

三白草中 ATG4B 抑制剂的发现及活性测定

郑雪萍[#], 伏园园[#], 夏凡, 顾琼, 李民^{*}

中山大学药学院, 广州 510006

摘要: 验证从三白草中提取的两个化合物 XGN56 和 XGN59 对自噬关键蛋白 ATG4B 酶活性的影响及对自噬的调节作用。分子对接的方法验证化合物与游离 ATG4B 及 ATG4B-LC3 复合体的氢键结合作用; SDS-PAGE 法及荧光共振能量转移法 (FRET) 测定化合物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 抑制 ATG4B 的 IC_{50} 值; LC3 融合 GFP 荧光标签检测化合物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 对 LC3 荧光聚集的影响, 并设置正常组、给药组和药物联用 Baf (0.5 $\mu\text{mol/L}$) 组; 过表达 GFP-LC3 的 WT-MEF 及 $\text{ATG5}^{-/-}$ -MEF 细胞检测化合物诱导 LC3 荧光点的情况。结果显示, XGN56 和 XGN59 能分别与游离 ATG4B 和 ATG4B-LC3 复合体形成氢键作用, 且两者均能剂量依赖地抑制 ATG4B 的酶切活性, 体外 IC_{50} 分别为 7.74 $\mu\text{mol/L}$ 和 8.00 $\mu\text{mol/L}$, 同时能够 ATG5 依赖地促进 GFP 标记的自噬体的生成 ($P < 0.001$)。结果表明, 两个化合物可能是通过一定程度地抑制 ATG4B 的酶活性从而促进细胞自噬水平。

关键词: ATG4B; 三白草; 分子对接; 抑制剂; 自噬

中图分类号: R915

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)7-1252-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.7.019

Discovery and activity studies of ATG4B inhibitors from *Saururus chinensis* L.

ZHENG Xue-ping[#], FU Yuan-yuan[#], XIA Fan, GU Qiong, LI Min^{*}

School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: To verify the effects of two compounds extracted from *Saururus chinensis* (Lour.) Baill, XGN56 and XGN59, on the enzyme activity of autophagy key protein ATG4B and the regulation of autophagy. The hydrogen bond conjugation of free ATG4B and ATG4B-LC3 complex with compounds were verified by molecular docking; SDS-PAGE and fluorescence resonance energy transfer method (FRET) were used to determine the IC_{50} value of these two compounds (10 $\mu\text{mol/L}$) inhibiting ATG4B; LC3 fusion with GFP fluorescent tag protein was used to detect the effect of these two compounds (10 $\mu\text{mol/L}$) on the accumulation of LC3 puncta, and cells were divided into control group, compounds group and compounds coupled with Baf group (0.5 $\mu\text{mol/L}$); WT-MEF and $\text{ATG5}^{-/-}$ -MEF cells overexpressed with GFP-LC3 were employed to detect the induction of LC3 puncta by these two compounds. Results showed that XGN56 and XGN59 can form hydrogen bonds with both free ATG4B and ATG4B-LC3 complex respectively. Furthermore, both compounds could effectively inhibit the enzymatic activity of ATG4B in a concentration-dependent manner, with IC_{50} of 7.74 and 8.00 $\mu\text{mol/L}$ respectively, and could promote the formation of GFP-labeled autophagosomes ($P < 0.001$). All these results indicate that XGN56 and XGN59 promote the autophagy activity probably via the inhibition of ATG4B to a certain extent.

