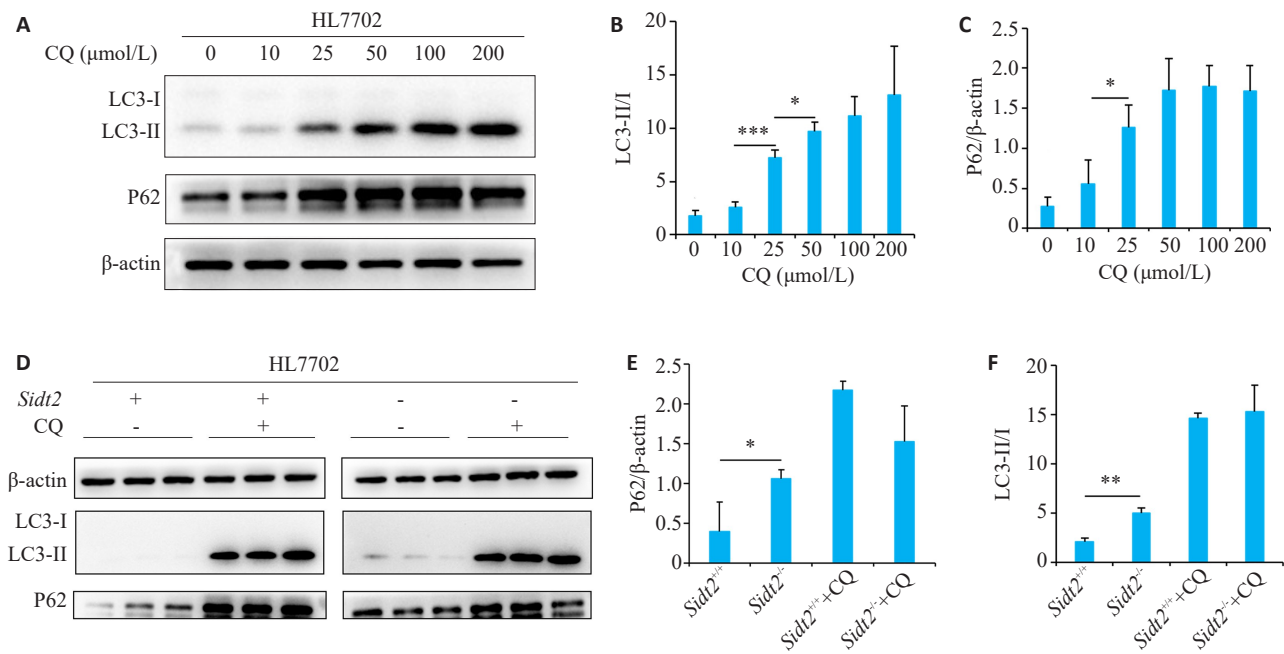


图4 CQ可以纠正*Sidt2*下调引起的LC3B和P62的升高异常

Fig 4 Chloroquine (CQ) can correct abnormal upregulation of LC3B and P62 expressions induced by *Sidt2* knockout. A: Western blotting for detecting LC3B and P62 expressions in HL7702 cells incubated with 0, 10, 25, 50, 100, or 200 μmol/L CQ for 16 h; B: LC3B expression level in HL7702 cells; C: P62 expression level in HL7702 cells; D-F: Western blotting for detecting key autophagy proteins in HL7702 cells before and after *Sidt2* knockout. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

究中,*Sidt2*缺失后发现自噬体与溶酶体的融合以及自噬溶酶体的降解受损,结果充分揭示了*Sidt2*在自噬溶酶体过程中至关重要^[11]。溶酶体作为自噬过程中的重要细胞器^[26],自噬的降解能力来自于溶酶体^[27]。结合课题组前期的研究结果^[7],通过完成对自噬小体及溶酶体标记蛋白免疫荧光共定位的检测和使用溶酶体示踪剂LysoTracker对*Sidt2*基因缺失前后酸性溶酶体进行标记,结果发现*Sidt2*^{-/-}组较*Sidt2*^{+/+}组相比,LC3B与LAMP1的皮尔森相关系数降低,自噬小体与溶酶体融合减少,同时酸性溶酶体数量也发生了减少。因此,为了进一步探索阻断自噬溶酶体途径是否会由*Sidt2*介导肝脏细胞自噬的调控机制,我们研究了靶向自噬药物CQ通过抑制自噬下游以观察自噬通量的变化情况,CQ通过影响溶酶体的功能来抑制自噬中自噬体和溶酶体融合的过程^[28],经典氯喹翻转实验发现*Sidt2*缺失引起的自噬流减少是由于自噬晚期障碍导致的。而在癌症研究中,溶酶体功能障碍和自噬阻断会有助于癌细胞的细胞死亡^[29]。因此,本研究分别在对照组和*Sidt2*剔除组中加入了CQ,并且设置和使用不同的浓度梯度摸索在人肝脏细胞中CQ抑制自噬的饱和浓度,结果显示,当CQ的浓度在50 μmol/L的作用下,LC3B和P62的表达均达到饱和状态,在饱和浓度的CQ作用下,由*Sidt2*缺失所引发的LC3B和P62的差异完全消失,说明为自噬晚期清除障碍所致。同样具有损害溶酶体功能和诱导

