

## 靶向 beclin-1 小分子激动剂诱导三阴性乳腺癌细胞自噬性死亡和凋亡

赵荣演<sup>1</sup>, 靳文珂<sup>1,2</sup>, 姜星<sup>1</sup>, 袁兆鑫<sup>1,2</sup>, 刘博<sup>2\*</sup>, 符雷蕾<sup>1\*</sup>

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川成都 610031; 2. 四川大学生物治疗国家重点实验室, 四川成都 610041)

**摘要:** 细胞自噬 (autophagy) 是一种溶酶体降解途径, 在细胞内环境稳态、细胞发育、细胞免疫、抑制肿瘤、能量代谢、预防神经退行性变和延长寿命方面起着至关重要的作用。自噬的药理学激活可能是治疗癌症等某些人类疾病的有效方法。本研究基于 beclin-1 已有的晶体结构, 联合变构位点识别方法、高通量虚拟筛选及体外活性评价, 发现化合物 **10** 能激活自噬且具有良好的抗 MDA-MB-231 细胞增殖活性 [半数抑制浓度 ( $IC_{50} = 8.25 \pm 1.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )]。随后的分子对接、分子动力学模拟及免疫印迹研究结果表明, 化合物 **10** 能够靶向激活 beclin-1。体外研究表明, 化合物 **10** 能够诱导 MDA-MB-231 细胞发生自噬相关性死亡。同时还发现化合物 **10** 激活自噬后, 还伴随细胞凋亡的发生。本研究确定了候选化合物 **10** 作为开发有效的、具有选择性靶向 beclin-1 激活自噬的先导物, 为进一步开发和优化用于临床治疗的靶向 beclin-1 激活自噬小分子药物提供依据。

**关键词:** 三阴性乳腺癌; beclin-1; 小分子激动剂; 自噬; 凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)05-1369-15

## Discovery of a small-molecule activator of beclin-1 that induces autophagy-associated cell death and apoptosis in triple negative breast cancer

ZHAO Rong-yan<sup>1</sup>, JIN Wen-ke<sup>1,2</sup>, JIANG Xing<sup>1</sup>, YUAN Zhao-xin<sup>1,2</sup>, LIU Bo<sup>2\*</sup>, FU Lei-lei<sup>1\*</sup>

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China;

2. State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** Autophagy is a lysosomal degradation pathway, and plays a crucial role in cellular homeostasis, development, immunity, tumor suppression, metabolism, prevention of neurodegeneration, and lifespan extension. Thus, pharmacological stimulation of autophagy may be an effective approach for preventing or treating certain human diseases and/or aging. Here, combined with allosteric site identification methods, high-throughput virtual screening, and *in vitro* activity evaluation, we found that compound **10** can activate autophagy and has good anti-MDA-MB-231 cell proliferation activity (the half maximal inhibitory concentration  $IC_{50} = 8.25 \pm 1.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Subsequently, molecular docking, molecular dynamics simulation, and immunoblotting assay demonstrate that compound **10** can target and activate beclin-1. *In vitro* studies have shown that compound **10** can induce autophagy-associated cell death in MDA-MB-231 cells. In addition, it was found that compound **10** can induce apoptosis in MDA-MB-231 cells. Taken together, we identified the candidate compound **10** as an effective and selective targeting beclin-1 to activate autophagy as a lead compound, which provide a reference for further development and optimization of small molecule drugs targeting beclin-1 to activate autophagy for clinical treatment.

**Key words:** triple negative breast cancer; beclin-1; small-molecule activator; autophagy; apoptosis

收稿日期: 2021-02-23; 修回日期: 2021-03-22.

基金项目: 四川省应用基础研究项目 (2020YJ0285).

\*通讯作者 Tel: 15882361164, E-mail: leilei\_fu@163.com;

Tel: 15708469925, E-mail: liubo2400@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0265

乳腺癌是一种具有极高发病率和致死率的恶性肿瘤,是女性中因癌症死亡的第一杀手<sup>[1]</sup>。三阴性乳腺癌(TNBC)是乳腺癌中恶性程度最高、预后最差的亚型。由于雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)不表达,并缺乏原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER2)的扩增,TNBC通常没有公认的分子治疗靶标,临床上缺乏有效的治疗药物和治疗策略<sup>[2-4]</sup>。因此,亟待寻找更多针对TNBC的分子治疗靶标,针对新靶标开发出能够抑制乳腺癌增殖、防止乳腺癌转移、复发和延长患者生存期的新药物。

大自噬(以下简称自噬)是一种分解代谢途径,细胞通过一种称为自噬体的双层膜结构包裹不需要的或受损的蛋白质或细胞器。这一过程由一组进化上保守的自噬相关基因(ATG)介导,它们参与自噬膜的成核、自噬膜的延伸、细胞质成分的隔离、双层膜的闭合、与溶酶体的融合以及隔离内容物的降解等过程<sup>[5,6]</sup>。自噬在细胞生存、细胞应激适应、代谢、发育、免疫、蛋白质和细胞器稳态以及抗衰老方面起着重要的生理作用<sup>[7,8]</sup>。研究表明,自噬与哺乳动物疾病(包括糖尿病、感染、癌症、神经退行性疾病和衰老)之间存在联系<sup>[7,9,10]</sup>。小鼠自噬功能的全身或组织特异性遗传破坏引起包括组织异常、异常炎症、免疫受损、神经变性、对肿瘤发生的易感性等多种病理<sup>[11]</sup>。在人类中,自噬基因的突变或多态性与感染、癌症、炎症性疾病、哮喘、脑瘫、额颞叶痴呆、肌萎缩性侧索硬化(ALS)、亨廷顿氏病和帕金森氏病的易感性有关<sup>[11-13]</sup>。此外,功能增益突变或小鼠自噬基因的强制表达能够改善代谢、组织功能、延长寿命、神经保护和减少肿瘤发生<sup>[11,14-18]</sup>。自噬诱导肽(tat-beclin-1)能够抑制HER2阳性人乳腺癌异种移植小鼠肿瘤的生长,其肿瘤生长抑制与自噬的强力诱导有关<sup>[18]</sup>。针对自噬相关蛋白设计的小分子自噬激活剂在多项临床前研究中也表现出了明显的抗肿瘤效果<sup>[19,20]</sup>。因此,自噬诱导剂的开发可能是临床医学预防或治疗某些疾病特别是癌症的有前景的治疗方法<sup>[11,21-23]</sup>。

目前,已知几种正在临床试验或临床使用的药物能够诱导自噬<sup>[11,19,24]</sup>。然而,它们的作用不限于自噬途径。具体来说,许多药物通过调节上游信号通路[如抑制mTOR(mammalian target of rapamycin)、激活AMPK(AMP-activated protein kinase)、抑制钙通道和cAMP(cyclic adenosine monophosphate)信号]来增强自噬,但它们也调节不同的下游生物功能,从而导致可能限制临床应用的非自噬相关效应<sup>[22]</sup>。因此,迫切需要开发选择性地靶向自噬执行中的限速步骤的自噬诱导剂。

哺乳动物中鉴定的第一个调控自噬的重要基因beclin-1,在多种人类癌症中为单等位基因缺失,其中

包括乳腺癌、前列腺癌和卵巢癌<sup>[25]</sup>。乳腺癌患者与正常人相比,其beclin-1的mRNA表达水平也明显降低,beclin-1基因活性的降低会引发乳腺癌及患者较低的生存率,因此增加beclin-1基因活性的靶向疗法或许可以有效治疗乳腺癌,尤其是TNBC<sup>[26]</sup>。Beclin-1是一种支架蛋白,是磷脂酰肌醇-3-激酶复合物[phosphatidylinositol-3-kinase(PI3K) complexes]活性的重要决定因素<sup>[27-29]</sup>。在基础条件下,自噬水平受到Bcl-2(或其相关家族成员Bcl-xL)与beclin-1结合的限制。受应激刺激(如营养缺乏、JNK激活、神经酰胺或免疫信号传导)后,beclin-1/Bcl-2复合物的破坏导致自噬上调<sup>[30]</sup>。Beclin-1/Bcl-2相互作用是体内自噬诱导的重要检查点。针对beclin-1/Bcl-2相互作用已经开发出破坏beclin-1/Bcl-2(或Bcl-xL)结合的BH3模拟物(如ABT-737、ABT-263和ABT-199),这些化合物因其诱导细胞凋亡的活性和用作潜在的癌症化疗剂而被优化<sup>[31]</sup>。但是它们并不是通过与beclin-1直接相互作用而激活自噬。研究表明,beclin-1在形成磷脂酰肌醇-3-激酶复合物过程中受多种信号调控。首先,beclin-1可形成同源二聚体进而抑制自噬,当beclin-1与抗紫外线照射相关蛋白(UV irradiation resistance-associated gene, UVRAG)或自噬相关蛋白ATG14L形成异源二聚体时自噬被激活<sup>[32,33]</sup>。结构研究发现,beclin-1的螺旋结构域(the coiled-coil domain, CCD)与进化上保守的结构域(the evolutionarily conserved domain, ECD)之间存在共有的OH(overlap helix)区域<sup>[33,34]</sup>。OH区域的构象转变调节磷脂酰肌醇-3-激酶复合物的形成,进而调节自噬<sup>[35,36]</sup>。自噬诱导肽tat-beclin-1激活自噬的分子机制可能是引起ECD结构域中的第一个 $\beta$ 折叠发生构象翻转<sup>[37]</sup>。因此,变构调节beclin-1进而促进磷脂酰肌醇-3-激酶复合物的形成可能是激活自噬的重要手段。