Key words: ATG4B; *Saururus chinensis* L.; molecular docking; inhibitors; autophagy

自噬是真核细胞内通过自噬溶酶体降解受损细胞器及大分子物质等废物并将其代谢回收利用的一种自我调节及保护机制, 可视作胞内的“回收工厂”^[1,2]。自噬是一个动态的过程, 主要分为自噬泡

的形成、自噬体膜的延伸和成熟、自噬溶酶体的形成等几个阶段^[3]。自噬的发生发展需要许多自噬相关蛋白 (autophagy related proteins, ATGs) 的参与, 其中包括由 ATG12-ATG5-ATG16 复合体和 LC3-PE 介导的两条泛素样通路, 其主要参与自噬体的形成与成熟, 是自噬过程中至关重要的一步^[4]。胞浆中的 LC3 前体首先需要被半胱氨酸蛋白酶 ATG4B 在其保守的 C 端 120 位精氨酸酶切暴露甘氨酸残基, 成

收稿日期: 2019-02-27 接受日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31671437); 广东省自然科学基金 (2016A030313335); 广州市产学研协同创新重大专项 (201604020109)

* 通信作者 Tel: 86-015521316122; E-mail: limin65@mail.sysu.edu.cn

[#]共同第一作者

为 LC3-I, LC3-I 经过一系列自噬蛋白的传递及活化,最后在 ATG12-ATG5-ATG16 复合体的作用下与 PE 共价结合形成膜结合形式的 LC3-II,从而参与自噬体双层膜的延伸。最后,ATG4B 又能发挥去脂化活性,将 LC3-I 从膜上解离得以循环利用^[5,6]。因此,ATG4B 功能的变化对自噬过程的调控具有重要的影响。

自噬作为一种防御机制,既可通过切断营养来源控制肿瘤细胞的增殖,又可作为保护机制被肿瘤细胞启动从而抵御外界刺激,可见自噬与肿瘤存在密不可分的联系。越来越多的研究发现,在某些肿瘤的生长过程中或是某些病理条件下都观察到 ATG4B 的高表达,说明 ATG4B 对肿瘤的发展可能起着重要的作用。有报道指出 ATG4B 活性位点的突变导致的自噬抑制也同时抑制了小鼠胰腺导管腺癌细胞的增殖^[7]。Akin 等^[8]筛选出的 ATG4B 抑制剂 NSC185058 对骨肉瘤细胞有显著的抑制作用。此外,本实验室前期利用虚拟筛选等方法筛选出的新型 ATG4B 抑制剂 S130 不仅对 ATG4B 有明显的抑制作用,同时也具有一定的抗肿瘤活性^[9]。因此,寻找筛选更多抑制效价高,特异性强的 ATG4B 抑制剂,对于开发以 ATG4B 为靶标的治疗手段具有重要的意义。

目前越来越多的科学家致力于在天然产物中提取抗肿瘤活性成分,开发天然的抗肿瘤药物。有报告表明,在 1981 至 2014 年间推出的 1562 个小分子药物中,有 65.0% 来源于天然产物,而其中抗肿瘤药物所占比例高达 83.0%^[10,11]。而且我国拥有非常丰富的天然产物资源,因此利用得天独厚的条件,寻找开发具有临床应用价值的天然活性化合物具有非常广阔的前景。三白草 *Saururus chinensis* (Lour.) Baill 属三白草科植物,是我国的一种传统中草药,具有清热解毒、利尿消肿的作用。有研究发现三白草的提取物三白草酮具有抗肿瘤活性,因此受到越来越多的关注^[12]。XGN56 和 XGN59 是从三白草中提取出的双木脂素类天然产物,两者的结构非常相似,仅在侧链构型及苯环取代基上有所不同^[13]。已有文献报道 XGN59 (三白脂素 8) 能够显著抑制在人乳腺癌细胞中高表达的缺氧诱导因子 HIF-1,导致癌细胞在微氧环境中适应能力下降,生长抑制,可见该化合物具备一定的临床应用价值^[14]。我们在前期筛选中发现两种化合物与 ATG4B 晶体结构均有较好的对接作用,同时结合本实验室建立的

ATG4 家族活性化合物筛选的方法学,验证了 XGN56 和 XGN59 对 ATG4B 功能的作用,为后续应用于疾病临床治疗及 ATG4B 抑制剂的筛选提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 细胞

