



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20160224

TMEPAI 蛋白表达对溶酶体稳定性的影响

罗深恒, 白喜龙, 景磊, 李玉银, 刁爱坡
(天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 本研究旨在构建稳定表达 TMEPAI 细胞株, 研究 TMEPAI 表达对溶酶体稳定性的影响. 采用基因工程技术构建重组表达载体 pEF-IRES-TMEPAI-Flag, 经酶切、PCR 检测及测序鉴定, 证实表达质粒构建正确. 将表达质粒转染 A549 肺癌细胞, 经抗生素 puromycin 筛选单克隆阳性细胞株, 采用免疫印迹实验 (Western blot) 和免疫荧光技术证实稳定表达 TMEPAI 细胞株构建成功. 通过 MTT 法、流式细胞技术和吖啶橙染色实验表明, TMEPAI 蛋白能够增强溶酶体的稳定性.

关键词: TMEPAI; 溶酶体稳定性; 氯喹; 吖啶橙

中图分类号: Q291 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-6510(2018)02-0013-07

Effect of TMEPAI Protein Expression on Lysosome Stability

LUO Shenheng, BAI Xilong, JING Lei, LI Yuyin, DIAO Aipo
(College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The purpose of the research is to generate stable cell lines overexpressing TMEPAI and then study the effect of TMEPAI expression on lysosome stability. The recombinant expression vector, pEF-IRES-TMEPAI-Flag plasmid, was constructed with genetic engineering technology. The expression plasmid was positively identified with restriction enzyme digestion, PCR detection and DNA sequencing. A549 lung cancer cells were transfected with pEF-IRES-TMEPAI-Flag plasmid. Stable cell lines were generated after puromycin screening, and verified by Western blot and immunofluorescence. Furthermore, MTT assay, flow cytometry and AO staining assays indicated that the expression of TMEPAI increased the stability of lysosome.

Key words: TMEPAI; lysosome stability; chloroquine; acridine orange

溶酶体于1955年被发现,是一个由单层膜围绕、内含多种酸性水解酶类的囊泡状细胞器^[1-2]. 溶酶体的主要功能是消化作用,同时还具有降解表面受体、失活病原微生物、修复细胞膜等功能^[3]. 近年来研究表明,溶酶体调控着细胞内的多种死亡信号^[3-4]. 当它受到一些外界因子,如肿瘤坏死因子^[5-6]、Fas^[7]、p53^[8]、微管稳定剂^[9]、氧化应激^[7,10]和星形孢菌素^[11]刺激时,溶酶体膜发生通透化,其内部的组织蛋白酶从溶酶体腔释放到细胞质. 一旦这些组织蛋白酶被释放到细胞质中,特别是半胱氨酸组织蛋白酶 B 和 L 以及天冬氨酰蛋白酶 D,可诱发线粒体外膜通透化,继而引发半胱天冬蛋白酶或细胞凋亡诱导因子介导

的凋亡^[11-13],或者调节半胱天冬蛋白酶或细胞凋亡诱导因子介导的细胞程序性死亡^[6,14]. 另外,由于不同因素引起的溶酶体膜稳定性下降可导致与溶酶体相关疾病的发生,如矽肺、类风湿性关节炎等^[15].

目前已被鉴定的溶酶体相关蛋白包括溶酶体相关膜蛋白(LAMP1、LAMP2)、溶酶体内在蛋白(LIMP2)以及溶酶体膜糖蛋白(LGP85). 这些蛋白都高度糖基化,能保护溶酶体膜不被其内部的水解酶降解^[16-18],防止溶酶体通透化,从而维持溶酶体稳定性.

前列腺跨膜蛋白(transmembrane prostate androgen-induced protein, TMEPAI)是 N-端含有一个跨膜区(TMD)的 I 型跨膜蛋白,由 287 个氨基酸组成. 编

收稿日期: 2016-06-22; 修回日期: 2016-09-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471335)

