

引用:朱鲁杰,宋昊,王琪琳. Tanespimycin 与小分子化合物联合调控微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化诱导 A549 细胞凋亡研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2026, 39(5): 796-806.

Citation: Zhu Lujie, Song Hao, Wang Qilin. Combined effects of tanespimycin with other small molecule drugs on apoptosis induction in A549 cells by modulating  $\alpha$ -tubulin acetylation[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2026, 39(5): 796-806.

文章编号 1672-6634(2026)05-0796-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2026010007

# Tanespimycin 与小分子化合物联合调控微管蛋白 $\alpha$ -tubulin 乙酰化诱导 A549 细胞凋亡研究

朱鲁杰<sup>1</sup>, 宋昊<sup>2</sup>, 王琪琳<sup>3</sup>

(1. 聊城大学 农业与生物学院, 山东 聊城 252059; 2. 聊城市人民医院, 山东 聊城, 252000; 3. 聊城大学 药学与食品工程学院, 山东省蛋白与多肽类药物应用技术重点实验室, 山东 聊城 252059)

**摘要** 坦螺旋霉素(tanespimycin)作为分子伴侣 Hsp90(Heat shock protein)的一种抑制剂,因其单药及联合用药的作用机制尚未完全明确,因此其在肺癌治疗中的临床应用受到限制。本研究证实,tanespimycin 能够有效诱导非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡。蛋白质印迹实验显示,tanespimycin 单药处理 A549 细胞可诱导凋亡相关蛋白(含 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 和 PARP)的切割活化、线粒体膜蛋白 VDAC 及 Bax 表达上调,同时提升乙酰化微管蛋白  $\alpha$ -tubulin(Ac- $\alpha$ -tubulin)与蛋白激酶 AMPK 的表达水平,并诱导细胞周期 G1/S 阻滞。通过 Acetyl-CoA ELISA 试剂盒定量检测发现,tanespimycin 能以剂量和时间依赖的方式增加细胞内乙酰辅酶 A 含量。Tanespimycin 与 mTOR 抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-mA)及凋亡抑制剂(Z-vad)的联合实验证实,Ac- $\alpha$ -tubulin 表达水平与细胞凋亡程度呈正相关。组蛋白去乙酰化酶 HDAC6 抑制剂曲古抑菌素 A(TSA)与 tanespimycin 联合,尽管能增强 Ac- $\alpha$ -tubulin 表达水平和降低细胞活力,但却会削弱 tanespimycin 诱导的 Caspases 活化。本研究为探索 tanespimycin 与特定小分子药物联合促进肺癌细胞凋亡提供了实验依据。

**关键词** A549 细胞;  $\alpha$ -微管蛋白乙酰化; 乙酰辅酶 A; 坦螺旋霉素; 曲古抑菌素 A; 凋亡诱导

中图分类号 R965

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Combined effects of tanespimycin with other small molecule drugs on apoptosis induction in A549 cells by modulating $\alpha$ -tubulin acetylation

ZHU Lujie<sup>1</sup>, SONG Hao<sup>2</sup>, WANG Qilin<sup>3</sup>

(1. Department of Biological Science, College of Agriculture and Biology, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. Liaocheng People's Hospital, Liaocheng 252000, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Shandong Key Laboratory of Applied Technology for Protein and Peptid Drugs, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

收稿日期: 2026-01-17

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(ZR2020MC066); 山东省重点研发计划(竞争性创新平台)项目(2025CXPT139)资助

通信作者: 王琪琳, 女, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤细胞代谢、信号转导及抗肿瘤药物筛选, E-mail: wql@lcu.edu.cn.

**Abstract** The clinical application of tanespimycin, a molecular chaperone Hsp90 (Heat shock protein 90) inhibitor, to lung cancer has been limited by an incomplete understanding of its pharmacological efficacy, both as monotherapy and in combination regimens. In this study, we demonstrated that tanespimycin effectively induced apoptosis in non-small cell lung cancer A549 cells. Western blot analysis showed that tanespimycin monotherapy upregulated apoptotic proteins (including Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3 and PARP), mitochondrial outer membrane protein VDAC, and Bax, while also elevating levels of acetylated  $\alpha$ -tubulin (Ac- $\alpha$ -tubulin) and AMPK, and inducing G1/S-phase cell-cycle arrest. Furthermore, Acetyl-CoA ELISA quantification revealed that tanespimycin increases intracellular acetyl-CoA content in a dose- and time-dependent manner. Combination studies with the mTOR inhibitor Rapamycin, the autophagy inhibitor 3-mA, and the pan-Caspase inhibitor Z-vad revealed a positive correlation between Ac- $\alpha$ -tubulin expression and the extent of apoptosis. Intriguingly, although the HDAC6 inhibitor trichostatin A (TSA) enhanced Ac- $\alpha$ -tubulin expression and reduced cell viability, it attenuated tanespimycin-induced Caspases activation. Collectively, these findings provide a mechanistic rationale for exploring tanespimycin in combination with selected small molecules to promote apoptosis in lung cancer cells.

**Keywords** A549 cell;  $\alpha$ -tubulin acetylation; acetyl-CoA; tanespimycin; trichostatin A; apoptosis induction

## 0 引言

Tanespimycin 作为格尔德霉素的半合成衍生物,是热休克蛋白 90(Hsp90)的一种特异性抑制剂。相较于其母体化合物,tanespimycin 的肝毒性显著降低,并已进入临床 I 期或 II 期试验阶段<sup>[1]</sup>。尽管在临床试验中观察到其生物利用度低、溶解性差等问题,但临床前及临床研究证实其能有效诱导癌症细胞的凋亡并抑制肿瘤进展<sup>[2-6]</sup>。这些证据为持续开发新型的 Hsp90 抑制剂及其联合治疗方案提供了依据。

Hsp90 是一种 ATP 依赖性分子伴侣,在正常生理条件下稳定表达;在细胞应激及恶性细胞中进一步表达上调<sup>[7-8]</sup>。Hsp90 主要通过协助多种客户蛋白的折叠、稳定与激活,维持细胞内蛋白质稳态、信号传导以及应激反应等。Hsp90 的客户蛋白主要包括转录因子、调控激酶及一些信号分子,因此靶向 Hsp90 成为抗肿瘤药物研发的一个重要方向<sup>[9-12,6]</sup>。

作为 Hsp90 的一种有效抑制剂,tanespimycin 可破坏 Hsp90 与客户蛋白的相互作用,导致如 HER2、EGFR、Bcr-Abl、Akt 和 p53 等致癌客户蛋白的降解<sup>[13-14]</sup>。在 H466 细胞中 tanespimycin 可诱导 G1/S 期细胞周期阻滞,并伴随 Cyclin D1 和 Cyclin E 等关键周期蛋白的降解<sup>[14]</sup>。Kamal A 等人证实,tanespimycin 对肿瘤细胞中 Hsp90 的亲合力约为正常细胞的 100 倍<sup>[15]</sup>,表明该药物在体内对肿瘤细胞的有效选择。近来研究表明,tanespimycin 单独用药或者与其它药物联合,对多种癌症包括促肾上腺皮质激素垂体腺瘤、甲状腺乳头状癌和神经胶质瘤都具有较好的疗效<sup>[16-20]</sup>。研究进一步证实,tanespimycin 能诱导肿瘤细胞发生凋亡和自噬<sup>[21-23]</sup>。在三阴性乳腺癌模型中,tanespimycin 与多种抗肿瘤药物均显示出协同作用<sup>[24-28]</sup>。然而,tanespimycin 与去乙酰化酶 HDAC6 的抑制剂曲古抑菌素 A(TSA)联合应用,对非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡诱导的效应及其分子机制还不是很清楚。