GFP-LC3 HeLa、GFP-LC3 WT-MEF 及 GFP-LC3 ATG5^{-/-}-MEF 稳转细胞为本实验室保存。

1.2 药物、试剂与仪器

XGN56 和 XGN59 是从采自广西的三白草 *Saururus chinensis* (Lour.) Baill 地上部分,经 95% 乙醇提取,然后乙酸乙酯萃取,经各种色谱技术分离纯化得到;异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) (美国 Merck 公司);DMEM 高糖培养基及类胎牛血清 (美国 Gibco);巴弗洛霉素 (Bafilomycin, Baf) (美国 LC laboratories 公司);原核表达的 ATG4B 及底物 FRET-GATE-16 质粒均为本实验室构建及保存;Ni-NTA 填料 (北京韦氏博慧);脱盐柱 PD-10 (美国 GE 公司);分子对接软件 Accelrys Discovery Studio 2.5.5 (San Diego, CA, USA);三维结构对接显示软件 Py-MoL (DeLano Scientific, Palo Alto, CA);ATG4B (ID: 2CY7) 及 ATG4B-LC3 复合体 (ID: 2ZZP) 晶体结构均来源于 PDB 数据库 (Protein Data Bank);细胞培养箱 (美国 Thermo 公司);多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司);荧光显微镜 (美国 Life technologies 公司)。

1.3 分子对接

在 PDB 数据库中,ATG4B 的 PDB ID 为 2CY7, ATG4B-LC3 复合体的 PDB ID 为 2ZZP,选择这两种晶体结构作为与化合物对接的受体。利用 Accelrys Discovery Studio 2.5.5 进行分子对接,并通过 Consensus Score 对蛋白-化合物的对接效果进行打分,同时观察其结合模式,决定是否适合用于后续的活性测定。

1.4 蛋白表达及纯化

将 His-ATG4B 和 FRET-GATE-16 重组质粒分别转入原核表达菌株 BL21 (DE3),37 °C 过夜培养后,挑取单克隆至 LB 培养基中培养 12 h 左右,按照 1:100 扩增培养。当菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右时,加入 0.5 mmol/L IPTG,220 rpm,16 °C 诱导培养 16 h 后收集菌体。菌体离心后,用预冷的 PBS 清洗 2~3 次,按照湿菌重:结合缓冲液 = 1:5 的比例加入缓冲液重悬菌体,95% 的功率超声破碎 2 h。破碎后的菌

体离心后,吸取上清与适量的 Ni-NTA 填料 4 °C 结合 1 h,之后转移至柱子中,用含 200 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱目的蛋白,最后进行脱盐超滤浓缩后加入 20% 甘油于 -80 °C 保存。

1.5 FRET 法检测酶活性

在 384 黑板中将化合物以 100 $\mu\text{mol/L}$ 为起始浓度倍比稀释后与 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 的 ATG4B 在 37 °C 孵育 30 min,然后加入 50 $\mu\text{g/mL}$ 的底物 FRET-GATE-16,体系为 50 μL ,将板放入 37 °C 酶标仪中反应 30 min,测定反应结束时波长为 527 及 477 nm 的荧光值。化合物对 ATG4B 抑制作用公式为:抑制率 = $(\text{RFU}_{\text{max}} - \text{RFU}_{\text{compound}}) / (\text{RFU}_{\text{max}} - \text{RFU}_{\text{min}}) \times 100\%$ 。(RFU:527/477;RFU_{max}:空白组;RFU_{compound}:化合物组;RFU_{min}:无化合物,只有酶和底物组)。

1.6 SDS-PAGE 法检测酶活性

1.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 ATG4B 与梯度浓度的化合物在 37 °C 孵育 30 min,然后加入 250 $\mu\text{g/mL}$ 的底物 FRET-GATE-16,体系为 20 μL ,37 °C 继续孵育 30 min。反应结束后加入上样缓冲液,沸水煮 5 min 后上样电泳,结束后考马斯亮蓝染色分析。