作者简介: 罗深恒(1986—),男,广东佛山人,博士研究生;通信作者: 刁爱坡,教授, diaoai@tust.edu.cn

码 *TMEPAI* 的基因最早于 2000 年由 Xu 等^[19]在前列腺癌细胞中通过基因表达系列分析受雄激素调控的基因时发现的, *TMEPAI* 基因定位于染色体 20q13, *TMEPAI* 在众多癌细胞中高表达, 包括乳腺癌^[20-21]、肺癌^[22]、骨癌^[23]、卵巢癌^[24]、前列腺癌^[25]、结肠癌、肾癌及胃癌细胞^[26-28]. *TMEPAI* 在癌细胞中的表达受部分生长因子(EGF 和 TGF- β)调控, 如在肺癌细胞中, *TMEPAI* 的持续高表达需要 TGF- β 的刺激, EGF 能够协同 TGF- β 共同调节诱导 *TMEPAI* 的表达^[29]. 本实验室近期研究发现 *TMEPAI* 蛋白在细胞内定位于溶酶体和晚期内吞体, 并能够通过促进 TGF- β 受体(T β R)的溶酶体降解负调控 TGF- β 信号^[22].

鉴于 *TMEPAI* 是溶酶体膜相关蛋白并且在癌细胞中高表达, 那么其功能是否可以增加溶酶体的稳定性, 从而增强癌细胞的抗凋亡能力. 基于此猜想, 本研究拟构建稳定表达 *TMEPAI* 细胞株, 通过 MTT 法、流式细胞技术和免疫荧光技术研究细胞内 *TMEPAI* 蛋白表达对溶酶体稳定性的影响, 为探索 *TMEPAI* 在肿瘤细胞发生中的作用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞及质粒

大肠杆菌(*E. coli*) TOP10、肺癌细胞 A549 及质粒 pEF-IRES-puro 均为本实验室保存.

1.1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、DAN marker、蛋白预染 marker, Fermentas 公司; 质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、胶回收试剂盒, 上海生工生物工程有限公司; LipofectamineTM 2000、Alexa Fluor[®]555 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor[®]488 donkey anti-mouse IgG、Alexa Fluor[®]680 goat anti-rabbit IgG, Invitrogen 公司; 细胞完全培养基 F-12K、胰酶、胎牛血清、DPBS, GIBCO 公司; Flag 抗体、嘌呤霉素(puromycin)、吖啶橙(acridine orange, AO)、DNA 染料(hoechst 33342), Sigma 公司; *TMEPAI* 抗体为本实验室纯化所得; LAMP2 抗体, Abcam 公司; Rab7 抗体, Santa Cruz 公司; β -actin 抗体, 天津三箭生物技术有限公司; 引物合成和基因测序由北京华大基因公司完成.

1.2 方法

1.2.1 pEF-IRES-*TMEPAI*-Flag 重组载体的构建与鉴定

根据目的基因 *TMEPAI* 的核酸序列和表达载体

pEF-IRES-puro 的多克隆位点, 设计扩增目的基因的引物, 其中上、下游引物 P1、P2 分别添加 *Afl* II 和 *Xba* I 的酶切位点(下划线标示). P1: 5'-CGCGCTT AAGATGCACCGCTTGATGGG-3'; P2: 5'-CTGTCT AGACTACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGCTC GAGAGAGGGTGTCTTTCTGTTTATCC-3'. 以实验室保存的重组质粒 pEGFP-N3-*TMEPAI* 为模板进行 PCR 扩增得到 *TMEPAI* 基因片段. 真核表达载体 pEF-IRES-puro 以及 *TMEPAI* 基因纯化产物经 *Afl* II 和 *Xba* I 双酶切后纯化回收. 酶切产物经 T4 DNA 连接酶连接并转化大肠杆菌 TOP10, 挑取单克隆菌落进行培养并提取质粒后, 经 *Afl* II 和 *Xba* I 酶切及 PCR 鉴定为阳性的重组质粒, 进一步测序鉴定.

1.2.2 稳转细胞系的建立

最适嘌呤霉素筛选浓度的确定: 在 6 孔板中接种适量 A549 细胞, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养细胞生长至 80% ~ 90%, 更换含有不同浓度嘌呤霉素(0 ~ 2 μ g/mL)的培养基继续培养. 每天镜下观察, 隔天更换含有嘌呤霉素新鲜培养液. 培养 3 ~ 5 d 后, 导致细胞全部死亡的嘌呤霉素最低浓度为最低致死浓度, 即最适嘌呤霉素筛选浓度(一般以 4 d 完全致死为准).