本研究采用多种变构位点识别方法,在beclin-1的ECD结构域中识别变构位点。进一步结合高通量虚拟筛选和基于细胞的自噬活性及抗肿瘤活性评价寻找能够激活自噬的小分子化合物。

## 材料与方法

**细胞和试剂** MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468和BT549细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC)。DMEM培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清、胰蛋白酶购于美国Hyclone公司;噻唑蓝MTT(#M2128)、二甲基亚砜(DMSO)、Hoechst 33258(14530)和DAPI(D9542)购自Sigma-Aldrich公司;ECL超敏化学发光液购自Millipore公司;青链霉素双抗溶液(批号:C0222)、RIPA裂解液、酶抑制剂(PMSF)购于碧云天

生物技术研究所; BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪公司; Bafilomycin A1 (ab120497) 购买于 Abcam 公司; Beclin-1 (#3495)、LC3B (3868)、p62 (8025)、Bax (#5023)、Bcl-2 (#2870)、caspase-3 (#9662)、caspase-9 (#9504)、Parp (#9542) 购自 Cell Signaling Technology 公司;  $\beta$ -Actin (66009-1-Ig) 购自 Proteintech 公司。

**仪器** CO<sub>2</sub> 培养箱、生物安全柜、低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 倒置生物显微镜 (德国 ZEISS 公司); 化学发光检测仪、全自动酶标仪、转印电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司); 流式细胞分析仪 (美国 Becton Dickinson FACScan 公司); 倒置荧光显微镜、正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

**变构位点识别方法** Discovery Studio 识别 ECD 晶体结构中的空腔, 采用两种方法识别判断空腔是否具有变构位点的特征。首先, 利用 PARS<sup>[38]</sup> 评价口袋是否具有变构调节作用, 结合其评分规则确定变构口袋。其次, 利用 Allosite<sup>[39]</sup> 识别方法进一步验证和评价。综合以上结果确定变构口袋。

**蛋白质及配体准备** 从 PDB 库中下载 beclin-1 ECD 结构域晶体结构 (PDB ID: 4DDP)。首先, 利用 Discovery Studio 软件将所有的水分子去除, 接着利用 “Protein Preparation” 对受体模型加氢加电荷, 并对蛋白结构进行优化。对包含 20 多万个小分子的 SPECS 数据库 (2019 年 3 月版) 进行处理, 将所有无机原子的分子去除。采用 Filter by Lipinski and Veber Rules 程序对小分子进行过滤。剩余分子在 Discovery Studio 软件包的 Prepare Ligands 程序中准备。配体生成的环境 pH 设为  $7.0 \pm 2.0$ , 二维构象转化为三维构象时保留手性信息, 同时设定每个小分子最多保留 8 个低能构象和 32 个立体构象。

**分子对接及分子动力学模拟** 虚拟筛选采用 Discovery Studio 软件包中 libDock 和 CDOCKER 程序进行分子对接。SPECS 数据库中的小分子首先通过类药五原则 (Lipinski's “rule of five”) 进行过滤, 采用 libDock 进行快速对接, 根据 libDock 打分保留筛选结果排名前 1 000 个分子。随后剩余分子采用高精度模式 (libDock high quality) 进行对接, 剔除假阳性分子, 保留结合自由能最低的前 500 个配体。然后对这 500 个化合物进行 CDOCKER 对接, 并根据它们与 beclin-1 的结合模式及结构多样性, 最终挑选 32 个化合物进行活性测试。利用 Discovery Studio 软件包中 Standard Dynamics Cascade 程序对化合物 10/beclin-1 复合物进行分子动力学模拟。

**自噬活性测试** 在 6 孔板中, 用终浓度为  $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

的化合物对 MDA-MB-231 作用 24 h 后收取细胞样品, 提取细胞蛋白, 采用免疫印迹法检测 LC3 的表达。经归一化后将给药组相对于对照组 LC3 的表达量定义为该化合物的自噬活性。

**MTT 法检测细胞活性** 将处于对数生长期的 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 BT-549 细胞, 以 6 000 个/孔的密度分别接种于 96 孔板中。培养 24 h 后加入不同浓度的含药培养基, 继续培养 72 h。加入 MTT 培养 3~4 h, 弃去含 MTT 培养基, 用 DMSO 溶解后在 492 nm 下测吸光值。细胞抑制率% = (对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值) / (对照组平均 A 值 - 空白对照组平均 A 值)  $\times 100\%$ 。用 GraphPad Prism 7.0.1 软件计算半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 值。

**流式细胞术检测凋亡** 取对数期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入不同浓度的化合物 10 或 3-MA 孵育 24 h, 用 PBS 洗涤, 胰酶消化, 离心收集细胞并计数, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$  个/样。取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液于流式管中, 然后加入 FITC 和 PI 各 5  $\mu\text{L}$ , 轻轻吹匀后, 避光染色 30 min, 过 200 目流式筛后用流式细胞仪检测, 并用 Flowjo 软件进行分析。

**蛋白质免疫印迹实验** 取对数期的 MDA-MB-231 细胞接种于 6 孔板或 60 mm 培养皿中培养 24 h, 药物作用 24 h, 收集细胞, 低温裂解, 提取蛋白质, 高温变性后用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 转入醋酸纤维素薄膜后封闭 1 h, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵一抗过夜, TBST 洗膜后加入二抗孵育 1 h, TBST 洗涤 30 min, 加入显影液曝光, 分析结果。

**Hoechst 33258 染色** 将 MDA-MB-231 细胞以每毫升  $2.5 \times 10^5$  个的细胞密度接种于 6 孔培养板中, 培养 24 h, 加入化合物 10 处理 24 h 后, 弃去培养基, PBS 清洗细胞两次, 随后加入胰蛋白酶消化, 离心收集细胞, 用 PBS 重悬清洗细胞沉淀 2 次, 加入 Hoechst 染液 0.5 mL, 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下避光孵育 30 min, 离心, 弃上清液, 用 PBS 清洗细胞 2 次, 然后加入 PBS 0.1 mL 重悬细胞, 取 10  $\mu\text{L}$  混悬液制片, 在倒置荧光显微镜下观察亚细胞结构的改变。

**免疫荧光实验** 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 以每孔  $2 \times 10^4$  个的密度接种于放有爬片的 24 孔板中培养 24 h。加入含化合物 10 的培养基, 继续培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 20 min。用 LC3B 抗体 (1:500) 在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下孵育过夜, 之后加入 FITC 标记的二抗 (TRITC, ab6718; FITC, ab6717) 在室温下孵育 1 h。最后加入  $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  DAPI 染液染色 30 min, 封片后在荧光显微镜下观察。