1.7 GFP-LC3 荧光实验

稳定表达 GFP-LC3 的 HeLa 和 MEF 细胞用含有 10% 类胎牛血清的培养基重悬,于 37 °C、含 5% CO_2 的恒温培养箱中贴壁生长 24 小时后给药。GFP-LC3 HeLa 细胞接种于 96 孔板中:①正常组:完全培养基;②给药组:加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 XGN56 或 XGN59 刺激 6 h;③ Baf 组:加入 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Baf 处

理 6 h;⑤自噬潮组:10 $\mu\text{mol/L}$ 的 XGN56 或 XGN59 分别与 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Baf 混合处理细胞 6 h;GFP-LC3 WT-MEF 和 GFP-LC3 ATG5^{-/-}-MEF 细胞分别接种于 96 孔板中:①正常组:完全培养基;②给药组:加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 XGN56 或 XGN59 处理 6 h。处理完毕之后吸去上清,用 PBS 缓冲液清洗 1~2 次,4% 多聚甲醛室温固定 30 min,然后置于荧光显微镜下观察 GFP-LC3 荧光点。

1.8 统计学处理

采用 Graphpad 5.0 软件进行数据统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验比较两组间差异, $P < 0.05$ 即认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化合物与游离 ATG4B 对接结果

采用 Accelrys Discovery Studio 2.5.5 软件进行两种化合物与蛋白晶体结构的对接分析。两种天然产物的结构式如图 1A 所示。本实验室前期建立的 ATG4B 抑制剂虚拟筛选的方法中,已通过软件寻找游离型 ATG4B 晶体结构中可能的对接口袋位置^[9]。根据该口袋位置,我们进行了一步法的分子对接。对接结果显示,XGN56 能与 ATG4B(2CY7) 分子结构中的 ASN261 及 TRP142 两个氨基酸位点形成氢键相互作用(黄色粗短虚线),且两者具有良好的结合模式;XGN59 能与 ATG4B 蛋白结构中的 ASN261、HIS264 及 PRO304 位氨基酸残基形成 3 个氢键相互作用,且结合模式良好(图 1B)。

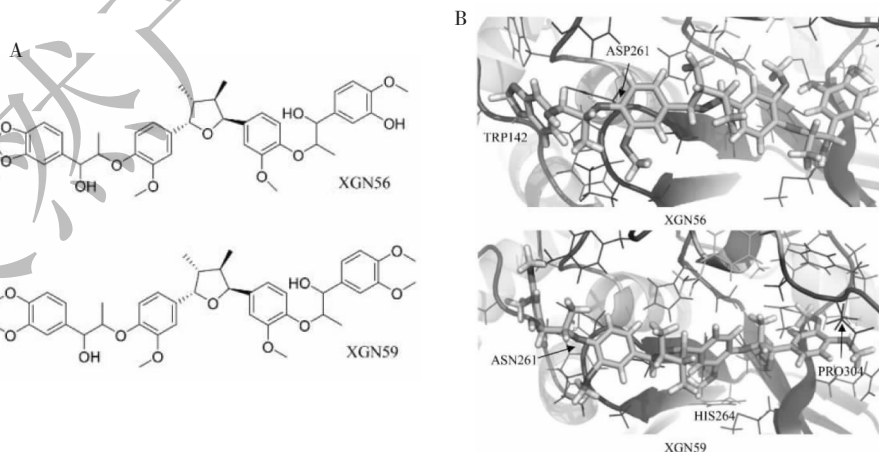


图 1 三白草分离产物 XGN56 和 XGN59 的结构式及与 ATG4B 结合模式

Fig. 1 Structure of XGN56 and XGN59 extracted from *Saururus chinensis* (Lour.)

Baill and their binding model to ATG4B by molecular docking

注:A:XGN56 与 XGN59 结构式;B:XGN56 和 XGN59 与 ATG4B 的结合模型。

Note:A:Structure of XGN56 and XGN59;B:The binding model of XGN56 and XGN59 with ATG4B.