稳定细胞系的建立: 在 100 mm 培养皿中接种适量细胞, 37 °C、5% CO₂ 条件下培养细胞生长至 70% ~ 80% 时, 利用 LipofectamineTM2000 将重组质粒转染 A549 细胞, 24 h 后更换含有最适嘌呤霉素筛选浓度的新鲜培养液. 每天更换含有筛选浓度嘌呤霉素的新鲜培养液进行培养. 待单克隆长至肉眼可见时, 将单克隆挑起并转移至新的培养皿继续培养, 收集细胞, 免疫印迹实验(Western blot)检测稳定细胞系是否建立成功.

1.2.3 免疫印迹实验检测 *TMEPAI* 蛋白的表达

收集对数生长期的单克隆细胞, 加入适量 RIPA 裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4), 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100)(含蛋白酶抑制剂)在冰上裂解 30 min, 离心收集上清加入 SDS 上样缓冲液, 经 12% SDS-PAGE 分离后转至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 于 4 °C 下进行一抗(*TMEPAI* 1 : 500、 β -actin 1 : 2 000)孵育过夜, PBST 洗膜后再与二抗孵育 2 h 后, PVDF 膜在 Odyssey 红外激光成像系统下扫描成像.

1.2.4 免疫荧光法检测 *TMEPAI* 在细胞中定位

将适量细胞接种于已预先放置无菌细胞爬片的 30 mm 培养皿中, 待细胞生长至约 70%, 取出细胞爬片用预冷的甲醇-20 °C 固定 5 min, DPBS 洗涤 1

次后一抗(Flag 1:100、LAMP2 1:200、Rab7 1:100)室温孵育 3 h, DPBS 洗涤 3 次后二抗(Alexa Fluor[®]555 goat anti-rabbit IgG 1:200、Alexa Fluor[®]488 donkey anti-mouse IgG 1:200、hoechst 33342 10 μg/mL)室温孵育 30 min,共聚焦荧光显微镜下观察拍照。

1.2.5 MTT 法检测细胞增殖

实验设置实验组与对照组,每组设 6 个复孔。96 孔板每孔接种 5 000 个细胞。待细胞贴壁后,分别加入 0、1、2、4、8、16、32、64、128 μmol/L 氯喹。处理 48 h 后,每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h 后,小心吸去孔内培养液。每孔加入 200 μL 二甲基亚砜(DMSO),置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,酶标仪测定 490 nm 处吸光度。

1.2.6 吖啶橙(AO)染色分析过表达 TMEPAl 对溶酶体稳定性的影响

荧光显微镜分析:将适量对数期的细胞接种于放有细胞爬片的 30 mm 培养皿中,培养 24 h 后,DPBS 洗涤 2 次,加入含有 2 μmol/L AO 的 DPBS,于 37 °C 孵育 15 min,DPBS 洗涤 3 次,细胞爬片在荧光显微镜下观察拍照。

流式细胞术分析:将适量细胞接种于 60 mm 培养皿中培养 24 h 后,胰酶消化细胞,收集 1×10^6 个细胞于 DPBS 中,加入 2 μmol/L AO,于 37 °C 避光孵育 15 min。流式细胞仪检测红色荧光强度。

1.3 统计学分析

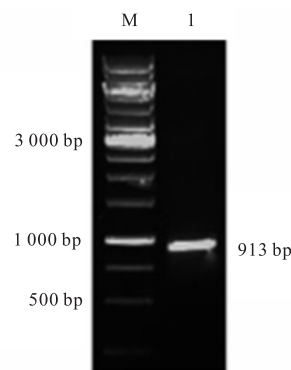
应用 SPSS 软件进行数据的整理分析,采用 *t* 检验进行组间比较,检验结果 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义,*、**和***分别表示与对照组比较 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

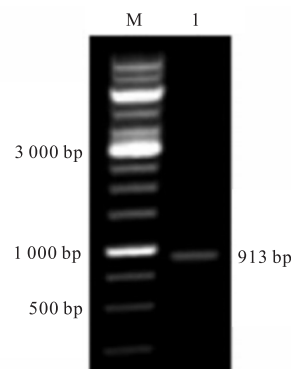
2.1 重组质粒 pEF-IRES-TMEPAI-Flag 的构建

以本实验室构建的 pEGFP-N3-TMEPAI 重组载体为模版,利用引物 P1、P2,定向扩增目的片段(图 1(a))。PCR 产物经双酶切纯化后连接,转化 *E. coli* TOP10 宿主菌。挑取 Amp^r 抗性阳性克隆菌培养,提取质粒后进行 PCR 检测(图 1(b)),在 913 bp 处有明显条带,与 TMEPAI 目的基因大小一致。进一步将重组质粒进行双酶切鉴定(图 1(c)),结果大小分别为载体片段 5 700 bp 和目的片段 913 bp。基因测序结果显示,目的基因与 GenBank 中 TMEPAI 基因序列(GenBank No. NM_020182.4)完全一致。以上结果