HDAC6 是 Hsp90 的一种客户蛋白,两者共同构成细胞质复合物,对维持蛋白质稳态至关重要<sup>[29]</sup>。HDAC6-Hsp90 的相互作用在恶性肿瘤中的重要作用,一直备受关注,表明开发针对这两种蛋白的双靶点或协同抑制剂具有很大的潜力。前期的研究发现,在 Calu-1 肺癌细胞中,单独使用 tanespimycin 抑制 Hsp90 或者与 TSA 联用,均能降低 HDAC6 的表达并显著提高乙酰化微管蛋白  $\alpha$ -tubulin(Ac- $\alpha$ -tubulin)的表达水平,并且 Ac- $\alpha$ -tubulin 的表达水平与凋亡诱导呈正相关<sup>[23]</sup>。这表明 tanespimycin 在 Calu-1 肺癌细胞中具有双重的抑制作用。A549 作为一种重要的肺癌细胞,用 tanespimycin 处理是否会产生相似抑制效果需要进一步证明。

微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 作为微管的主要组成成分,参与维持细胞形态、细胞内运输及信号传导等多种细胞

功能。研究表明,微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化的表达上调,可影响细胞的凋亡和自噬等过程<sup>[30-33]</sup>。微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化状态受去乙酰化酶 HDAC6、乙酰转移酶 TAT1 的动态调控,并以乙酰辅酶 A 作为乙酰基的供体<sup>[23]</sup>。另外,HDAC6 作为一种细胞质去乙酰化酶,也可以进一步调节 Hsp90、 $\alpha$ -tubulin 等相关蛋白的乙酰化状态,进一步调控癌细胞的凋亡和自噬过程<sup>[34-35]</sup>。

肺癌是全球最常见且致死率最高的恶性肿瘤之一<sup>[36]</sup>。A549 细胞系是广泛使用的人类非小细胞肺癌细胞模型,被大量应用于药物筛选、信号传导研究及抗肿瘤免疫治疗研究<sup>[37-41]</sup>。本研究旨在探讨 tanespimycin 单用及联合雷帕霉素 Rapamycin、3-mA 和 TSA 等其他小分子药物对 A549 细胞的凋亡效应及其分子机制。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 试剂

Tanespimycin 购自 LC Laboratories。MG132、TSA、Rapamycin、3-mA 和 Z-vad 分别购自 Sigma(圣路易斯,密苏里州)和 Cell Signaling Technology(丹弗斯,马萨诸塞州)。所有化合物均用二甲基亚砜配制成一定浓度的溶液,然后分装后于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存。使用前立即将储备液稀释至所需终浓度。CCK-8 试剂盒和 Acetyl-CoA(乙酰辅酶 A)ELISA 试剂盒购自 Vazyme Biotech Co., Ltd。

### 1.2 抗体

使用的抗体包括: caspase-8 抗体、caspase-9 抗体、VDAC1 抗体、PARP 抗体、Ac- $\alpha$ -tubulin 抗体、AMPK 抗体、cyclin D1 抗体、cyclin E 抗体(均购自 Cell Signaling Technology); caspase-3 抗体(Imgenex);  $\beta$ -actin 抗体(Santa Cruz Biotechnology)。

### 1.3 细胞系与细胞培养

人非小细胞肺癌 A549 细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC; 马纳萨斯,弗吉尼亚州,美国)。细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养,培养条件为温度  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  和 95% 空气的湿润环境。

### 1.4 CCK-8 检测

采用 Cell Counting Kit-8 检测细胞活力。将 A549 细胞以每孔 9 000 个细胞的密度接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu\text{L}$  培养基。孵育 24 h,然后用 tanespimycin(0、0.25、0.5、1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$ )单独或者与 TSA(200 nmol/L)联合处理细胞,每孔终体积为 200  $\mu\text{L}$ 。在标准培养条件( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ )下处理 48 h,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h。随后使用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度。

### 1.5 蛋白质印迹分析

全细胞蛋白裂解液制备及蛋白质印迹分析参照文献<sup>[42-43]</sup>进行。使用 RIPA 裂解液制备全细胞裂解液,并通过 Bio-Rad Bradford 法测定蛋白质浓度。每一样品取 40  $\mu\text{g}$  总蛋白进行 10% SDS-PAGE 分离,并转印至聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)。膜在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 小时,随后于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  与一抗孵育过夜。洗涤后,室温下与辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h。使用增强化学发光试剂显示蛋白质条带,并通过 Amersham Imager 600 成像。以  $\beta$ -actin 作为上样内参,条带灰度通过 ImageJ 软件定量分析。

### 1.6 Acetyl-CoA ELISA 试剂盒检测

使用 Acetyl-CoA ELISA 试剂盒定量乙酰辅酶 A 水平。步骤如下:将 A549 细胞以每孔  $2\times 10^5$  个细胞的密度接种于 6 孔板,每孔 400  $\mu\text{L}$  培养基。过夜贴壁后,用不同浓度 tanespimycin 处理细胞。处理结束后,在  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养条件下分别孵育 12、24、48 h。收集细胞并用裂解液于冰上裂解 30 min,离心后取上清。严格按照 ELISA 试剂盒说明书检测上清液中乙酰辅酶 A 的含量。

### 1.7 siRNA 干扰

所有 siRNA 均由 GenePharma(上海,中国)化学合成。使用 HiPerFect 转染试剂,将细胞以适当密度接种于 6 孔板并培养过夜。次日进行 siRNA 转染:将 siRNA 稀释于无血清培养基中,与转染试剂混合后滴加入 6 孔板。孵育后更换新鲜完全培养基,继续培养后按指定时间用 tanespimycin 处理细胞,收集并进行蛋白质印迹分析。本研究使用的 siRNA 序列如下:对照组 siRNA:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'; Hsp90 $\alpha$ siRNA:5'-GUUUGAGAACCUCUGCAAA-3'; Hsp90 $\beta$ siRNA:5'-CGACAAGAAUGAUAAAGGCA-3'

## 1.8 统计分析

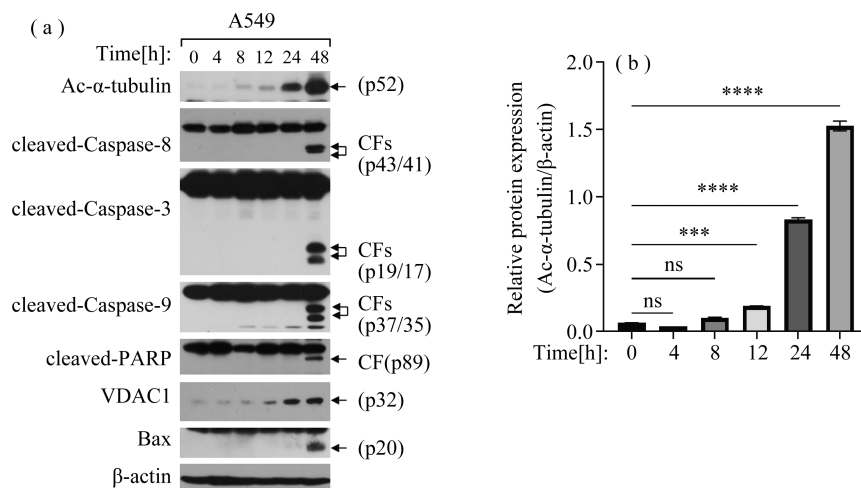
使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计分析。细胞活力实验数据及凋亡相关蛋白表达水平通过双因素或单因素方差分析处理。所有数据均以三次独立实验(细胞活力实验用四次重复实验)的平均值 $\pm$ 标准差表示,以\*  $P < 0.05$  为具有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 Tanespimycin 诱导 A549 细胞微管蛋白 $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平增加并激活 Caspase 级联反应