**GFP/mRFP-LC3 转染** 取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞, 以每孔  $2 \times 10^4$  个的密度接种于放有爬片

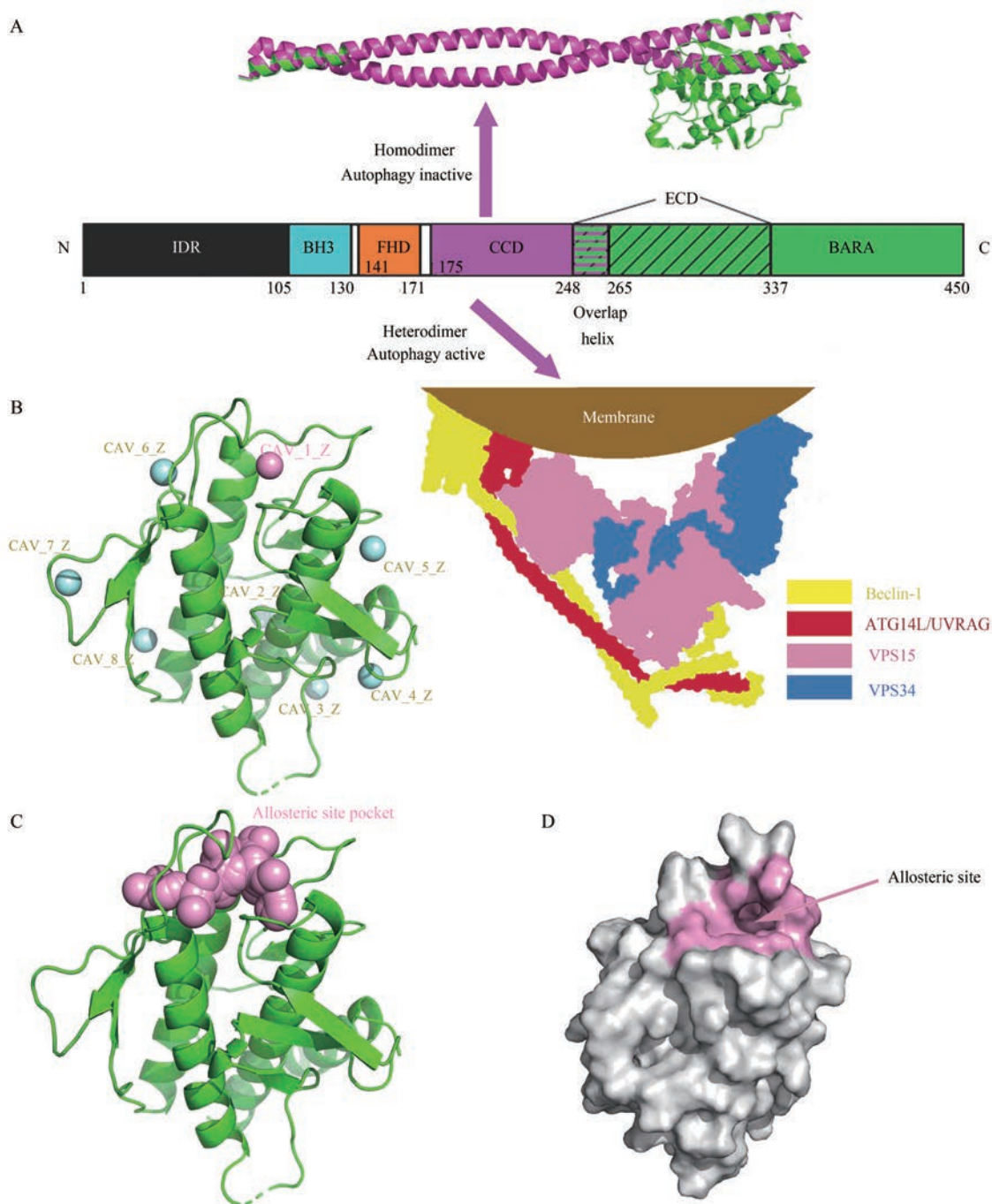
的 24 孔板中培养 24 h。转染 GFP/mRFP-LC3 质粒 [HB-AP2100001, 汉恒生物科技(上海)有限公司] 后继续培养 6 h。加药物处理后在荧光显微镜下分析。

**统计学分析** 所有给出的数据和结果都经过至少 3 次独立实验验证。采用 GraphPad Prism 7.0.1 软件对独立设计的两组连续变量进行差异显著性分析。两组间的统计学差异采用 *t* 检验, 多组间采用单因素方差分析确定。以  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 结果

### 1 Beclin-1 ECD 结构域中变构位点的识别

鉴于 beclin-1 在发挥功能时存在广泛的变构调节<sup>[35-37]</sup>, 本研究假设可能存在能够影响 beclin-1 功能的关键变构位点。如图 1A 中所示, 构象的改变对 beclin-1 的功能至关重要。Beclin-1 在形成同源二聚体时, 自噬被抑制。当与 ATG14L 或 UVRAG 形成异源二聚体之后, 通过进一步与 VPS34 形成 3 类 PI3K 复合体, 参与



**Figure 1** Domain architecture of beclin-1 and potential allosteric site. A: Domains of beclin-1 and the architecture of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) complexes; B: The potential allosteric site of beclin-1 was predicted using PARS (<http://bioinf.uab.cat/pars>); C: The potential allosteric site of beclin-1 was predicted using Allosite (<http://mdl.shsmu.edu.cn/AST>); D: The potential allosteric site of beclin-1

自噬过程。如图 1B 所示, 利用 PARS<sup>[38]</sup> 方法在 beclin-1 ECD 结构域发现 8 个空腔, 其中 CAV\_1\_Z (图 1B 紫色部分) 位置  $P$  值为 0.16, 在所有预测的口袋  $P$  值中为最小值。根据 PARS 评分规则, 这个位置最有可能是变构位点。Allosite<sup>[39]</sup> 是发展较好的变构位点发现方法, 其成功预测了 Sirt6 的变构位点<sup>[40]</sup>。Allosite 识别了 ECD 结构域中一个由 Arg292、Trp300、Pro350、Tyr352、Cys353、Ser354、Gly355、Gly356、Leu357、Arg358、Trp361、Asp362、Lys364、Phe365、Asp366、Thr417、Asn420、Ser421、Glu422 和 Trp425 构成的疏水口袋。口袋体积为 572.003 埃, Allosite Score 为 0.8 (图 1C)。且这个口袋与 PARS 预测的 CAV\_1\_Z 有较大的重合。因此, 认为这个口袋是 ECD 结构域中的变构位点。这些预测表明, 在 beclin-1 ECD 结构域表面的 Phe82 和 Phe86 周围的这个疏水口袋可能具有变构位点的功能 (图 1D)。

## 2 虚拟筛选

利用多重对接策略寻找 beclin-1 小分子激活剂。如图 2 所示, SPECS 文库共有 212 255 个化合物被利平斯基五规则 (Lipinski's "rule of five") 过滤后剩下 97 360 个小分子。过滤后的 SPECS 化合物库使用 Discovery Studio

软件 (3.5 版) 的 LibDock fast searching 模块快速对接到 beclin-1 晶体结构 (PDB ID: 4DDP) 中的变构位点, 筛选出了前 1 000 个小分子化合物 (得分在 120 分以上)。LibDock high quality 及 CDOCKER 模块对这 1 000 个小分子化合物进行两次精准对接筛选, 得到结合自由能最低的前 200 个化合物。根据结构多样性原则, 从 200 个化合物中挑选 32 个化合物进行自噬活性评价及抗肿瘤活性评价 (表 1)。

## 3 自噬活性及抗肿瘤活性评价

采用免疫印迹法评价 32 个化合物 (结构如表 1 所示) 的自噬活力。免疫印迹结果及统计数据表明, 化合物 9~16、25 和 26 明显促进 LC3-II 的累积 (图 3A)。随后, 进一步考察这 10 个化合物对 beclin-1 表达的影响, 免疫印迹结果发现化合物 9、10、16 和 25 明显促进 beclin-1 的表达 (图 3B)。采用 MTT 法评价 32 个化合物对 MCF-7、MDA-MB-231、MDA-MB-468 和 BT-549 4 个乳腺癌细胞系的抗增殖活性。如表 1 所示, 化合物 8~10 在检测的 4 个细胞系中均表现出较好的抗增殖活性。对 MDA-MB-231 细胞的抗增殖活性尤为明显,  $IC_{50}$  值分别为  $10.11 \pm 1.92$ 、 $9.12 \pm 2.12$  和  $8.25 \pm 1.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综上所述, 化合物 10 能够诱导 MDA-MB-231 细胞中

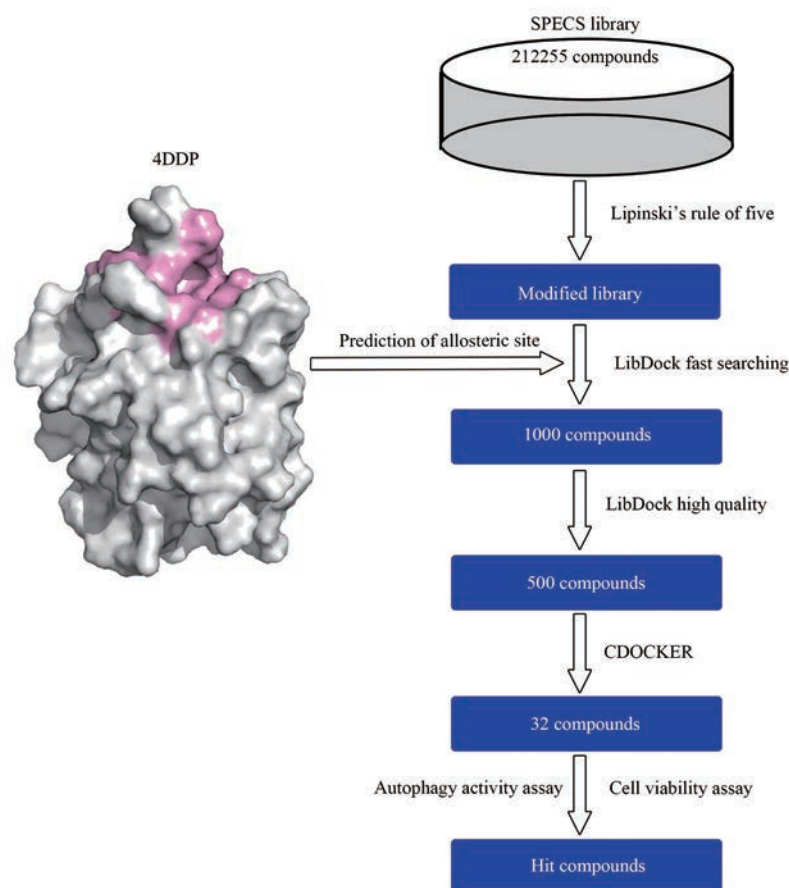
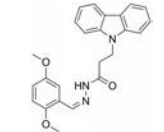
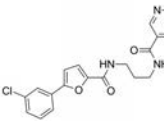
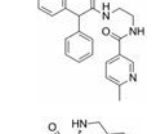
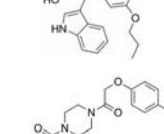
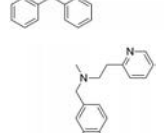
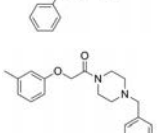
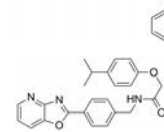
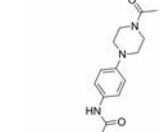
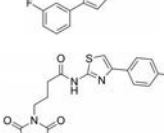
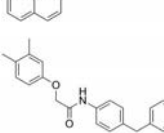
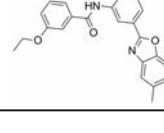