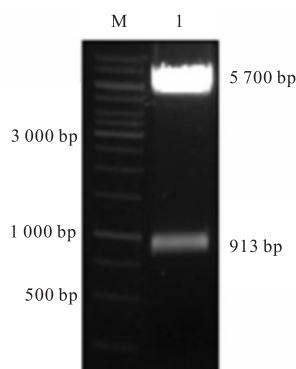
表明,重组质粒 pEF-IRES-TMEPAI-Flag 构建成功。



M. DNA marker; 1. PCR 产物
(a) TMEPAI 基因的 PCR 扩增



M. DNA marker; 1. PCR 产物
(b) 重组质粒 pEF-IRES-TMEPAI-Flag 的 PCR 鉴定



M. DNA marker; 1. 双酶切产物
(c) 重组质粒 pEF-IRES-TMEPAI-Flag 的双酶切鉴定

图 1 重组质粒 pEF-IRES-TMEPAI-Flag 的构建和鉴定
Fig. 1 Construction and identification of the recombinant plasmid pEF-IRES-TMEPAI-Flag

2.2 稳定表达 TMEPAI 细胞株的构建及鉴定

稳定细胞株构建实验筛选获得 2 个空载体对照的细胞株,分别为 pEF-IRES-puro I、pEF-IRES-puro II; 3 个稳定表达 TMEPAI-Flag 的细胞株,分别为 TMEPAI-Flag I、TMEPAI-Flag II、TMEPAI-Flag III。

采用 Western blot 检测稳定株 TMEPAI 蛋白表达, 结果如图 2 所示, 其中 A549 为正常 A549 细胞; pEF-IRES-puro I / II 为空载体对照组; TMEPAI-Flag I / II / III 为稳定表达 TMEPAI-Flag 的 A549 细胞株. 正常的 A549 细胞与空载体对照组的 A549 细胞中 TMEPAI 的表达量较低, 而稳定表达 TMEPAI-Flag 的 A549 细胞中 TMEPAI 蛋白水平显著提高. 由此表明, 稳定表达 TMEPAI 的 A549 细胞株构建成功, 其中 TMEPAI-Flag III 表达量最高, 因此选用该稳定株进行后续实验.

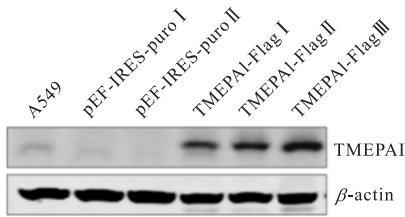


图 2 Western blot 检测稳定细胞株 TMEPAI 表达
Fig. 2 Detection of the expression of TMEPAI in stable cell lines by Western blot

采用免疫荧光法检测构建的 A549 稳定细胞株中 TMEPAI 的定位情况. 如图 3 所示, 在稳定细胞株中, TMEPAI 与 LAMP2(溶酶体 marker)有明显共定位, 与 Rab7(晚期内吞体 marker)有部分共定位, 由此进一步证明, 成功构建稳定表达 TMEPAI-Flag 的 A549 细胞株.

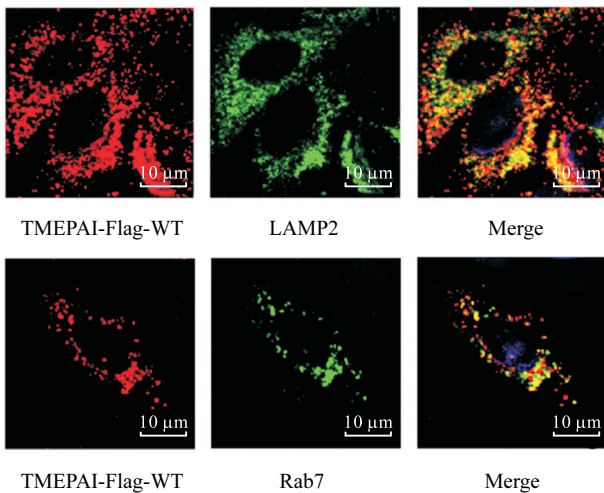


图 3 稳定细胞株中 TMEPAI 的定位
Fig. 3 TMEPAI localization in stable cell lines

2.3 TMEPAI 过表达对溶酶体稳定性的影响

氯喹是一种溶酶体抑制剂, 通过升高溶酶体腔内 pH 使溶酶体膨大, 并引起溶酶体通透化, 从而抑制溶酶体功能^[30]. 利用不同浓度的氯喹处理稳定细胞株, 观察 TMEPAI 表达对溶酶体稳定性的影响, 结果