作为分子伴侣 Hsp90 的一种有效抑制剂,tanespimycin(另一英文名称 17-AAG)已被报道通过下调 c-FLIP<sub>L</sub> 和上调微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化(Ac- $\alpha$ -tubulin)诱导肺癌 Calu-1 细胞凋亡<sup>[23,41]</sup>。然而,其在 A549 细胞中的凋亡诱导效应尚不明确。

实验中用 1.0  $\mu\text{mol/L}$  的 tanespimycin 处理 A549 细胞,可诱导 Ac- $\alpha$ -tubulin 表达水平呈时间依赖性上调,如图 1;并且 Ac- $\alpha$ -tubulin 的表达上调早于细胞凋亡蛋白的激活。Ac- $\alpha$ -tubulin 的表达上调在第 24 h 就非常明显,而凋亡蛋白 Caspases(Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3 和 PARP)的切割激活,在第 48 h 才开始出现,见图 1(a)。同时,线粒体外膜促凋亡蛋白 VDAC1 和 Bax 的表达也升高,表明内源性凋亡通路也参与 tanespimycin 诱导的细胞凋亡。上述研究结果显示,tanespimycin 可通过外源性与内源性通路诱导 A549 细胞凋亡,并且与微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平增加正相关。



注:(a)用 1.0  $\mu\text{mol/L}$  的 tanespimycin 分别处理 A549 细胞一定时间(0,4,8,12,24,48 h),然后通过蛋白质印迹分析图示蛋白质的表达。(b)对 Ac- $\alpha$ -tubulin 表达水平进行定量分析,重复 3 次独立实验。数据以均值 $\pm$ 标准差(SD)表示;采用单因素方差分析进行统计学检验(ns:无显著性差异;\*\*\*  $P < 0.001$ ,\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ,与对照组比较)。

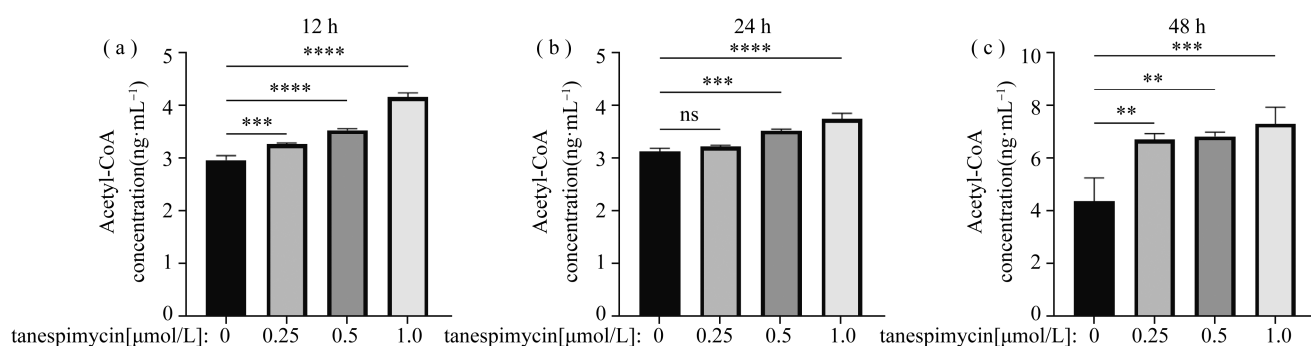
图 1 Tanespimycin 通过外源性与内源性通路诱导 A549 细胞凋亡和微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平增加

Fig. 1 Tanespimycin triggers apoptosis via extrinsic and intrinsic pathways and upregulates  $\alpha$ -tubulin acetylation in A549 cells

### 2.2 tanespimycin 诱导 A549 细胞内乙酰辅酶 A 水平升高

前期的研究表明,在 Calu-1 细胞中乙酰化微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 的表达水平与细胞凋亡程度呈正相关<sup>[23]</sup>。乙酰辅酶 A 是  $\alpha$ -tubulin 乙酰化的直接供体,为了进一步探究肺癌 A549 细胞内 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化表达水平上调是否与细胞内乙酰辅酶 A 水平的变化相关,在实验中用不同浓度的 tanespimycin(0,0.25,0.5,1.0  $\mu\text{mol/L}$ )分别处理 A549 细胞,然后通过 Acetyl-CoA ELISA 试剂盒定量细胞内乙酰辅酶 A 水平。

图 2 的实验结果显示,用 tanespimycin 处理 A549 细胞 12 h,细胞内乙酰辅酶 A 水平呈浓度依赖性升高;处理 24 h,0.5  $\mu\text{mol/L}$  和 1.0  $\mu\text{mol/L}$  处理组乙酰辅酶 A 水平显著增加;处理 48 h 所有处理组均呈现更显著的上升趋势。这些数据表明,tanespimycin 以剂量和时间依赖的方式提高 A549 细胞内乙酰辅酶 A 水平,该变化与观察到的 Ac- $\alpha$ -tubulin 水平上调正相关,进一步证实了 tanespimycin 诱导的代谢改变(如乙酰辅酶 A 水平变化)与微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化之间的联系。



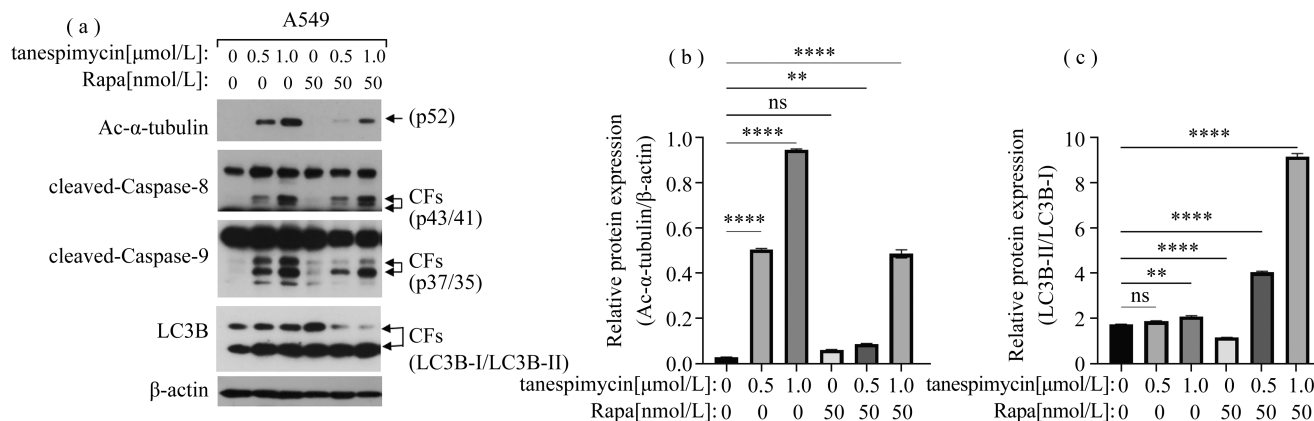
注:用一定浓度(0, 0.25, 0.5 和 1.0  $\mu\text{mol/L}$ )的 tanespimycin 分别处理 A549 细胞一定时间(12、24、48 h),采用 Acetyl-CoA ELISA 试剂盒测定(a)12 h、(b)24 h 和(c)48 h 的细胞内乙酰辅酶 A 含量。数据为三次重复测定的均值 $\pm$ 标准差;采用单因素方差分析进行比较(ns:无显著性差异;\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ,与对照组比较)。