2.2 化合物与 ATG4B-LC3 复合体对接结果

因为 ATG4B 在细胞内同时参与 LC3 的脂化与去脂化处理过程,因此,我们猜想这两个天然产物也应该能与 ATG4B-LC3 的复合体形成氢键相互作用。为了验证这一猜想,我们使用了 ATG4B-LC3 复合体 (ID:2ZZP) 的晶体结构进行下一步的分子对接工作。如图 2A 所示,site2 口袋是我们所能找到的晶体结构中最大且疏水性最好的口袋,既包含 ATG4B 结构部分氨基酸 (GLU135, GLY136, LYS137, GLN141, TYR143, GLY144, PRO145, ASN146, TYR147, VAL148, GLN150, LYS154),同时也包含

LC3B 结构部分氨基酸 (GLN43, LEU44, LEU73, ASN74, ASN76, GLN77, ALA78, SER115, GLN116, THR118)。我们选择该口袋作为 ATG4B-LC3 复合体与 XGN56 及 XGN59 的对接口袋。分子对接结果显示 XGN56 可与 ATG4B-LC3 复合体中的 LC3B 部分的 ASN74、ASN76、THR118 位氨基酸形成 3 个氢键相互作用,而 XGN59 则可与 ATG4B-LC3 复合体中的 LC3B 部分的 ASN74、GLN77、THR118 位氨基酸残基形成 4 个氢键作用,其中与 GLN77 位点形成两个氢键,结合力更强(图 2B)。

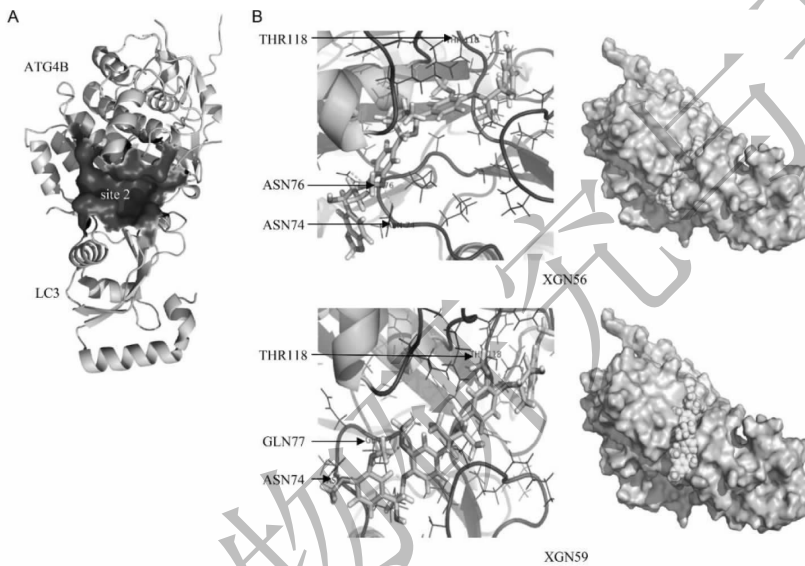


图 2 分子对接验证 XGN56 和 XGN59 与 ATG4B-LC3 复合体结合模式

Fig. 2 Overview of XGN56 and XGN59 binding to ATG4B-LC3 complex by molecular docking

注:A:ATG4B 蛋白 site2 口袋晶体结构;B:XGN56 和 XGN59 与 ATG4B-LC3 复合体结合模型。

Note:A:Crystal structure of pocket site2 of ATG4B;B:The binding model of XGN56 XGN59 with ATG4B-LC3 complex.