如图 4 所示. 随着氯喹处理细胞的浓度增加, 48 h 后正常 A549 细胞的存活率逐渐降低, 32 μmol/L 时细胞基本完全死亡. 而稳定细胞株在氯喹处理浓度 32 μmol/L 时仍有细胞存活. 由此说明, 过表达 TMEPAI 可以增加溶酶体对氯喹的耐受性, 使溶酶体稳定性增强.

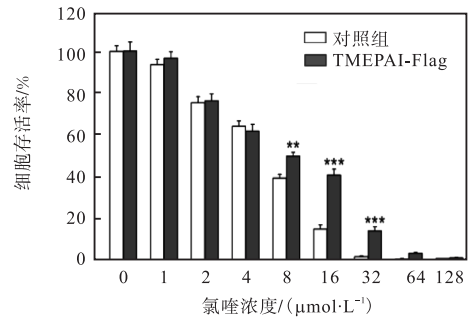


图 4 MTT 检测过表达 TMEPAI 对溶酶体稳定性的影响
Fig. 4 Effect of TMEPAI expression on the lysosome stability by MTT assay

2.4 吖啶橙染色分析过表达 TMEPAI 对溶酶体稳定性的影响

吖啶橙(AO)是一种溶酶体异质性荧光染料, 可透过细胞膜进入溶酶体内, 细胞内不同区域的 pH 影响 AO 分布的浓度, 即 pH 低时 AO 浓度高, 而 pH 高时 AO 浓度低. 当用紫外光激发时, AO 在高浓度(当其存在于溶酶体内)下显示橘红色荧光, 而在低浓度(当其存在于细胞质和细胞核中)下显示绿色荧光^[31]. 因此, AO 染色的细胞内橘红色荧光强度越强, 说明溶酶体越稳定, 分别通过荧光显微镜以及流式细胞技术分析细胞内红色荧光的强度.

利用荧光显微镜观察 AO 在稳定表达 TMEPAI 细胞株内的分布情况, 结果如图 5 所示. 与对照组相比, 稳定细胞株(TMEPAI-Flag III)的红色荧光较强, 说明过表达 TMEPAI 后, 溶酶体的稳定性增强, 即 TMEPAI 增加了溶酶体的稳定性.

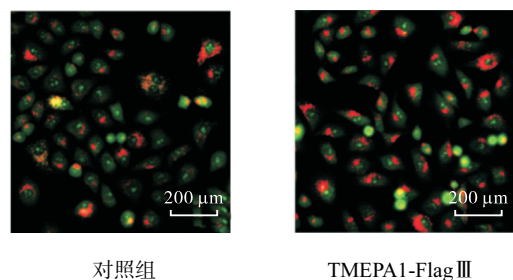


图 5 AO 染色检测 TMEPAI 表达对溶酶体稳定性的影响
Fig. 5 Effect of TMEPAI expression on the lysosome stability by AO staining

采用流式细胞技术对 AO 染色进行定量分析, 结

果如图 6 所示. 对照组高于红色荧光阈值(溶酶体阳性)的细胞数为 73.8%, 实验组(TMEPAI-Flag III)的细胞数为 92.7%, 较对照组增加了 18.9%. 这说明过表达 TMEPAI 后, 细胞内的红色荧光强度增强, 溶酶体的稳定性增强.