图 2 Tanespimycin 诱导 A549 细胞内乙酰辅酶 A 水平升高

Fig. 2 Tanespimycin increases intracellular acetyl-CoA levels in A549 cells

### 2.3 tanespimycin 诱导的微管蛋白 $\alpha$ -tubulin 乙酰化与 A549 细胞凋亡相关

为了进一步探究微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化与细胞凋亡的关系,用 tanespimycin 单独处理或与 mTOR 抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)联合处理 A549 细胞。蛋白质印迹分析显示,雷帕霉素 Rapamycin 降低了 tanespimycin 诱导的 Ac- $\alpha$ -tubulin 水平和 Caspases 激活,同时提高 LC3B-II/LC3B-I 比值,表明自噬增强,如图 3。这些结果表明在 A549 细胞内,雷帕霉素 Rapamycin 减弱 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平和细胞凋亡,同时刺激自噬流;进一步证明 Ac- $\alpha$ -tubulin 水平与细胞凋亡程度正相关,与在 Calu-1 细胞中的实验结果相一致<sup>[23]</sup>。



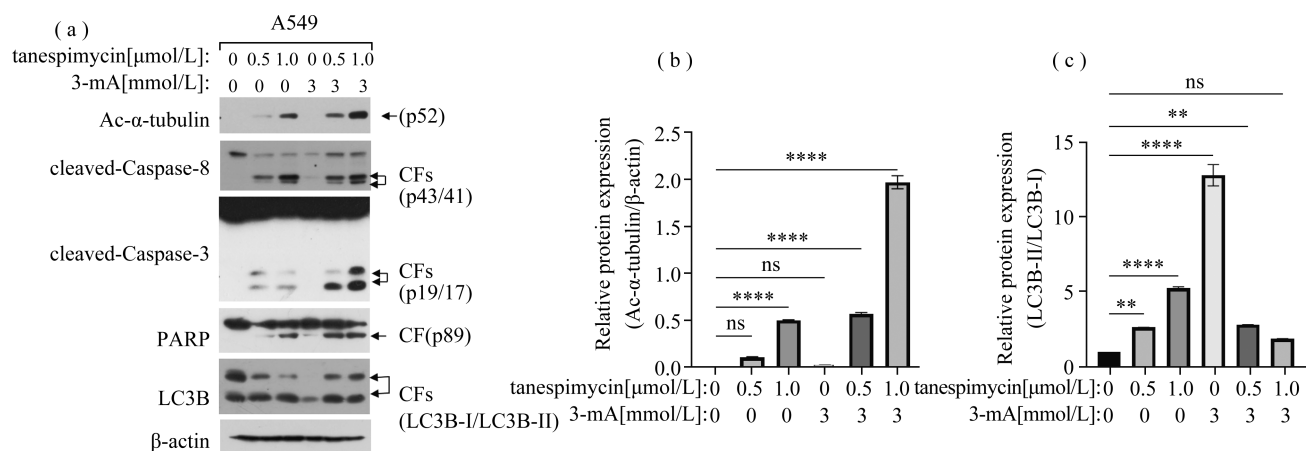
注:(a)单独用 tanespimycin 或者与 Rapamycin(50 nmol/L)联合处理 A549 细胞 48 h,对图示蛋白质进行蛋白质印迹分析。(b、c)对 Ac- $\alpha$ -tubulin 水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值进行定量分析(均值 $\pm$ 标准差),三次重复实验。采用单因素方差分析进行统计学检验(ns:无显著性差异;\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\*\* $P < 0.0001$ ,与对照组比较)。

图 3 Rapamycin 减弱 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化与凋亡

Fig. 3 Rapamycin attenuates tanespimycin-induced  $\alpha$ -tubulin acetylation and apoptosis

进一步用 tanespimycin 与自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-mA)联合处理 A549 细胞发现,3-mA 可增强 Ac- $\alpha$ -tubulin 表达并增强细胞凋亡,同时适度降低 LC3B-II/LC3B-I 的比值,如图 4。该实验结果表明,抑制自噬能增强 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化和细胞凋亡。

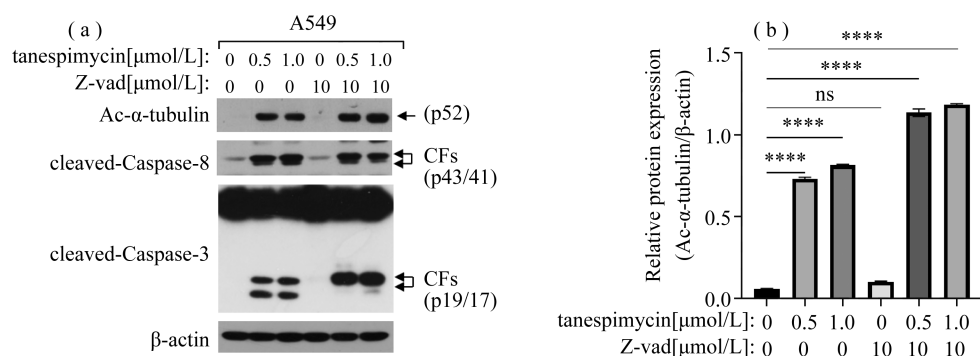
为了进一步明确微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化是否为 tanespimycin 诱导凋亡的上游事件,用泛 Caspase 抑制剂 Z-vad(1.0  $\mu\text{mol/L}$ )与 tanespimycin(0, 0.5 和 1.0  $\mu\text{mol/L}$ )联合处理 A549 细胞。尽管 Z-vad 部分抑制了 tanespimycin 诱导的 Caspase-3 激活,Ac- $\alpha$ -tubulin 水平仍保持一定程度的升高,如图 5,表明微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化发生于 Caspase 依赖性凋亡执行之前。



注(a)单独使用 tanespimycin(0, 0.5 和 1.0  $\mu\text{mol/L}$ )或者与 3-mA(3  $\text{mmol/L}$ )联合处理 A549 细胞 48 h,通过蛋白质印迹分析图示蛋白质。(b、c)对 Ac- $\alpha$ -tubulin 水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值的定量分析(均值 $\pm$ 标准差),三次重复实验。采用单因素方差分析进行统计学比较(ns:无显著性差异;\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.0001$ ,与对照组比较)。

图4 3-mA 增强 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化与细胞凋亡

Fig. 4 3-mA enhances tanespimycin-induced  $\alpha$ -tubulin acetylation and apoptosis



注:(a)单独使用 tanespimycin (0, 0.5 和 1.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 或者与 Z-vad (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 联合处理 A549 细胞 48 h,通过蛋白质印迹分析图示蛋白质水平。(b)对 Ac- $\alpha$ -tubulin 表达水平进行定量分析(均值 $\pm$ 标准差),3 次重复实验。采用单因素方差分析确定统计学显著性(ns:无显著性差异;\*\*\* $P<0.0001$ ,与对照组比较)。