自噬作用的叫啉利西啉生物碱Swainsonine,被发现可促进细胞凋亡^[30]。所以*Sidt2*缺失导致的自噬紊乱可能会引发凋亡的增加,这为我们的下一步研究指明了方向。

溶酶体作为自噬和细胞死亡的必要调节剂^[31],越来越多的研究发现自噬体-溶酶体区室参与程序性细胞死亡^[32]。与细胞凋亡相反,通过介导细胞质成分的溶酶体降解提供能量和营养的过程,自噬可促进细胞的存活^[33]。鉴于细胞凋亡和自噬之间复杂的功能关系以及溶酶体膜蛋白缺失可引起的细胞自噬和凋亡之间的串扰^[9,34,35],本研究对*Sidt2*剔除前后并阻断自噬溶酶体途径后的细胞凋亡的发生进行探究,结果显示,同样在饱和和浓度的CQ作用下,这种诱导凋亡和抑制增殖的作用更加明显,这说明二者可能有着同样的分子机制基础,进而从自噬溶酶体途径层面解释了溶酶体膜蛋白*Sidt2*是一个重要的凋亡调控蛋白。

综上所述,溶酶体膜蛋白*Sidt2*缺失后肝脏细胞的增殖受到抑制并凋亡水平上调,在抑制其自噬通量后可表现出增加的细胞毒性死亡和活性的减弱,从凋亡层面来揭示了*Sidt2*不通过抑制自噬溶酶体途径介导凋亡。但本研究也存在不足之处,如缺乏对ATG12、ATG15等凋亡关键蛋白分子的检测,自噬水平下调后溶酶体膜蛋白*Sidt2*在增殖和凋亡中的详细机制和其他自噬诱导剂对于其增殖和凋亡的影响还有待进一步深究,以及在研究过程中无法选择相对应的阳性对照药物。这些需要