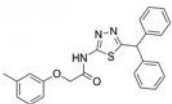
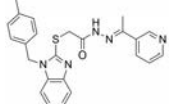
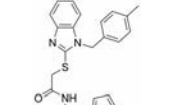
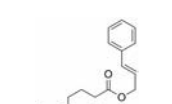
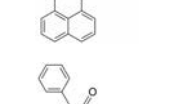
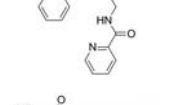
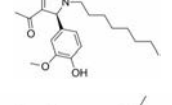
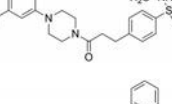
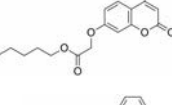
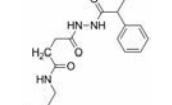
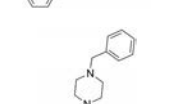
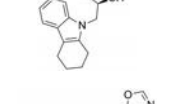


Figure 2 Workflow of the rational design of beclin-1 allosteric activator

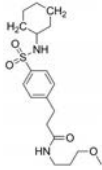
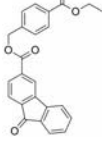
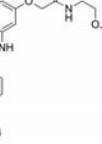
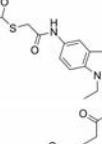
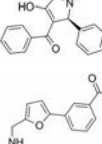
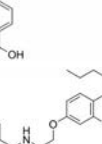
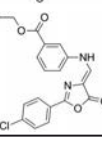
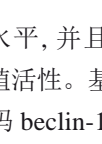
**Table 1** The structure and anti-proliferative evaluations of candidate compounds. <sup>a</sup>Cell viability were measured for each compound with various concentrations by MTT assay for 72 h. The half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values were calculated by GraphPad Prism 7.0.1. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$

No.	SPECE ID	Structure	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1a</sup>			
			MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468	BT-549
1	AG-690/11383169		>50	>50	>50	>50
2	AO-365/43474690		>50	>50	>50	>50
3	AO-365/43474595		>50	>50	>50	>50
4	AN-465/43436567		24.20 ± 1.32	21.23 ± 2.71	26.36 ± 1.53	>50
5	AT-057/43318401		>50	>50	>50	>50
6	AT-057/43469262		29.62 ± 1.37	34.16 ± 3.32	>50	>50
7	AT-057/43316304		>50	31.29 ± 2.03	27.31 ± 3.15	>50
8	AP-970/43375089		20.04 ± 1.34	10.11 ± 1.92	11.22 ± 2.21	16.16 ± 1.43
9	AP-970/43374438		21.16 ± 2.01	9.12 ± 2.12	11.18 ± 2.21	14.11 ± 1.33
10	AG-690/12088124		14.25 ± 1.82	8.25 ± 1.53	9.01 ± 2.31	12.21 ± 1.03
11	AP-970/12268291		>50	>50	>50	>50
12	AG-690/12886275		>50	31.32 ± 2.61	>50	>50

Continued

No.	SPECE ID	Structure	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1a</sup>			
			MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468	BT-549
13	AN-758/13950003		>50	>50	>50	>50
14	AF-399/14139038		>50	>50	>50	>50
15	AF-399/13806203		30.46 ± 1.54	9.21 ± 1.71	6.82 ± 2.33	>50
16	AF-399/11297201		>50	>50	>50	>50
17	AO-365/43264183		>50	>50	>50	>50
18	AQ-149/42126472		>50	>50	>50	>50
19	AH-487/42193287		34.21 ± 2.12	>50	>50	>50
20	AP-906/41078761		>50	>50	>50	>50
21	AN-329/40614416		31.02 ± 1.35	17.32 ± 2.71	22.05 ± 1.33	>50
22	AG-690/11638100		>50	28.31 ± 2.69	31.08 ± 1.23	5.13 ± 2.36
23	AP-124/42260120		>50	>50	>50	>50
24	AO-080/43378361		>50	>50	>50	>50

Continued

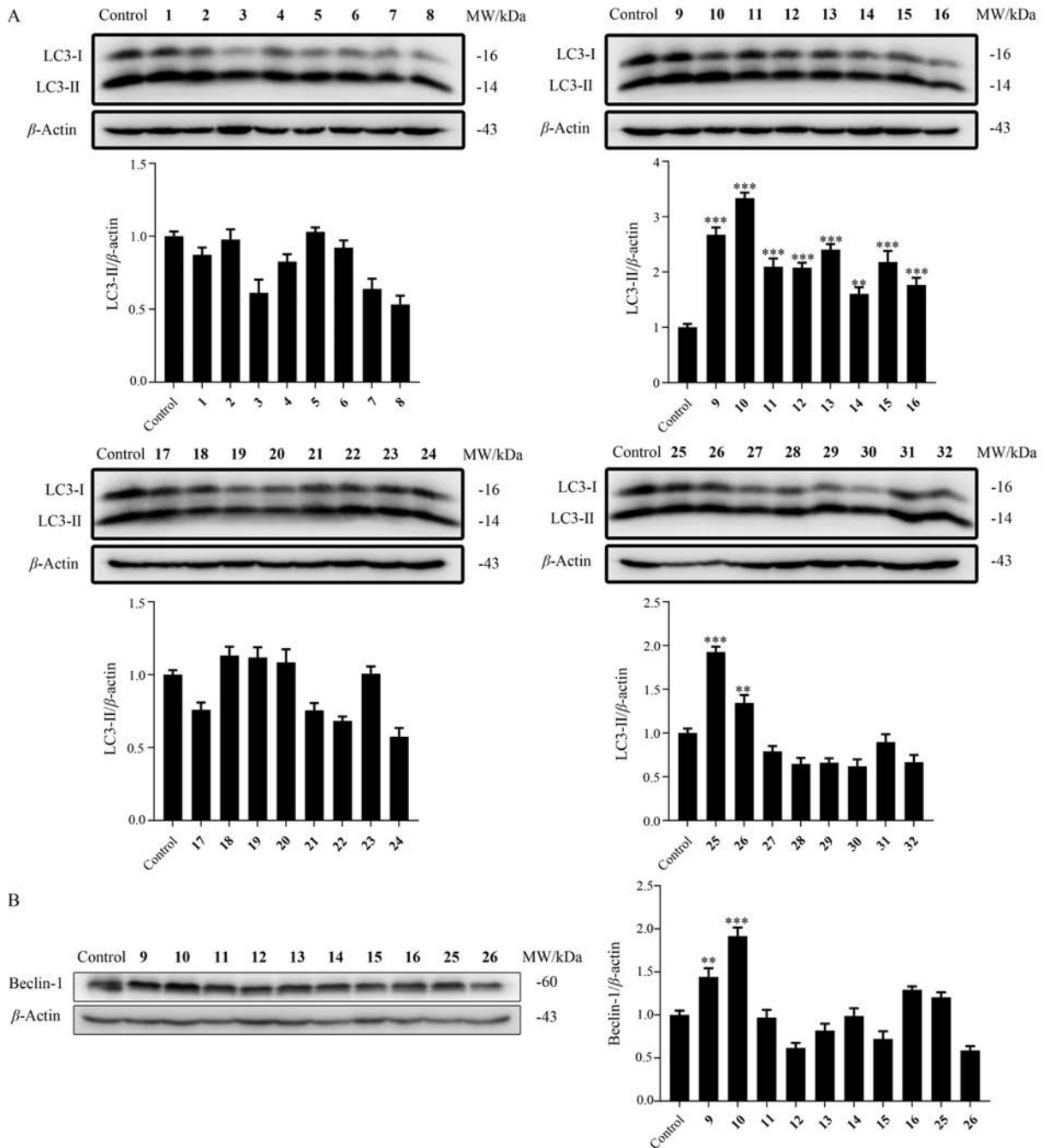
No.	SPECE ID	Structure	IC <sub>50</sub> /μmol·L <sup>-1a</sup>			
			MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468	BT-549
25	AH-487/42477459		>50	>50	>50	>50
26	AK-918/41944809		>50	>50	>50	>50
27	AG-205/41005786		34.21 ± 1.12	27.31 ± 3.07	31.32 ± 2.18	27.08 ± 3.26
28	AP-853/42877971		>50	>50	26.32 ± 1.43	34.21 ± 2.57
29	AQ-149/13889236		>50	>50	>50	>50
30	AN-465/43411024		>50	>50	>50	>50
31	AO-022/43453564		>50	>50	>50	>50
32	AJ-030/14523412		31.16 ± 2.12	26.31 ± 3.05	12.16 ± 1.18	35.11 ± 2.14