图5 Z-vad 抑制 tanespimycin 诱导的细胞凋亡

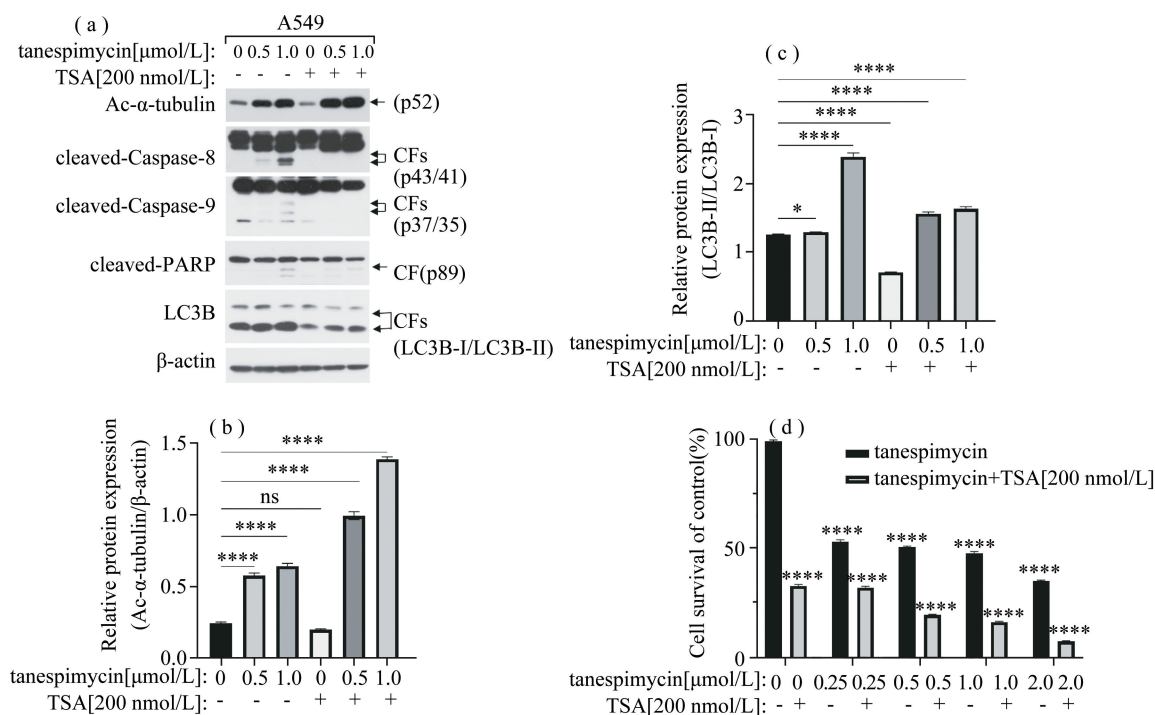
Fig. 5 Z-vad inhibits apoptosis induced by tanespimycin

综上所述,在 A549 细胞中 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平与细胞凋亡密切相关,可能受自噬调节,并且发生于细胞凋亡蛋白 Caspases 激活的上游。

## 2.4 TSA 增强 tanespimycin 诱导的微管蛋白 $\alpha$ -tubulin 乙酰化

微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 和 Hsp90 是去乙酰化酶 HDAC6 的底物,而 HDAC6 本身也是 Hsp90 的客户蛋白<sup>[44]</sup>。因此,抑制 Hsp90 可间接影响 HDAC6 活性,进而改变微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化状态。为了进一步探究 HDAC6 在 tanespimycin 诱导的细胞凋亡中的作用,用 tanespimycin 与 HDAC6 抑制剂 TSA 联合处理 A549 细胞。实验结果表明,TSA 增强了 tanespimycin 诱导的 Ac- $\alpha$ -tubulin 水平,却降低了 Caspase-8、Caspase-9 和 PARP 的切割活化;LC3B-II/LC3B-I 的比值也下降,如图 6(a~c),表明自噬受到抑制。尽管 TSA 减弱了 tanespimycin 诱导的 Caspases 活化,与 tanespimycin 联用却显著降低了细胞活力,见图 6(d)。上述实验数据表明,在 A549 细胞中,TSA 促进微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 的乙酰化与经典的 Caspase 依赖性细胞凋亡解耦联,同时降低了自噬流。

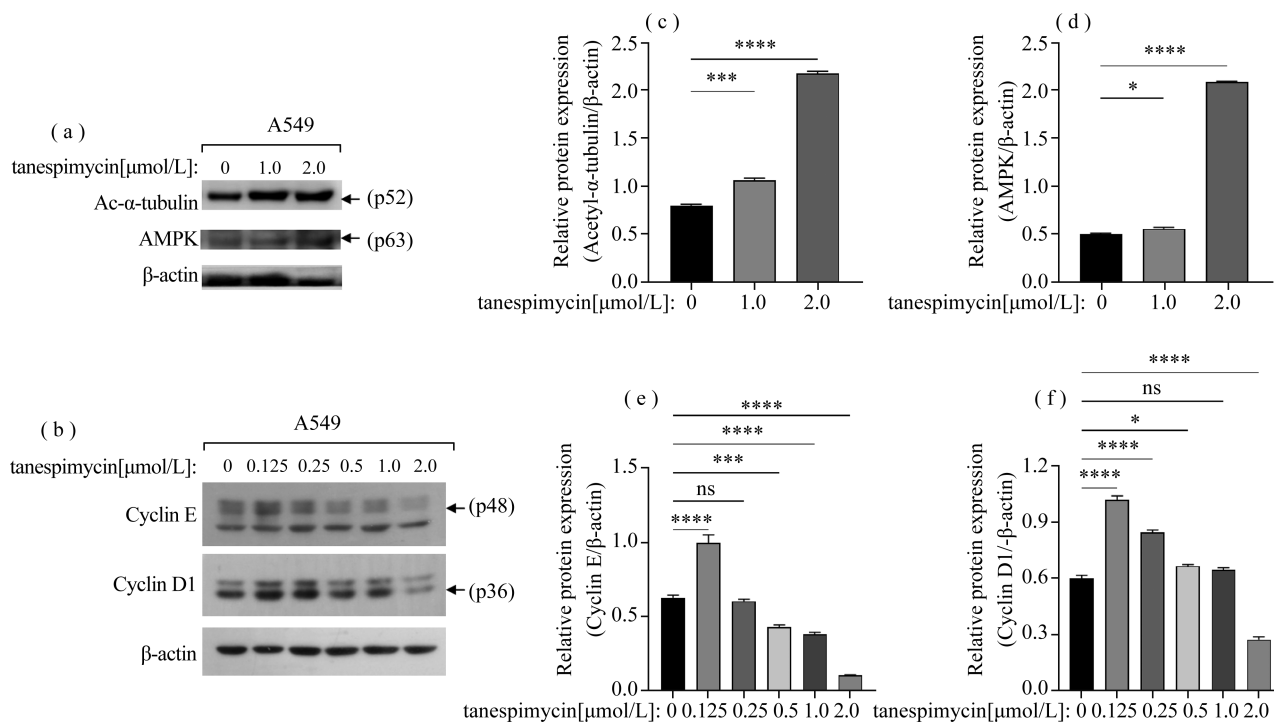
为了进一步检测 tanespimycin 处理 A549 细胞活力降低的原因,用一定浓度的 tanespimycin 处理 A549 细胞。蛋白质印迹实验发现,随着微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平增加,腺苷酸蛋白激酶 AMPK 表达增加,如图 7(a, c, d);细胞周期蛋白 Cyclin E 和 Cyclin D1 表达也降低,G1/S 细胞周期阻滞,如图 7(b, e, f)。为