2.3 化合物对 ATG4B 酶活性抑制作用

基于化合物与 ATG4B 具有良好的结合作用,因此我们对化合物进行进一步的活性鉴定。我们采用本实验室建立的荧光共振能量转移法 (FRET) 和考马斯亮蓝染色法检测两个化合物对 ATG4B 酶活性的抑制作用。FRET 法是本实验室建立的一种灵敏的检测 ATG4 活性的方法^[15]。在 ATG4 的底物蛋白 GATE-16 的 N 端和 C 末端分别连上 CFP 与 YFP 标签后,两者由于距离较近可产生荧光共振能量转移,产生 527 nm 处的发射光。当 ATG4 酶切底物 C 端的 YFP 后,YFP 游离,导致 CFP 与 YFP 距离较远,无法产生共振能量转移,因此只在 477 nm 处产生发射光。所以可根据 527/477 nm 的比值计算 ATG4 的酶切效率。当加入化合物时,XGN56 和 XGN59

都能剂量依赖地抑制 ATG4B 的酶切活性。而 FRET 法测得两个化合物的 IC_{50} 值分别为 7.74 $\mu\text{mol/L}$ 和 8.00 $\mu\text{mol/L}$,表明两个化合物对 ATG4B 有明显的抑制效果(图 3)。

2.4 化合物对自噬的作用

因为 ATG4B 发挥着对自噬标志蛋白 LC3 的两种酶切作用,使得 LC3 能够参与自噬体的形成与成熟,因此 ATG4B 活性的调控对自噬具有重要的影响。LC3 融合 GFP 荧光蛋白常用于监测自噬的发生过程。当自噬激活时,GFP 标记的 LC3-II 可聚集于自噬体膜上,此时可通过观察 GFP 荧光点的聚集来判断自噬体的生成。因此我们利用 GFP-LC3 检测了 XGN56 和 XGN59 对自噬的影响。我们将两个化合物分别刺激刺激稳定过表达了 GFP-LC3 的 He

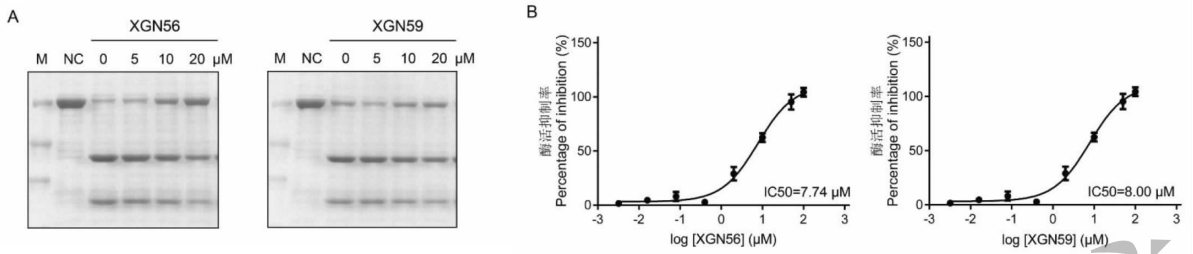


图3 SDS-PAGE与FRET法检测XGN56和XGN59对ATG4B酶活性的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effects of XGN56 and XGN59 on ATG4B activity by SDS-PAGE and FRET assays

注:A:SDS-PAGE法检测酶活性;B:FRET法检测酶活性。

Note:A:Enzyme activity was detected by SDS-PAGE;B:Enzyme activity was detected by FRET.

La细胞,同时联用Baf检测自噬潮的变化。Baf可以通过阻断自噬体与溶酶体融合从而阻断自噬,因此常用于观察自噬的动态变化。结果表明,两个化合物都能促进LC3荧光点的增加,当联用Baf后,LC3荧光点较Baf单独组有明显的聚集和增多,说明此时LC3二型标记的自噬体形成增多,自噬水平增强(图4A)。

ATG5也是一种自噬关键蛋白,其主要以ATG12-ATG5-ATG16复合物形式参与后期自噬体形成过程。接下来我们检测了两个化合物对自噬的调

控是否是依赖于ATG5途径的。我们将XGN56和XGN59分别刺激刺激过表达了GFP-LC3的WT MEF和ATG5^{-/-}MEF细胞。结果显示,化合物能够明显增加WT MEF细胞的荧光点,然而ATG5^{-/-}MEF细胞始终没有LC3阳性点的生成(图4B)。以上结果表明XGN56和XGN59对自噬的促进作用是依赖于ATG5途径的。