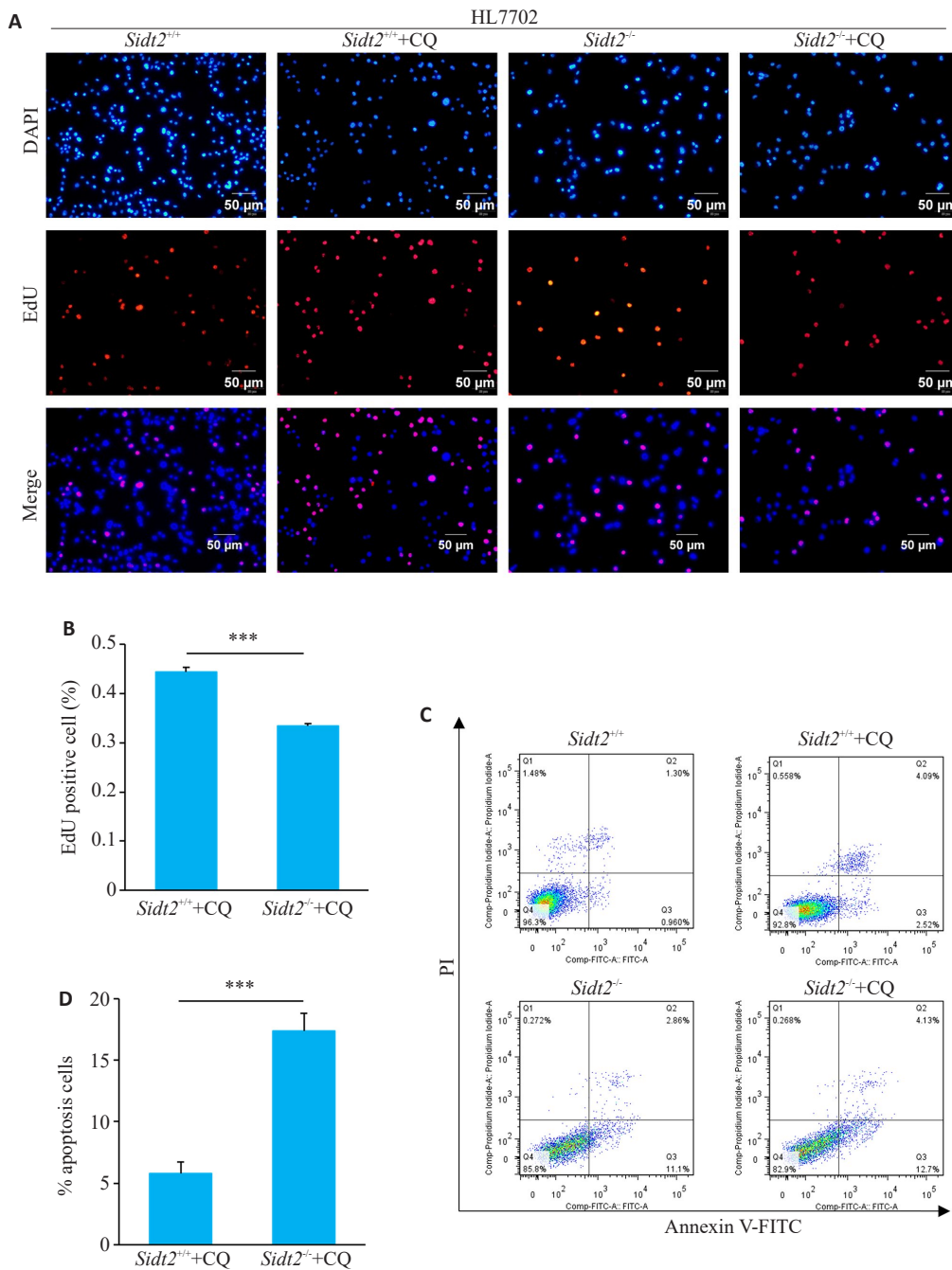


图5 氯喹会使其进一步抑制细胞增殖,并使凋亡进一步恶化

Fig.5 Chloroquine (CQ) further inhibits cell proliferation and increases apoptosis of *Sidt2*^{-/-} HL7702 cells. **A, B:** CQ-induced proliferation of HL7702 cells before and after *Sidt2* knockout (EdU staining, Scar bar: 50 μm). **C, D:** CQ-induced apoptosis in HL7702 cells before and after *Sidt2* knockout. ***P<0.001.

在后续的研究进展中得出 *Sidt2* 调控肝脏细胞凋亡的具体作用机制,从而为明确溶酶体膜蛋白 *Sidt2* 可能成为早期肝脏疾病诊断的新指标提供实验数据的支持。

参考文献:

[1] Appelqvist H, Wåster P, Kågedal K, et al. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target[J]. J Mol Cell Biol, 2013, 5(4): 214-26.
 [2] Gonzalez A, Valeiras M, Sidransky E, et al. Lysosomal integral

membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology [J]. Mol Genet Metab, 2014, 111(2):84-91.

[3] Kong XY, Nasset CK, Damme M, et al. Loss of lysosomal membrane protein NCU-G1 in mice results in spontaneous liver fibrosis with accumulation of lipofuscin and iron in Kupffer cells[J]. Dis Model Mech, 2014, 7(3): 351-62.
 [4] Lunding LP, Krause D, Stichtenoth G, et al. LAMP3 deficiency affects surfactant homeostasis in mice[J]. PLoS Genet, 2021, 17(6): e1009619-27.
 [5] Qu LL, Lin BQ, Zeng WP, et al. Lysosomal K⁺channel TMEM175