注:(a)用 tanespimycin(0, 0.5 和 1.0  $\mu\text{mol/L}$ )或联合 TSA(200 nmol/L)处理 A549 细胞 48 h,通过蛋白质印迹分析图示蛋白质水平。(b、c)对 Ac- $\alpha$ -tubulin 的表达水平及 LC3B-II/LC3B-I 比值进行定量分析(均值 $\pm$ 标准差),3 次重复实验。(d)使用 CCK-8 法检测 tanespimycin 单独或联合 TSA 处理 A549 细胞 48 h 的存活率。数据以均值 $\pm$ 标准差表示;采用单因素或双因素方差分析进行统计学检验 (ns:无显著性差异;\*  $P < 0.05$ ,\*\*\*  $P < 0.0001$ ,与对照组比较)。

图 6 TSA 增强微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化但减弱 tanespimycin 诱导的凋亡。

Fig. 6 TSA enhances  $\alpha$ -tubulin acetylation but attenuates tanespimycin-induced apoptosis

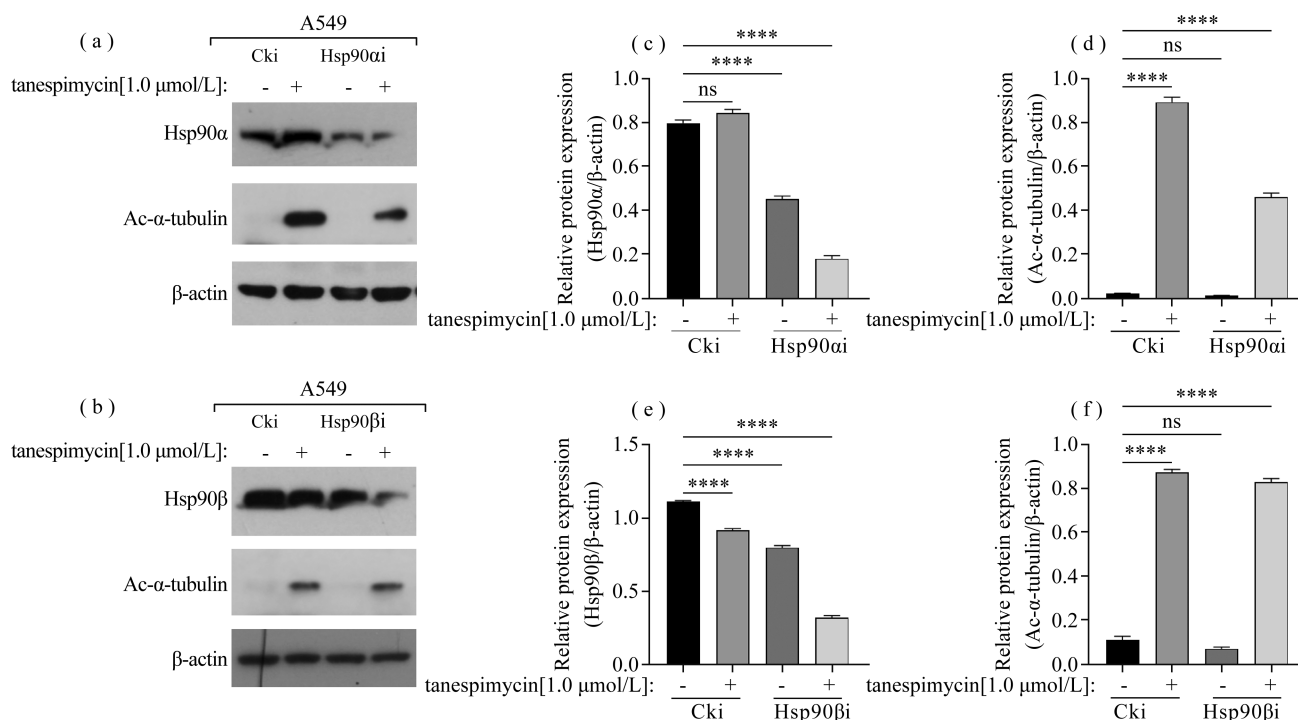


注:(a)用 tanespimycin(0, 1.0 和 2.0  $\mu\text{mol/L}$ )处理 A549 细胞 48 h,通过蛋白质印迹分析 Ac- $\alpha$ -tubulin、AMPK 蛋白质表达。(b)用 tanespimycin(0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0  $\mu\text{mol/L}$ )处理 A549 细胞 48 h,通过蛋白质印迹分析 Cyclin E、Cyclin D1 的表达水平。(c-f)分别对 Ac- $\alpha$ -tubulin、AMPK、Cyclin E、Cyclin D1 的表达水平进行定量分析(均值 $\pm$ 标准差),3 次重复实验。数据以均值 $\pm$ 标准差表示;采用单因素或双因素方差分析进行统计学检验(ns:无显著性差异;\*  $P < 0.05$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ ,\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ,与对照组比较)。

图 7 Tanespimycin 增加 AMPK 表达并诱导 A549 细胞 G1/S 细胞周期阻滞

Fig. 7 Tanespimycin increases AMPK expression and induces G1/S-phase cell cycle arrest in A549 cells

了进一步检测 Hsp90 对 Ac- $\alpha$ -tubulin 表达水平的调控,通过 siRNA 干扰抑制 Hsp90 $\alpha$ 、Hsp90 $\beta$  表达。实验发现干扰 Hsp90 $\alpha$ (而非 Hsp90 $\beta$ )显著降低 Ac- $\alpha$ -tubulin 水平,如图 8(a-f),表明 Hsp90 $\alpha$  特异性调控 A549 细胞中微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平,如图 8(a、c、d)。



注:(a) 在 A549 内用 siRNA 干扰 Hsp90 $\alpha$ ;(b) 在 A549 内用 siRNA 干扰 Hsp90 $\beta$ 。siRNA 干扰 24 h,用 1.0  $\mu$ mol/L 的 tanespimycin 处理 A549 细胞 48 h,通过蛋白质印迹分析 Hsp90 $\alpha$ 、Hsp90 $\beta$  及 Ac- $\alpha$ -tubulin 表达水平。(c~f) 分别对 Hsp90 $\alpha$ 、Ac- $\alpha$ -tubulin 和 Hsp90 $\beta$ 、Ac- $\alpha$ -tubulin 的表达水平进行定量分析(均值 $\pm$ 标准差),3 次重复实验。数据以均值 $\pm$ 标准差表示;采用单因素或双因素方差分析进行统计学检验(ns;无显著性差异;\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.0001$ ,与对照组比较)。

图 8 siRNA 介导的 Hsp90 敲低降低微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化

Fig. 8 siRNA-mediated knockdown of Hsp90 reduces  $\alpha$ -tubulin acetylation

综上所述,在 A549 细胞内,tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平与凋亡程度及细胞周期阻滞密切相关;但 TSA 介导的去乙酰化酶 HDAC6 抑制,尽管诱导微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平增强,却与凋亡蛋白 Caspases 的激活解离。TSA 处理使微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 高度乙酰化,与凋亡蛋白 Caspases 的切割激活过程解离,表明该过程可能启动了替代性细胞凋亡途径。Hsp90 $\alpha$  的特异性参与进一步强调了该背景下微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化所呈现的亚型选择性调控特征。