3 讨论

自噬作为一种保守的生物降解过程,能够避免某些长寿命蛋白或受损细胞器的累积,对细胞内的

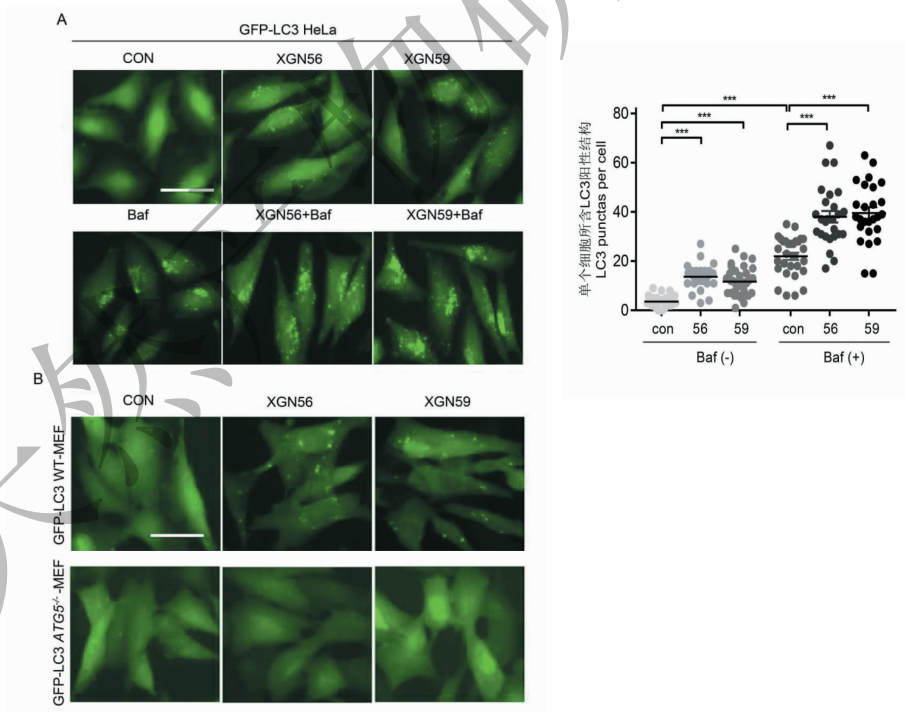


图4 XGN56和XGN59对自噬的作用分析

Fig. 4 The impact of XGN56 and XGN59 on autophagy

注:A:化合物诱导自噬,促进自噬潮;B:化合物诱导自噬的作用依赖ATG5。

Note:A:Compounds could induce autophagy using GFP-LC3 labelled assay and LC3 flux assay;

B:Compounds-induced autophagy dependent on ATG5.

物质能量代谢更新具有重要的意义。有报道指出自噬的失调可调控多种疾病的发生发展,如肿瘤、神经系统疾病和细菌感染等^[16-18]。因此,ATG4B 作为自噬调节的关键蛋白,发现及开发以 ATG4B 为靶标的调节剂,从而调控自噬过程在疾病中扮演的角色具有潜在的治疗意义。

在哺乳动物细胞中,ATG4 家族包括四个成员:ATG4A、ATG4B、ATG4C、ATG4D,其中 ATG4B 不管是在结构或者功能上都是研究最为广泛的 ATG4 蛋白,其对 ATG4 家族的特异性底物 ATG8 家族也表现出最强的酶切活性^[15]。目前 ATG4B (PDB ID: 2CY7) 及 ATG4B-LC3 (PDB ID: 2ZZP) 复合体的晶体结构都已经被报导和解析出来^[19,20],结构的明晰更直观地展现了 ATG4B 酶切底物 LC3 的过程,也为 ATG4B 调节剂的筛选提供了结构基础。