- promotes apoptosis and aggravates symptoms of Parkinson's disease [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(9): e53234-40.
- [6] Eriksson I, Wäster P, Öllinger K. Restoration of lysosomal function after damage is accompanied by recycling of lysosomal membrane proteins[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 370-9.
- [7] Alenzi FQ, Wyse RK, Altamimi WG. Apoptosis as a tool for therapeutic agents in haematological diseases[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2004, 4(3): 407-20.
- [8] Chen L, Wang G, Luo Y, et al. Downregulation of LAPTM5 suppresses cell proliferation and viability inducing cell cycle arrest at G0/G1 phase of bladder cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(1): 263-71.
- [9] Liu Z, Lv YJ, Song YP, et al. Lysosomal membrane protein TMEM192 deficiency triggers crosstalk between autophagy and apoptosis in HepG2 hepatoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3): 985-91.
- [10] Jialin G, Xuefan G, Huiwen Z. SID1 transmembrane family, member 2 (Sid2): a novel lysosomal membrane protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(4): 588-94.
- [11] Geng MY, Wang LZ, Song YY, et al. Sid2 is a key protein in the autophagy-lysosomal degradation pathway and is essential for the maintenance of kidney structure and filtration function [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 13(1): 7-15.
- [12] Chen X, Gu X, Zhang H. Sid2 regulates hepatocellular lipid metabolism through autophagy[J]. *J Lipid Res*, 2018, 59(3): 404-15.
- [13] Geng M, Wang L, Zhang Y, et al. Lysosomal membrane protein Sid2 deletion impairs autophagy in human hepatocytes[J]. *J South Med Univ*, 2021, 41(8): 1207-13.
- [14] Massa López D, Thelen M, Stahl F, et al. The lysosomal transporter MFSD1 is essential for liver homeostasis and critically depends on its accessory subunit GLMP[J]. *Elife*, 2019, 8: e50025-33.
- [15] Xie XF, Brown MS, Shelton JM, et al. Amino acid substitution in NPC1 that abolishes cholesterol binding reproduces phenotype of complete NPC1 deficiency in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(37): 15330-5.
- [16] Sun H, Ding JM, Zheng HH, et al. The effects of Sid2 on the inflammatory pathway in mouse mesangial cells [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 3560793-806.
- [17] Gu J, Geng MY, Qi MX, et al. The role of lysosomal membrane proteins in glucose and lipid metabolism[J]. *FASEB J*, 2021, 35(10): e21848-59.
- [18] Wang LZ, Yu C, Pei WJ, et al. The lysosomal membrane protein Sid2 is a vital regulator of mitochondrial quality control in skeletal muscle[J]. *FASEB J*, 2021, 35(4): e21223-36.
- [19] Ding X, Chen Y, Han L, et al. Apoptosis related protein 3 is a lysosomal membrane protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(4): 915-22.
- [20] Tanaka T, Warner BM, Michael DG, et al. LAMP3 inhibits autophagy and contributes to cell death by lysosomal membrane permeabilization[J]. *Autophagy*, 2022, 18(7): 1629-47.
- [21] Kim KH, Lee MS. Autophagy: a key player in cellular and body metabolism[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2014, 10(6): 322-37.
- [22] Li ZY, Nakatogawa H. Degradation of nuclear components via different autophagy pathways[J]. *Trends Cell Biol*, 2022, 32(7): 574-84.
- [23] Dice JF. Chaperone-mediated autophagy[J]. *Autophagy*, 2007, 3(4): 295-9.
- [24] Hu Y, Wang Y, Zhang X, et al. TM7SF1, an important autophagy regulatory protein in mouse podocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 528(1): 213-9.
- [25] Isei T. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(11): 2201-14.
- [26] Lian CY, Yang H, Zhai ZZ, et al. mTORC1 activation contributes to autophagy inhibition *via* its recruitment to lysosomes and consequent lysosomal dysfunction in cadmium-exposed rat proximal tubular cells[J]. *J Inorg Biochem*, 2020, 212: 111231-43.
- [27] Yim WWY, Mizushima N. Lysosome biology in autophagy[J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 6-19.
- [28] Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 625(1/2/3): 220-33.
- [29] Yang Y, Wang Q, Song D, et al. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to autophagy-related cancer suppressing peptide-induced cytotoxic death of cervical cancer cells through the AMPK/mTOR pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 197-208.
- [30] Wang S, Guo R, Su Y, et al. Swainsonine promotes apoptosis by impairing lysosomal function and inhibiting autophagic degradation in rat primary renal tubular epithelial cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 336: 109319-33.
- [31] Mahapatra KK, Mishra SR, Behera BP, et al. The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(23): 7435-49.
- [32] Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8(6): 569-81.
- [33] Tsapras P, Nezis IP. Caspase involvement in autophagy [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(8): 1369-79.
- [34] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(9): 741-52.
- [35] Crighton D, Wilkinson S, Ryan KM. DRAM links autophagy to p53 and programmed cell death[J]. *Autophagy*, 2007, 3(1): 72-4.

(编辑:林萍)