LC3的明显积累,上调 beclin-1 的水平,并且在4个乳腺癌细胞系中表现出了明显的抗增殖活性。基于TCGA数据分析发现, *BECN1* 基因(编码 beclin-1 蛋白)在TNBC中明显低表达(图4),因此猜测化合物 **10** 在MDA-MB-231细胞系中表现出较明显的抗增殖作用是由于 beclin-1 被激活,进一步诱导自噬后导致。因此,本研究进一步研究了化合物 **10** 在MDA-MB-231细胞系中的抗增殖作用机制。

#### 4 结合模式分析

由于化合物 **10** 能够引起MDA-MB-231细胞中LC3的显著积累,并且导致 beclin-1 水平显著上调,同时化合物 **10** 对4个乳腺癌细胞系都表现出较明显的抗增殖活性,因此本研究进一步分析了化合物 **10** 与 beclin-1

的结合模式。本课题组选择了结合自由能最有利、取向最合理的化合物 **10** 配体结构作为最佳对接构象。如图5所示,化合物 **10** 由左边的氯苯基和噻唑环部分、中间的酰胺部分和苯并三环部分组成。氯苯基作为疏水部分主要与 Tyr352、Pro350、Cys353 和 Lys364 形成  $\pi$ -烷基相互作用。噻唑环部分与 Trp361 形成  $\pi$ - $\pi$  F-型堆积,与 Phe365 形成 T-型堆积及  $\pi$ -硫相互作用,与 Cys353 形成  $\pi$ -硫相互作用。中间的酰胺部分与 Cys353 和 Thr417 形成氢键相互作用,与 Arg358 形成碳氢键相互作用。苯并三环部分与 Thr417 和 Leu353 形成碳氢键相互作用,与 Arg358 形成  $\pi$ -烷基相互作用,与 Glu422 形成  $\pi$ -阴离子相互作用。为了进一步确定化合物 **10**/beclin-1 复合物的稳定性,本研究还对化合物 **10**/



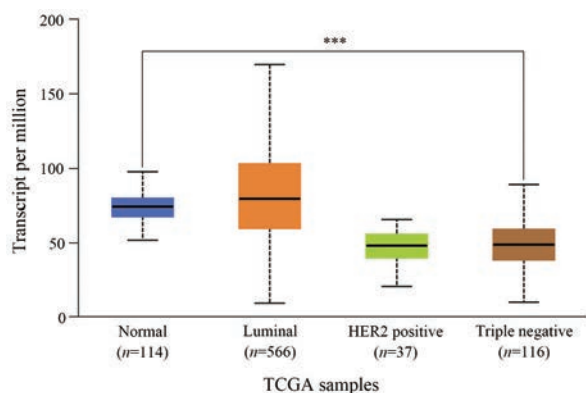
**Figure 3** Autophagy activity assay of candidate compounds. A, B: MDA-MB-231 cells were incubated with  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  candidate compounds, respectively, then the expression levels of LC3 and beclin-1 were detected.  $\beta$ -Actin was measured as the loading control.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control

beclin-1 复合物进行了 1 ns 的分子动力学模拟。如图 5C 所示, 较低的均方根偏差 (RMSD) 波动和系统的能量、温度和压力的收敛表明它是一个稳定的系统。因此, 化合物 10 可能靶向结合 beclin-1 的 ECD 结构域而调控自噬。然而, 化合物 10 与 beclin-1 的相互作用还需要基于体外的结合亲和力和实验进一步验证。

### 5 化合物 10 诱导 MDA-MB-231 细胞自噬性死亡

为了进一步确认化合物 10 对 MDA-MB-231 细胞

自噬的影响, 本研究首先进行了免疫荧光染色分析, 免疫荧光染色的结果表明, 化合物 10 可以明显诱导 MDA-MB-231 细胞中 LC3-II 的增加 (图 6A)。随后, 采用免疫印迹检测了化合物 10 处理后 MDA-MB-231 细胞中自噬关键蛋白的表达。结果发现, 化合物 10 可以浓度依赖的方式促进 p62 的降解, 增加 beclin-1 的表达和 LC3-II 的累积。以上结果表明, 化合物 10 可以诱导 MDA-MB-231 细胞发生自噬 (图 6B)。使用自噬抑制



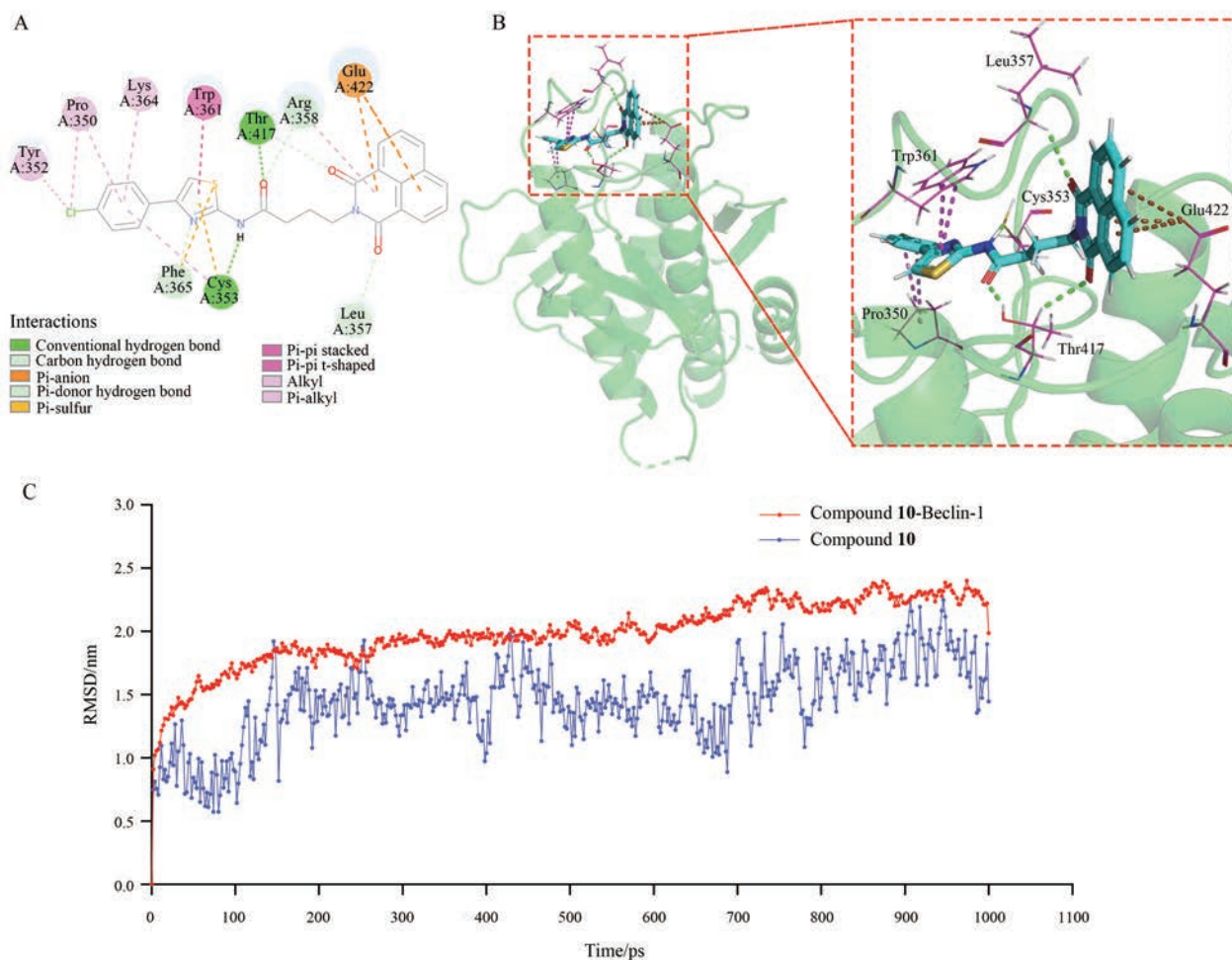
**Figure 4** Expression of *BECN1* gene (encode beclin-1 protein) in breast cancer based on breast cancer subclasses. HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; BRCA: Breast invasive carcinoma