### 3 讨论

分子伴侣 Hsp90 是一种高度保守且含量比较丰富的蛋白质,在生理条件下约占细胞总蛋白的 1~2%。Hsp90 可维持 400 多种客户蛋白的稳定与功能,其中多种客户蛋白在癌症细胞内过表达或突变,驱动肿瘤的发生与进展<sup>[45]</sup>。因此,Hsp90 是一个非常有前景的药物作用靶点。

该实验证实了在非小细胞肺癌 A549 细胞中,tanespimycin 上调微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平。这种微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化表达上调与凋亡诱导正相关,tanespimycin 与自噬激活剂 Rapamycin、自噬抑制剂 3-mA 的联合实验进一步证明了该实验现象,同时拓展了在肺癌 Calu-1 细胞中的实验发现<sup>[46]</sup>。与凋亡蛋白 Caspase 抑制剂 Z-vad 的联合实验及时间梯度实验表明,微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化表达增加,早于凋亡蛋白 Caspases(含 Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3 和 PARP)的切割激活,证实了  $\alpha$ -tubulin 乙酰化作为细胞凋亡上游驱动因素而非凋亡后果。

乙酰辅酶 A 是微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化的直接供体。实验通过 Acetyl-CoA ELISA 试剂盒检测了细

胞内乙酰辅酶 A 的水平,发现 tanespimycin 以剂量和时间依赖性方式提升细胞内乙酰辅酶 A 水平,并与微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平升高正相关。AMPK 作为细胞内与能量代谢有关的一种重要激酶,其表达也相应增加,表明 AMPK、乙酰辅酶 A 可利用度与微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化之间可能存在调控关系,这一关系需要进一步研究探讨。

有趣的是,tanespimycin 与 HDAC6 抑制剂 TSA 联合,在 A549 细胞中产生了与 Calu-1 细胞内不同的结果。TSA 增强 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平增加,却减弱了 tanespimycin 诱导的凋亡蛋白 Caspases 激活和细胞自噬。这种微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化大量增加与凋亡的解耦联,可能归因于 TSA 的多靶点特性(同时抑制 I 类 HDAC 和 HDAC6)以及细胞类型的特异性因素<sup>[47]</sup>。在 A549 细胞中,高水平内源性 tau 蛋白已被证明可结合并抑制 HDAC6,可能限制了外源 TSA 对 HDAC6 活性的影响<sup>[48]</sup>。在此条件下,仅升高微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平可能不足以触发细胞凋亡<sup>[49-50]</sup>,强调微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化仅是影响细胞凋亡的多个因素之一。

Hsp90 和微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 均是 HDAC6 的底物,且 HDAC6 本身是 Hsp90 的客户蛋白。尽管同时抑制 Hsp90 和 HDAC6 进一步增加了微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化水平,但凋亡蛋白 Caspases 的切割激活并未增强,提示 Hsp90 或其他 TSA 敏感靶点的过度乙酰化,可能在 A549 细胞中以不同方式调节细胞凋亡效应。在两种不同的肺癌细胞中导致这种差异的具体机制,有待于进一步深入研究。

## 4 结论

通过外源性与内源性双重通路,tanespimycin 诱导 A549 细胞凋亡。该凋亡反应与微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化、G1/S 期细胞周期阻滞及细胞内乙酰辅酶 A 水平升高正相关,并可能受 AMPK 和 Hsp90 $\alpha$  调节。TSA 增强 tanespimycin 诱导的微管蛋白  $\alpha$ -tubulin 乙酰化,减弱 Caspases 依赖性的细胞凋亡(图 9),凸显了乙酰化与细胞命运之间的情境依赖性关系。这些发现为 tanespimycin 与其它小分子化合物联合在肺癌治疗中的潜力提供了实验依据,同时强调了细胞特异性在治疗决策中的重要性。

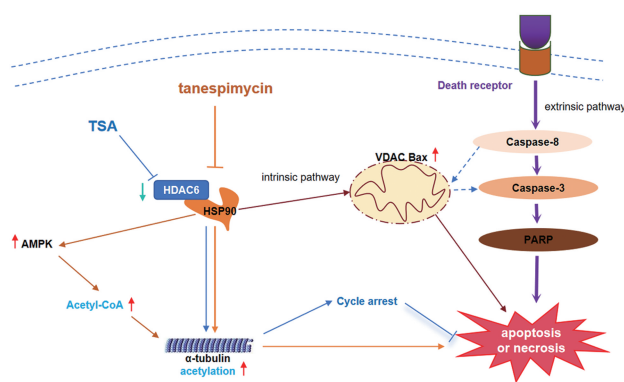


图 9 tanespimycin 诱导 A549 细胞凋亡及与 TSA 作用的模式图

Fig. 9 Schematic model of tanespimycin-induced apoptosis in A549 cells and its modulation by TSA

## 参 考 文 献

- [1] Gorska M, Popowska U, Sielicka-DUDZIN A, et al. Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2012, 17(6): 2269-2277.
- [2] 齐鲁,丁彦青. 应用生物信息学筛选大肠癌转移相关小分子化合物[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2013, 34(6): 797-802.
- [3] Solit DB, Osman I, Polsky D, et al. Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma [J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(24): 8302-8307.
- [4] Pacey S, Gore M, Chao D, et al. A Phase II trial of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin (17-AAG, tanespimycin) in patients with metastatic melanoma[J]. *Investigational New Drugs*, 2012, 30(1): 341-349.
- [5] Li Z N, Luo Y. HSP90 inhibitors and cancer: prospects for use in targeted therapies (Review)[J]. *Oncology Reports*, 2023, 49(1): 6.
- [6] Albakova Z. HSP90 multi-functionality in cancer[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1436973.
- [7] Schopf F H, Biebl M M, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, 18(6): 345-360.
- [8] Mayer M P, Le Breton L. Hsp90: breaking the symmetry[J]. *Molecular Cell*, 2015, 58(1): 8-20.
- [9] 王光辉,张威,刘永年,等. HSP90 功能性抗体对胃癌干细胞干性特征作用的研究[J]. *海南医科大学学报*, 2025, 31(1): 16-24.
- [10] Jaime-GARZA M, Nowotny C A, Coutanin D, et al. Hsp90 provides a platform for kinase dephosphorylation by PP5[J]. *Nature Com-*