ATG4B 作为一种蛋白酶,以其酶切其特异性底物 LC3 的活性为观测指标,从而建立一种高通量 ATG4B 抑制剂筛选体系是目前较为普遍及直接的方法。而本实验室建立的虚拟对接方法,则是以 ATG4B 的结构出发,通过前期的结构对接结合后期的活性验证,提供了一种较为系统地验证筛选得的 ATG4B 抑制剂的方法。本研究验证得到的 ATG4B 抑制剂 XGN56 和 XGN59 为三白草提取的天然产物,不同于传统的已知的小分子化合物。ATG4B 晶体结构中存在 10 个可能的与化合物对接的口袋,其中 site5 口袋包含了 ATG4B 催化活性中心的两个重要的氨基酸残基 ASP278 和 HIS280,本实验室前期筛选得到的 ATG4B 抑制剂 AG-690/10400046 和 S130 均是通过与该口袋结合从而发挥抑制作用^[9,21]。而本研究中的两个化合物 XGN56 和 XGN59 则主要是与 ATG4B 的 site2 疏水口袋结合,且与 ATG4B 及 ATG4B-LC3 复合体均有较好的结合作用,能够显著抑制 ATG4B 活性,IC₅₀ 值分别为 7.74 μmol/L 和 8.00 μmol/L,优于已报道的 ATG4B 小分子抑制剂 NSC185058 (IC₅₀ = 51 μmol/L) 及 AG-690/10400046 (IC₅₀ = 36.8 μmol/L)^[8,21]。因此,这提示我们除了游离型 ATG4B 结构中的 site5 活性口袋,复合体结构的 site2 口袋也可作为 ATG4B 调节剂虚拟筛选时的对接口袋,从而筛选出结合能力更强,抑制效价更高的化合物。而且我们也证明了 XGN56 和 XGN59 可 ATG5 依赖地促进细胞自噬水平,说明两个天然产物具有潜在的生理意义,可能会通过自噬途径参与某些疾病或者肿瘤的调控过程。

因此,本研究通过虚拟对接结合体外活性测定,验证并得到了从三白草中分离的 ATG4B 的天然化合物抑制剂 XGN56 和 XGN59,并且寻找到了一个新的化合物与 ATG4B 结合的口袋,为后续寻找并开发更高效的 ATG4B 调节剂提供研究基础,也为以 ATG4B 为靶标的天然产物在临床治疗中的应用奠定了重要的意义。

参考文献

- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451:1069-1075.
- He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43:67-93.
- Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy [J]. *Cell Res*, 2014, 24:24-41.
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. *Nature*, 2000, 408:488-492.
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, et al. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5. Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:18619-18625.
- Yu ZQ, Ni T, Hong B, et al. Dual roles of Atg8-PE deconjugation by atg4 in autophagy [J]. *Autophagy*, 2012, 8: 883-892.
- Yang A, Herter-Sprue G, Zhang H, et al. Autophagy sustains pancreatic cancer growth through both cell-autonomous and nonautonomous mechanisms [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8: 276-287.
- Akin D, Wang SK, Habibzadegah-Tari P, et al. A novel ATG4B antagonist inhibits autophagy and has a negative impact on osteosarcoma tumors [J]. *Autophagy*, 2014, 10:2021-2035.
- Fu Y, Hong L, Xu J, et al. Discovery of a small molecule targeting autophagy via ATG4B inhibition and cell death of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Autophagy*, 2019, 15: 295-311.
- Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79:629-661.
- Xu GB, Zhang QY, Zhou M. Review on the secondary metabolites and its biological activities from chaetomium fungi [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30:515-525.
- Chen HJ, Wang XN, Chen JW, et al. Optimization of supercritical CO₂ extraction for sauchinone and *in vitro* antitumor activity of Saururi Herba supercritical extract [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2017, 39:1601-1604.