剂3-MA进一步考察化合物10诱导的自噬与细胞增殖之间的关系。MTT实验结果表明, 3-MA可以明显抑制化合物10的抗增殖作用, 表明化合物10诱导的自噬促进了MDA-MB-231细胞的增殖抑制(图6C)。随后

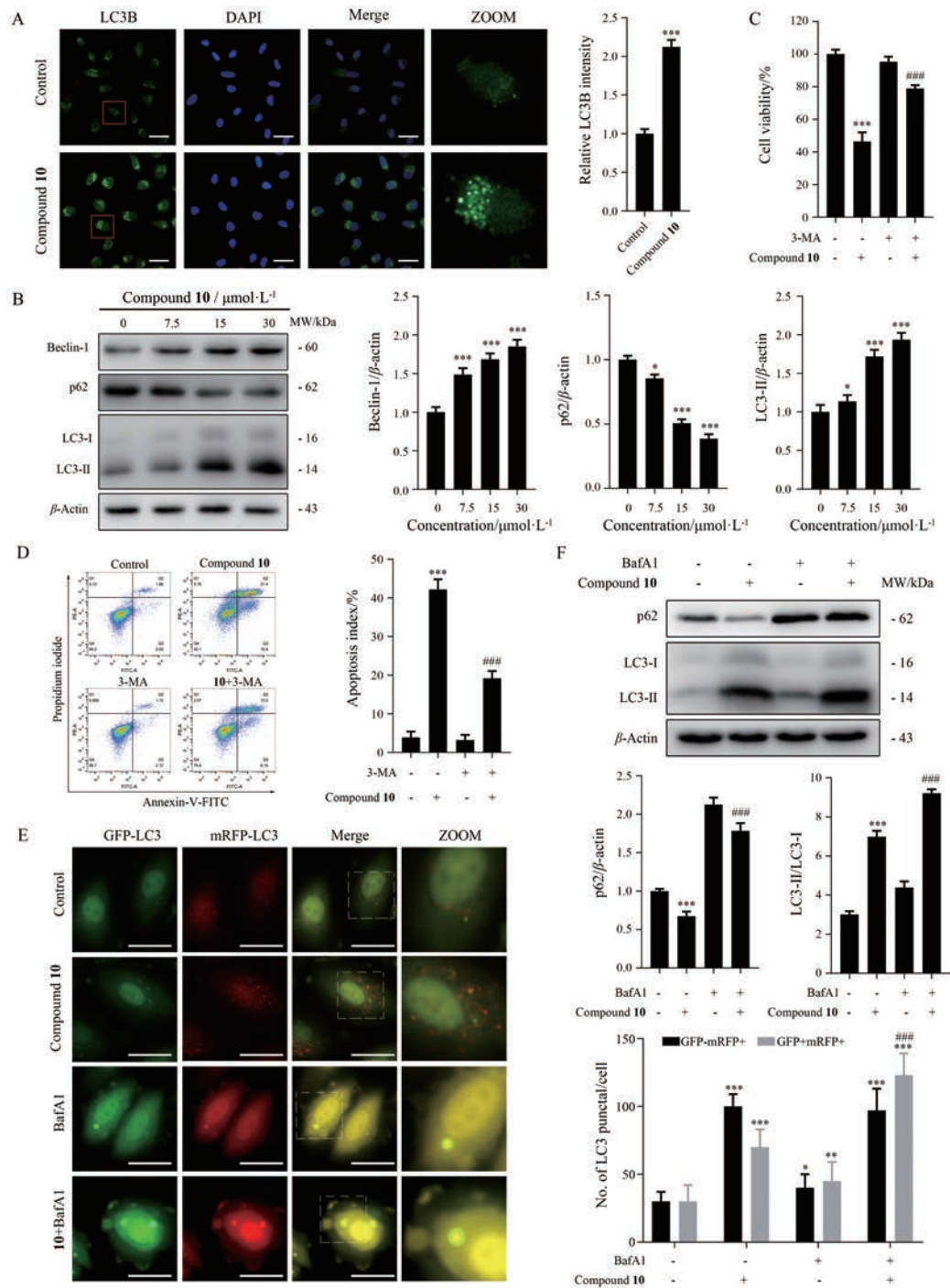
考察了化合物10诱导的自噬与凋亡的关系, 流式结果表明3-MA可以降低化合物10诱导的凋亡率(图6D), 推测化合物10诱导的自噬促进了凋亡。采用GFP-mRFP-LC3质粒转染MDA-MB-231细胞后, 用化合物10和bafilomycin A1处理细胞, 结果显示化合物10能够使RFP荧光信号显著增强, 当用bafilomycin A1提前处理细胞后再用化合物10处理细胞, 发现GFP-RFP荧光信号显著增强(图6E)。另外, 免疫印迹结果表明, bafilomycin A1可以抑制化合物10诱导的p62降解, 促进LC3-II的积累, 进一步证明了化合物10有诱导自噬的作用(图6F)。综上所述, 化合物10可能导致MDA-MB-231细胞发生自噬相关性细胞死亡。

### 6 化合物10诱导MDA-MB-231细胞凋亡

正常条件下, Bcl-2通过与beclin-1的BH3结构域结合, 细胞维持低水平自噬。Bcl-2与beclin-1的相互作用被破坏时自噬被激活<sup>[41]</sup>。而Bcl-2作为抗凋亡蛋白, 对细胞命运有重要的影响。针对自噬相关蛋白设计的许多小分子化合物在诱导癌细胞自噬性死亡的同



**Figure 5** Identification of compound 10 as potential activator of beclin-1. A, B: The binding mode of compound 10 and beclin-1; C: Molecular dynamics simulation of compound 10 binding to beclin-1. RMSD: Root mean squared deviation



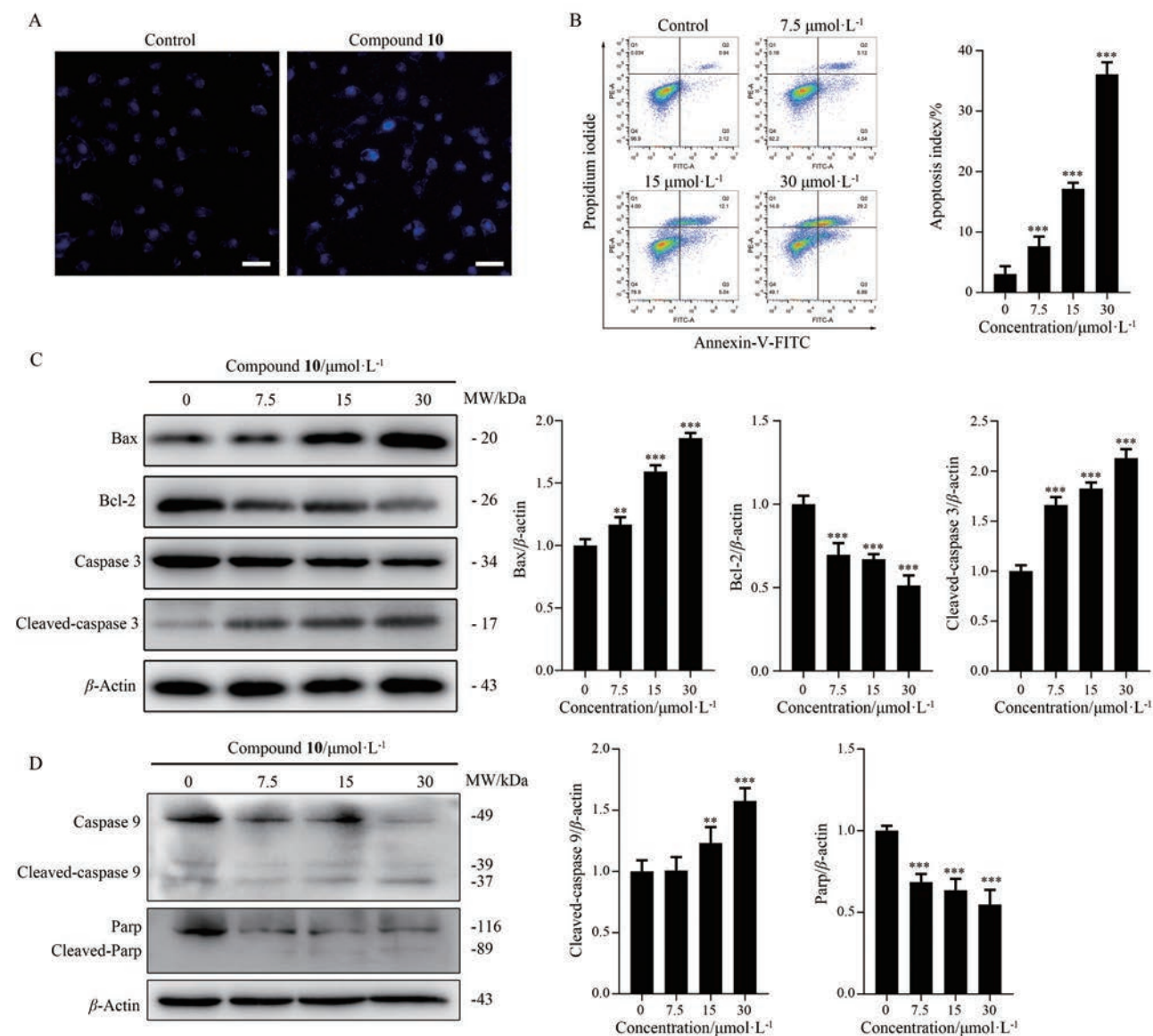
**Figure 6** Effect of compound **10** on autophagy of MDA-MB-231 cells. **A**: MDA-MB-231 cells were treated with  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10** for 24 h. Then, the expression of LC3B (LC3-II) puncta were detected by immunocytochemistry with zoom of LC3-II positive staining. Green: AntiLC3B. Blue: DAPI. Scale bar =  $20 \mu\text{m}$ ; **B**: MDA-MB-231 cells were incubated with  $7.5$ ,  $15$ , and  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10**, respectively, then the expression levels of beclin-1, p62, and LC3 were detected.  $\beta$ -Actin was measured as the loading control; **C**: MDA-MB-231 cells were treated with  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10**, 3-MA ( $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was added 1 h before treatment of compound **10**. After the above treatment, cell viabilities were detected by MTT assay; **D**: MDA-MB-231 cells were treated with  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10** for the indicated time, apoptosis ratios were determined by flow cytometry analysis of Annexin-V/PI double staining. 3-MA ( $1 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) was added 1 h before treatment of compound **10**; **E**: MDA-MB-231 cells were transfected with GFP/mRFP-LC3 plasmid, after co-incubation with  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10** in the presence or absence of  $10 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  bafilomycin A1 (BafA1), the GFP-LC3 puncta were observed by fluorescence microscope, with zoom of GFP-mRFP-LC3 positive signal. Green: GFP signal; Red: mRFP signal; Yellow: GFP + mRFP signal; Scale bar =  $20 \mu\text{m}$ ; **F**: MDA-MB-231 cells were co-incubated with  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10** in the presence or absence of  $10 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  BafA1, then the expression levels of p62 and LC3 were detected.  $\beta$ -Actin was measured as the loading control.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control; ### $P < 0.001$  vs compound **10**