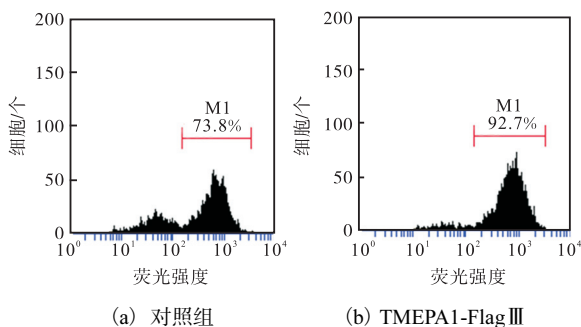


图 6 流式细胞技术分析过表达 TMEPAI 对溶酶体稳定性的影响

Fig. 6 Impact of TMEPAI expression on the lysosome stability by flow cytometry assay

3 讨论

溶酶体结构和功能的完整性需要溶酶体膜蛋白以及腔内水解酶的共同调节, 溶酶体膜蛋白主要负责调节内腔 pH、胞质蛋白的膜融合以及降解产物的外排. 越来越多的研究表明, 溶酶体蛋白通过溶酶体调控一系列细胞生理过程, 如溶酶体跨膜蛋白 LAMP4B 能够维持溶酶体膜腔 pH, 增强溶酶体的稳定性^[30]; 转录因子 EB(transcription factor EB, TFEB)能够酸化溶酶体内腔, 促进水解酶的运输以及自噬体与溶酶体的融合^[32-33]. TMEPAI 是溶酶体定位蛋白质^[22], 本实验室前期研究发现 TMEPAI 能够增强溶酶体的稳定性, 抵抗药物刺激(etoposide)引起的溶酶体通透化(lysosomal membrane permeabilization, LMP)^[34]. 溶酶体的通透化会使腔内 H⁺以及酸性水解酶释放到胞质中, 导致细胞内 pH 失衡以及细胞器损伤. 通过 knockdown 实验证明了干扰 TMEPAI 表达能降低溶酶体膜的稳定性, 与本文的结果一致, 证明了 TMEPAI 表达能增加溶酶体膜的稳定性.

对于活细胞来说, 溶酶体内高浓度的水解酶为其发挥功能起到重要作用, 但它的不稳定可能会给自身带来潜在的危害. 一旦溶酶体膜被破坏, 将导致其内部水解酶释放至细胞质, 造成溶酶体通透化, 引起无法控制的细胞内容物降解. 同时, 大量的溶酶体膜破裂可引起细胞内酸化, 从而导致细胞死亡. 此外, 溶酶体通透化可能与活性氧(ROS)有关, 溶酶体去稳定

化已被认为是由氧化应激引起的细胞损伤所造成的^[35], 并且 ROS 可诱导溶酶体泄漏^[36]. 本文通过构建稳定表达 TMEPAI 细胞株, 研究发现 TMEPAI 表达能增加溶酶体膜的稳定性. Hu 等^[37]研究表明 TMEPAI 与 ROS 有关, 由此推测 TMEPAI 可能通过抑制 ROS 增加溶酶体稳定性. Kirkegaard 等^[38]发现热休克蛋白 70(Hsp70)通过调节鞘磷脂代谢增加溶酶体膜的稳定性. TMEPAI 表达增加溶酶体膜的稳定性可能增强了癌细胞的抗凋亡能力, 实验也表明过表达 TMEPAI 可以抵抗氯喹对肺癌细胞 A549 杀伤作用. 因此, TMEPAI 可能成为抗癌的潜在药物靶点.

4 结语

本研究成功构建了 pEF-IRES-TMEPAI-Flag 表达载体, 并建立了稳定表达 TMEPAI 的细胞株, 且证实了 TMEPAI 蛋白在溶酶体表达. 同时, 发现 TMEPAI 表达可以增强溶酶体的稳定性.

参考文献:

- [1] de Duve C. The lysosome turns fifty[J]. Nature Cell Biology, 2005, 7(9): 847-849.
- [2] Mullins C, Bonifacino J S. The molecular machinery for lysosome biogenesis[J]. Bioessays, 2001, 23(4): 333-343.
- [3] Jaattela M, Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes[J]. Nature Immunology, 2003, 4(5): 416-423.
- [4] Ferri K F, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways[J]. Nature Cell Biology, 2001, 3(11): 255-263.
- [5] Guicciardi M E, Deussing J, Miyoshi H, et al. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome C[J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 106(9): 1127-1137.
- [6] Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor[J]. Journal of Cell Biology, 2001, 153(5): 999-1010.
- [7] Brunk U T, Svensson I. Oxidative stress, growth factor starvation and Fas activation may all cause apoptosis through lysosomal leak[J]. Redox Report, 1999, 4(1/2): 3-11.
- [8] Yuan X M, Li W, Dalen H, et al. Lysosomal