时,也伴随着细胞凋亡的发生<sup>[42-44]</sup>。因此,本研究进一步研究了化合物 **10** 对细胞凋亡的影响。Hoechst 染色结果如图 7A 所示,化合物 **10** 作用于 MDA-MB-231 细胞后,细胞核皱缩,出现 DNA 凝聚,荧光强度升高,表明化合物 **10** 诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。Annexin V-PI 流式细胞术分析表明,化合物 **10** 处理细胞后 FITC-Annexin V (+)/PI (-) 早期凋亡细胞和 FITC-Annexin V (+)/PI (+) 晚期凋亡细胞数均明显增多,化合物 **10** 可以剂量依赖性诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡(图 7B)。免疫印迹结果表明,化合物 **10** 能够使 Bax 上调, Bcl-2 表

达下调,同时,活化的 caspase 3 也随着化合物 **10** 的作用浓度增强而表达量上调(图 7C)。此外,还发现活化的 caspase 9 表达水平显著上调,凋亡标志蛋白 Parp 表达水平显著降低。因此,推测化合物 **10** 可能剂量依赖性导致 MDA-MB-231 细胞发生线粒体途径凋亡。

### 讨论

乳腺癌是女性中最常见的恶性肿瘤, TNBC 是其中最难治疗的亚型<sup>[3]</sup>。目前该肿瘤的治疗以手术和放、化疗为主,但疗效有限,复发率高。自噬的药理学



**Figure 7** Effect of compound **10** on apoptosis of MDA-MB-231 cells. A: MDA-MB-231 cells were treated with compound **10** for indicated time, then stained with  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Hoechst 33258 and observed under a fluorescence microscope. Scale bar =  $50 \mu\text{m}$ ; B: MDA-MB-231 cells were treated with  $7.5, 15,$  and  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10** for the indicated time, respectively, apoptosis ratios were determined by flow cytometry analysis of Annexin-V/PI double staining; C, D: MDA-MB-231 cells were incubated with  $7.5, 15,$  and  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  compound **10**, respectively, then the expression levels of Bax, Bcl-2, caspase 3, caspase 9, and Parp were detected.  $\beta$ -Actin was measured as the loading control.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ .  $**P < 0.01,$   $***P < 0.001$  vs control

激活在多项临床前研究中已经表现出了较理想的抗肿瘤效果<sup>[43,45]</sup>, 针对自噬过程设计靶向自噬相关蛋白激活自噬是开发靶向调节自噬抗肿瘤的主要手段<sup>[19,20]</sup>。Beclin-1 是乳腺癌治疗的潜在靶点, 为探索通过小分子靶向 beclin-1 激活自噬的临床应用潜能, 本实验探究了小分子靶向 beclin-1 激活自噬对 MDA-MB-231 细胞命运的影响及其可能的分子机制, 以期为开发更有效的乳腺癌临床治疗靶点及新药提供理论和实验依据。

变构调控是蛋白质在发挥功能过程中的重要调节方式, 针对变构调节开发的变构位点识别方法已经成功应用于 Sirt6、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 等靶标的小分子变构调节剂的识别<sup>[40,46]</sup>。Beclin-1 在发挥功能过程中存在着多种构象的改变<sup>[35-37]</sup>, 因此可能存在潜在的变构调节位点调控 beclin-1 的功能。本研究利用多种变构位点识别方法识别 beclin-1 的潜在变构位点, 结合高通量虚拟筛选及体外活性评价, 寻找能够通过靶向 beclin-1 激活自噬并且诱导乳腺癌细胞死亡的变构调节小分子化合物。研究发现, 化合物 **10** 能够激活自噬, 上调 beclin-1 水平。同时数据表明, 化合物 **10** 能高效抑制 MDA-MB-231 细胞的增殖 (72 h, IC<sub>50</sub> 为  $8.25 \pm 1.53 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。分子对接结果及分子动力学模拟也提示化合物 **10** 能够与 beclin-1 形成稳定的相互作用。以上结果表明, 化合物 **10** 作为可以激活自噬的 beclin-1 有效激动剂, 且具有抑制乳腺癌细胞 MDA-MB-231 增殖的作用。然而, 化合物 **10** 与 beclin-1 的相互作用还需体外等温滴定量热法和表面等离子体共振等实验数据的支持。同时, 对于 ECD 中的变构位点的验证以及深入的变构调节机制的阐明, 需要整个磷脂酰肌醇-3-激酶复合体高分辨率三维结构信息的支持。

诱导癌细胞产生持续的自噬, 导致癌细胞发生自噬性死亡是小分子靶向激活自噬抗肿瘤的主要机制, 同时也伴随着细胞凋亡的发生<sup>[19]</sup>。冬凌草甲素和二甲基胍能够诱导癌细胞发生 p53 介导的自噬和死亡<sup>[47]</sup>。靶向 ULK1 (Unc-51 Like autophagy activating kinase 1) 小分子激动剂 LYN-1604 通过诱导 TNBC 细胞死亡而展现出潜在的临床治疗潜力<sup>[45]</sup>。BRD4 (bromodomain-containing protein 4) 抑制剂 FL-411 能够诱导乳腺癌细胞自噬性死亡<sup>[43]</sup>。本研究发现, 化合物 **10** 能够通过激活自噬诱导 MDA-MB-231 细胞发生自噬性死亡。除自噬性死亡之外, 化合物 **10** 还能够诱导 MDA-MB-231 细胞凋亡。细胞自噬和细胞凋亡之间存在相互影响和相互关联的机制, 有时细胞自噬能够诱导细胞凋亡。研究表明, 自噬体膜是细胞内死亡诱导信号复合物 (iDISC) 介导的 caspase-8 激活和细胞凋亡的平台, 自噬体的形成促进了 caspase-8 的激活, 而 caspase-

8 可以激活细胞凋亡<sup>[48]</sup>。因此, 除诱导 MDA-MB-231 细胞自噬性死亡之外, 化合物 **10** 引起的凋亡现象可能是由于持续的自噬过程中产生了大量的自噬体, 从而进一步激活 caspase-8, 引起细胞内 caspase 级联反应, 导致 MDA-MB-231 细胞凋亡。本研究数据表明, 化合物 **10** 在 MDA-MB-231 细胞系中具有良好的抗肿瘤效果。然而, 化合物 **10** 的药理作用还需扩展到其他乳腺癌细胞系进行深入研究。同时, 需要深入研究化合物 **10** 与 beclin-1 的结合模式和变构调节机制。以此为依据, 进一步以化合物 **10** 为先导化合物, 通过化学合成手段合成化合物 **10** 的系列衍生物进行构效关系研究, 进一步提高其自噬活性和抗肿瘤活性。

综上所述, 作为调控自噬进程的关键蛋白, beclin-1 的激活可能具有潜在的抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的药理作用。其机制可能是 beclin-1 的激活导致乳腺癌细胞自噬通量持续激活, 引起 TNBC 细胞发生自噬性死亡, 同时也引发了乳腺癌细胞发生线粒体途径凋亡。因此, 针对 beclin-1 开发靶向自噬激动剂可能具有用于靶向 TNBC 治疗的潜在价值。本研究筛选得到的化合物 **10** 在细胞水平表现出了较好的自噬激活活性和抗增殖活性, 可作为先导化合物, 为后续靶向 beclin-1 激动剂的优化提供参考。

**致谢:** 感谢四川大学生物治疗国家重点实验室的欧阳亮教授和许恒教授对本文的指导。

**作者贡献:** 符雷蕾和刘博负责本实验研究的设计; 赵荣演负责实验执行; 靳文珂、姜星、袁兆鑫参与实验研究; 赵荣演和靳文珂分析实验数据和撰写论文; 所有作者阅读和修改本论文。

**利益冲突:** 本文所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 29 cancer groups, 1990 to 2017: a systematic analysis for the global burden of disease study [J]. *JAMA Oncol*, 2019, 5: 1749-1768.
- [2] Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9: 176-198.
- [3] Jiang YZ, Ma D, Suo C, et al. Genomic and transcriptomic landscape of triple-negative breast cancers: subtypes and treatment strategies [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35: 428-440.
- [4] Vagia E, Mahalingam D, Cristofanilli M. The landscape of targeted therapies in TNBC [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12: 916.
- [5] Nishimura T, Tooze SA. Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation [J]. *Cell Discov*,

- 2020, 6: 32.
- [6] Zhu Q, Lin F. Molecular markers of autophagy [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 33-38.
- [7] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. Cell, 2008, 132: 27-42.
- [8] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective [J]. Cell, 2019, 176: 11-42.
- [9] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. Nature, 2008, 451: 1069-1075.
- [10] Ouyang L, Zhang L, Liu B. Autophagy pathways and key drug targets in Parkinson's disease [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 9-17.
- [11] Levine B, Packer M, Codogno P. Development of autophagy inducers in clinical medicine [J]. J Clin Invest, 2015, 125: 14-24.
- [12] Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases [J]. Cell Res, 2014, 24: 69-79.
- [13] Liu H, Shao RG. The regulatory role of autophagy in tumor process [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2016, 51: 23-28.
- [14] Hua F, Yu JJ, Li K, et al. Autophagy in ageing and ageing-related diseases [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 764-773.
- [15] Decressac M, Mattsson B, Weikop P, et al. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from  $\alpha$ -synuclein toxicity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110: E1817-E1826.
- [16] Fernández ÁF, Sebti S, Wei Y, et al. Disruption of the beclin 1-Bcl2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice [J]. Nature, 2018, 558: 136-140.
- [17] Rocchi A, Yamamoto S, Ting T, et al. A Becn1 mutation mediates hyperactive autophagic sequestration of amyloid oligomers and improved cognition in Alzheimer's disease [J]. PLoS Genet, 2017, 13: e1006962.
- [18] Vega-Rubín-de-Celis S, Zou Z, Fernández ÁF, et al. Increased autophagy blocks HER2-mediated breast tumorigenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115: 4176-4181.
- [19] Zhang J, Wang G, Zhou Y, et al. Mechanisms of autophagy and relevant small-molecule compounds for targeted cancer therapy [J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75: 1803-1826.
- [20] Xiang H, Zhang J, Lin C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose [J]. Acta Pharm Sin B, 2020, 10: 569-581.
- [21] Tan CY, Tian HZ, Kuang H, et al. Medications regulate autophagy for treatment of Alzheimer's disease [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2019, 54: 984-990.
- [22] Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, et al. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles [J]. Nat Rev Drug Discov, 2017, 16: 487-511.
- [23] Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, et al. Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Neuron, 2017, 93: 1015-1034.
- [24] Williams A, Sarkar S, Cudston P, et al. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4: 295-305.
- [25] Li Z, Chen B, Wu Y, et al. Genetic and epigenetic silencing of the beclin 1 gene in sporadic breast tumors [J]. BMC Cancer, 2010, 10: 98.
- [26] Tang H, Sebti S, Titone R, et al. Decreased BECN1 mRNA expression in human breast cancer is associated with estrogen receptor-negative subtypes and poor prognosis [J]. EBioMedicine, 2015, 2: 255-263.
- [27] Fu LL, Cheng Y, Liu B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45: 921-924.
- [28] Itakura E, Kishi C, Inoue K, et al. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19: 5360-5372.
- [29] Thoresen SB, Pedersen NM, Liestøl K, et al. A phosphatidylinositol 3-kinase class III sub-complex containing VPS15, VPS34, beclin 1, UVRAG and BIF-1 regulates cytokinesis and degradative endocytic traffic [J]. Exp Cell Res, 2010, 316: 3368-3378.
- [30] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy [J]. Autophagy, 2008, 4: 600-606.
- [31] Jung YY, Lee YK, Koo JS. The potential of beclin 1 as a therapeutic target for the treatment of breast cancer [J]. Expert Opin Ther Targets, 2016, 20: 167-178.
- [32] Mei Y, Su M, Sanishvili R, et al. Identification of BECN1 and ATG14 coiled-coil interface residues that are important for starvation-induced autophagy [J]. Biochemistry, 2016, 55: 4239-4253.
- [33] Li X, He L, Che KH, et al. Imperfect interface of beclin1 coiled-coil domain regulates homodimer and heterodimer formation with Atg14L and UVRAG [J]. Nat Commun, 2012, 3: 662.
- [34] Huang W, Choi W, Hu W, et al. Crystal structure and biochemical analyses reveal Beclin 1 as a novel membrane binding protein [J]. Cell Res, 2012, 22: 473-489.
- [35] Glover K, Li Y, Mukhopadhyay S, et al. Structural transitions in conserved, ordered beclin 1 domains essential to regulating autophagy [J]. J Biol Chem, 2017, 292: 16235-16248.
- [36] Ranaghan MJ, Durney MA, Mesleh MF, et al. The autophagy-related beclin-1 protein requires the coiled-coil and BARA domains to form a homodimer with submicromolar affinity [J]. Biochemistry, 2017, 56: 6639-6651.
- [37] Chang C, Young LN, Morris KL, et al. Bidirectional control of autophagy by BECN1 BARA domain dynamics [J]. Mol Cell, 2019, 73: 339-353.e6.
- [38] Panjkovich A, Daura X. PARS: a web server for the prediction of protein allosteric and regulatory sites [J]. Bioinformatics, 2014, 30: 1314-1315.
- [39] Huang W, Lu S, Huang Z, et al. Allosite: a method for predicting

- allosteric sites [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29: 2357-2359.
- [40] Huang Z, Zhao J, Deng W, et al. Identification of a cellularly active SIRT6 allosteric activator [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 1118-1126.
- [41] Sinha S, Levine B. The autophagy effector beclin 1: a novel BH3-only protein [J]. *Oncogene*, 2008, 27 Suppl 1: S137-S148.
- [42] Ouyang L, Zhang L, Fu L, et al. A small-molecule activator induces ULK1-modulating autophagy-associated cell death in triple negative breast cancer [J]. *Autophagy*, 2017, 13: 777-778.
- [43] Ouyang L, Zhang L, Liu J, et al. Discovery of a small-molecule bromodomain-containing protein 4 (BRD4) inhibitor that induces AMP-activated protein kinase-modulated autophagy-associated cell death in breast cancer [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 9990-10012.
- [44] Zhen Y, Zhao R, Wang M, et al. Flubendazole elicits anti-cancer effects *via* targeting EVA1A-modulated autophagy and apoptosis in triple-negative breast cancer [J]. *Theranostics*, 2020, 10: 8080-8097.
- [45] Zhang L, Fu L, Zhang S, et al. Discovery of a small molecule targeting ULK1-modulated cell death of triple negative breast cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chem Sci*, 2017, 8: 2687-2701.
- [46] Li C, Deng X, Zhang W, et al. Novel allosteric activators for ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 266-275.
- [47] Tong XP, Chen Y, Zhang SY, et al. Key autophagic targets and relevant small-molecule compounds in cancer therapy [J]. *Cell Prolif*, 2015, 48: 7-16.
- [48] Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: involvement of the dual role of autophagy under ER stress [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232: 2977-2984.