- destabilization in p53-induced apoptosis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(9) : 6286–6291.
- [9] Broker L E, Huisman C, Span S W, et al. Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells[J]. Cancer Research, 2004, 64(1) : 27–30.
- [10] Brunk U T, Dalen H, Roberg K, et al. Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1997, 23(4) : 616–626.
- [11] Bidere N, Lorenzo H K, Carmona S, et al. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor(AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(33) : 31401–31411.
- [12] Boya P, Andraeu K, Poncet D, et al. Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion[J]. Journal of Experimental Medicine, 2003, 197(10) : 1323–1334.
- [13] Roberg K, Kagedal K, Ollinger K. Microinjection of cathepsin D induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts[J]. American Journal of Pathology, 2002, 161(1) : 89–96.
- [14] Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, et al. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity[J]. FEBS Letters, 1998, 438(3) : 150–158.
- [15] Zhang L, Sheng R, Qin Z. The lysosome and neurodegenerative diseases[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2009, 41(6) : 437–445.
- [16] Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes[J]. Annual Review of Cell Biology, 1989, 5 : 483–525.
- [17] Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking[J]. Journal of Biological Chemistry, 1991, 266(32) : 21327–21330.
- [18] Eskelinen E L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27(5/6) : 495–502.
- [19] Xu L L, Shanmugam N, Segawa T, et al. A novel androgen-regulated gene, PMEPA1, located on chromosome 20q13 exhibits high level expression in prostate[J]. Genomics, 2000, 66(3) : 257–263.
- [20] Tanner M M, Tirkkonen M, Kallioniemi A, et al. Increased copy number at 20q13 in breast cancer : Defining the critical region and exclusion of candidate genes[J]. Cancer Research, 1994, 54(16) : 4257–4260.
- [21] Hirokawa Y S, Takagi A, Uchida K, et al. High level expression of STAG1/PMEPA1 in an androgenindependent prostate cancer PC3 subclone[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2007, 12(3) : 370–377.
- [22] Bai X, Jing L, Li Y, et al. TMEPAI inhibits TGF-beta signaling by promoting lysosome degradation of TGF-beta receptor and contributes to lung cancer development [J]. Cellular Signalling, 2014, 26(9) : 2030–2039.
- [23] Wang L. TGFbeta induces a pro-bone metastasis program in prostate cancer[J]. Cancer Discovery, 2015, 5(7) : 23.
- [24] Hidaka S, Yasutake T, Takeshita H, et al. Differences in 20q13. 2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis[J]. Clinical Cancer Research, 2000, 6(7) : 2712–2717.
- [25] Ishkanian A S, Mallof C A, Ho J, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer[J]. Prostate, 2009, 69(10) : 1091–1100.
- [26] Brunshwig E B, Wilson K, Mack D, et al. PMEPA1, a transforming growth factor-beta-induced marker of terminal colonocyte differentiation whose expression is maintained in primary and metastatic colon cancer[J]. Cancer Research, 2003, 63(7) : 1568–1575.
- [27] Reichling T, Goss K H, Carson D J, et al. Transcriptional profiles of intestinal tumors in Apc (Min) mice are unique from those of embryonic intestine and identify novel gene targets dysregulated in human colorectal tumors[J]. Cancer Research, 2005, 65(1) : 166–176.
- [28] Rae F K, Hooper J D, Nicol D L, et al. Characterization of a novel gene, STAG1/PMEPA1, upregulated in renal cell carcinoma and other solid tumors[J]. Molecular Carcinogenesis, 2001, 32(1) : 44–53.
- [29] Azami S, Vo Nguyen T T, Watanabe Y, et al. Cooperative induction of transmembrane prostate androgen induced protein TMEPAI/PMEPA1 by transforming growth factor-beta and epidermal growth factor signaling[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2015, 456(2) : 580–585.
- [30] Li Y, Zhang Q, Tian R, et al. Lysosomal transmembrane protein LAPTM4B promotes autophagy and tolerance to metabolic stress in cancer cells[J]. Cancer Research,

- 2011, 71 (24) : 7481–7489.
- [31] Vanderlinden E, Vanstreels E, Boons E, et al. Intracytoplasmic trapping of influenza virus by a lipophilic derivative of aglycoristocetin[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86 (17) : 9416–9431.
- [32] Settembre C, Fraldi A, Medina D L, et al. Signals from the lysosome: A control centre for cellular clearance and energy metabolism[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14 (5) : 283–296.
- [33] Zhou J, Tan S H, Nicolas V, et al. Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion[J]. *Cell Research*, 2013, 23 (4) : 508–523.
- [34] Luo S, Yang M, Lv D, et al. TMEPAI increases lysosome stability and promotes autophagy[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2016, 76: 98–106.
- [35] Zdolsek J, Zhang H, Roberg K, et al. H₂O₂-mediated damage to lysosomal membranes of J-774 cells[J]. *Free Radical Research Communications*, 1993, 18 (2) : 71–85.
- [36] Antunes F, Cadenas E, Brunk U T. Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H₂O₂ is a consequence of lysosomal rupture[J]. *Biochemical Journal*, 2001, 356 (2) : 549–555.
- [37] Hu Y, He K, Wang D, et al. TMEPAI regulates EMT in lung cancer cells by modulating the ROS and IRS-1 signaling pathways[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (8) : 1764–1772.
- [38] Kirkegaard T, Roth A G, Petersen NH, et al. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology[J]. *Nature*, 2010, 463 (7280) : 549–553.

责任编辑: 郎婧

(上接第12页)

- reduction of cyclic N-sulfonylimines[J]. *Synlett*, 2011 (3) : 402–404.
- [57] Zhang Z, Jain P, Antilla J C. Asymmetric reduction of ketones by phosphoric acid derived catalysts[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50 (46) : 10961–10964.
- [58] Enders D, Rembiak A, Seppelt M. Asymmetric organocatalytic reduction of ketimines with catecholborane employing a N-triflyl phosphoramidate Brønsted acid as catalyst[J]. *Tetrahedron Letters*, 2013, 54 (6) : 470–473.
- [59] Enders D, Rembiak A, Stoeckel B A. Chemo- and enantioselective Brønsted acid-catalyzed reduction of α -imino esters with catecholborane[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2013, 355 (10) : 1937–1942.
- [60] Enders D, Stöckel B A, Rembiak A. Enantio- and chemoselective Brønsted-acid/Mg(*n* Bu)₂ catalysed reduction of α -keto esters with catecholborane[J]. *Chemical Communications*, 2014, 50 (34) : 4489–4491.
- [61] Harrison D J, Tam N C, Vogels C M, et al. A gentle and efficient route for the deoxygenation of sulfoxides using catecholborane (HBcat; cat = 1, 2-O₂C₆H₄) [J]. *Tetrahedron Letters*, 2004, 45 (46) : 8493–8496.
- [62] Fernandes A C, Romão C C. Reduction of sulfoxides with boranes catalyzed by MoO₂Cl₂[J]. *Tetrahedron Letters*, 2007, 48 (52) : 9176–9179.
- [63] Cabrita I, Sousa S C A, Fernandes A C. Reduction of sulfoxides catalyzed by oxo-complexes[J]. *Tetrahedron Letters*, 2010, 51 (47) : 6132–6135.
- [64] Fernandes A C, Fernandes J A, Romão C C, et al. Highly efficient reduction of sulfoxides with the system borane/oxo-rhenium complexes[J]. *Organometallics*, 2010, 29 (21) : 5517–5525.
- [65] Nakamura G, Nakajima Y, Matsumoto K, et al. Nitrile hydroboration reactions catalysed by simple nickel salts, bis(acetylacetonato)nickel(II) and its derivatives[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2017 (15) : 3196–3199.
- [66] Khalimon A Y, Farha P M, Nikonov G I. Imido-hydrido complexes of Mo(IV): Catalysis and mechanistic aspects of hydroboration reactions[J]. *Dalton Transactions*, 2015, 44 (43) : 18945–18956.
- [67] Xu F, Dong P, Cui K, et al. New synthetic strategy targeting well-defined α, ω -telechelic polymethylenes with hetero bi-/tri-functionalities via polyhomologation of ylides initiated by new organic boranes based on catecholborane and post functionalization[J]. *RSC Advances*, 2016, 6 (74) : 69828–69835.
- [68] Wang H Y, Xu F, Cui K, et al. Synthesis of polymethylene-*b*-poly(vinyl acetate) block copolymer via visible light induced radical polymerization and its application[J]. *RSC Advances*, 2017, 7 (67) : 42484–42490.

责任编辑: 周建军