- munications, 2023, 14(1): 2197.
- [11] Nguyen V, Ahler E, Sitko K A, et al. Molecular determinants of Hsp90 dependence of Src kinase revealed by deep mutational scanning [J]. Protein Science, 2023, 32(7): e4656.
- [12] Saber S, Ei-FATTAH E E A, Abdelhamid A M, et al. Innovative challenge for the inhibition of hepatocellular carcinoma progression by combined targeting of HSP90 and STAT3/HIF-1 $\alpha$  signaling[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2023, 158: 114196.
- [13] Münster P N, Marchion D C, Basso A D, et al. Degradation of HER2 by ansamycins induces growth arrest and apoptosis in cells with HER2 overexpression via a HER3, phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT-dependent pathway[J]. Cancer Research, 2002, 62(11): 3132-3137.
- [14] Zhao X R, Wang J P, Xiao L J, et al. Effects of 17-AAG on the cell cycle and apoptosis of H446 cells and the associated mechanisms[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(2): 1067-1074.
- [15] Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors[J]. Nature, 2003, 425(6956): 407-410.
- [16] Abusdal M, Normann K R, Nyman T A, et al. PCSK1N as a tumor size marker and an ER stress response protein in corticotroph pituitary adenomas[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2025, 110(4): 1065-1075.
- [17] Tto M, Wu S P, Liu Y M, et al. Consensus nonnegative matrix factorization reveals metastatic gene expression program and identifies E74-like ETS transcription factor 3 confers to the lymph nodes metastasis in papillary thyroid cancer[J]. Endocrine, 2025, 88(3): 798-819.
- [18] Xing W Q, Li T, Yang G Z, et al. Thermo-responsive gold nanorod vesicles for combined NIR-II photothermal therapy and chemotherapy of solid tumors[J]. Acta Biomaterialia, 2025, 192: 353-365.
- [19] Zhang C L, Chen X, Liu R Z, et al. HSP90 inhibition attenuated isoflurane-induced neurotoxicity in mice and human neuroglioma cells [J]. Neurochemical Research, 2024, 49(3): 706-717.
- [20] Li G, Zhang C, Liang W, et al. Berberine regulates the Notch1/PTEN/PI3K/AKT/mTOR pathway and acts synergistically with 17-AAG and SAHA in SW480 colon cancer cells[J]. Pharmaceutical Biology, 2021, 59(1): 21-30.
- [21] 易凤炎, 周长林, 顾觉奋. 抗癌抗生素格尔德霉素衍生物 17AAG 的研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(8): 598-602.
- [22] Chen F, Xie H Y, Bao H W, et al. Combination of HSP90 and autophagy inhibitors promotes hepatocellular carcinoma apoptosis following incomplete thermal ablation[J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 22(1): 337-343.
- [23] Wang Q L, Liu X G. The dual functions of  $\alpha$ -tubulin acetylation in cellular apoptosis and autophagy induced by tanespimycin in lung cancer cells[J]. Cancer Cell International, 2020, 20(1): 369.
- [24] Jia W T, Yu C R, Rahmani M, et al. Synergistic antileukemic interactions between 17-AAG and UCN-01 involve interruption of RAF/MEK- and AKT-related pathways[J]. Blood, 2003, 102(5): 1824-1832.
- [25] Yao Q, Weigel B, Kersey J. Synergism between etoposide and 17-AAG in leukemia cells: critical roles for Hsp90, FLT3, topoisomerase II, Chk1, and Rad51[J]. Clinical Cancer Research, 2007, 13(5): 1591-1600.
- [26] Lombardi R, Sonogo M, Pucci B, et al. HSP90 identified by a proteomic approach as druggable target to reverse platinum resistance in ovarian cancer[J]. Molecular Oncology, 2021, 15(4): 1005-1023.
- [27] Lee-THEILEN M, Hadhoud J R, Volante G, et al. Co-expression of CD34, CD90, OV-6 and cell-surface vimentin defines cancer stem cells of hepatoblastoma, which are affected by Hsp90 Inhibitor 17-AAG[J]. Cells, 2021, 10(10): 2598.
- [28] Bhattacharya U, Kamran M, Manai M, et al. Cell-of-origin targeted drug repurposing for triple-negative and inflammatory breast carcinoma with HDAC and HSP90 inhibitors combined with niclosamide[J]. Cancers, 2023, 15(2): 332.
- [29] Chae H Y, Park S Y, Jha S, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of bifunctional inhibitors against Hsp90-HDAC6 interplay [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 240: 114582.
- [30] Peng C Y, Gong X Y, Hu Z P, et al. Selective HDAC6 inhibitor TubA offers neuroprotection after intracerebral hemorrhage via inhibiting neuronal apoptosis[J]. PeerJ, 2023, 11: e15293.
- [31] Si L L, Lai T J, Zhao J R, et al. Identification of a novel pyridine derivative with inhibitory activity against ovarian cancer progression in vivo and in vitro[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 1064485.
- [32] Huang Y H, Huang Y M, Huang W J, et al. The hydroxamate based HDAC inhibitor WMJ-J-09 induces colorectal cancer cell death by targeting tubulin and downregulating survivin[J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 19590.
- [33] Zheng Z L, Zhou Y J, Ye L X, et al. Histone deacetylase 6 inhibition restores autophagic flux to promote functional recovery after spinal cord injury[J]. Experimental Neurology, 2020, 324: 113138.
- [34] Bonanni D, Citarella A, Moi D, et al. Dual targeting strategies on histone deacetylase 6 (HDAC6) and heat shock protein 90 (Hsp90) [J]. Current Medicinal Chemistry, 2022, 29(9): 1474-1502.

- [35] Biersack B, Nitzsche B, Höpfner M. Immunomodulatory properties of HDAC6 inhibitors in cancer diseases; New chances for sophisticated drug design and treatment optimization[J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2024, 154(Pt C): 286-294.
- [36] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2024, 74(3): 229-263.
- [37] 产柳佳, 王阳, 谢楚菲, 等. 基于生信分析探讨金雀异黄素对非小细胞肺癌的影响[J]. *世界中医药*, 2025, 20(15): 2619-2625.
- [38] Wang X T, Li X, Zhang X, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel curcumin-fluorouracil hybrids as potential anti-cancer agents[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2024, 230(Pt 1): 116559.
- [39] 陈思柔, 陈文雅, 陈静芹, 等. 枸杞多糖通过 MAP3K3 通路降低 PD-L1 表达抗肺腺癌作用及机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2025, 36(9): 1458-1470.
- [40] Zhou Y, Luo Q, Zeng F G, et al. Trichostatin A promotes cytotoxicity of cisplatin, as evidenced by enhanced apoptosis/cell death markers[J]. *Molecules*, 2024, 29(11): 2623.
- [41] Wang Q L, Sun W D, hao X X, et al. Down-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein (Long Form) contributes to apoptosis induced by Hsp90 inhibition in human lung cancer cells[J]. *Cancer Cell International*, 2012, 12(1): 54.
- [42] Ren T Y, Wang J, Ma Y X, et al. Preparation of pH-responsive tanshinone IIA-loaded calcium alginate nanoparticles and their anticancer mechanisms[J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(1): 66.
- [43] Liu M J, Li N, Wang Z X, et al. Synthesis of a celastrol derivative as a cancer stem cell inhibitor through regulation of the STAT3 pathway for treatment of ovarian cancer[J]. *RSC Medicinal Chemistry*, 2024, 15(10): 3433-3443.
- [44] Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al. Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(29): 26729-26734.
- [45] Sanchez J, Carter T R, Cohen M S, et al. Old and new approaches to target the Hsp90 chaperone[J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2020, 20(4): 253-270.
- [46] Wang Q L, Liu X G. VDAC upregulation and  $\alpha$ TAT1-mediated  $\alpha$ -tubulin acetylation contribute to tanespimycin-induced apoptosis in Calu-1 cells[J]. *Oncology Reports*, 2020, 44(6): 2725-2734.
- [47] Yoshida M, Kijima M, Akita M, et al. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265(28): 17174-17179.
- [48] Ding H P, Dolan P J, Johnsog G V W. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2008, 106(5): 2119-2130.
- [49] Perez M, Santa-MARIA I, De Barreda E G, et al. Tau-an inhibitor of deacetylase HDAC6 function[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2009, 109(6): 1756-1766.
- [50] Zhang L, Liu C, Wu J, et al. Tubastatin A/ACY-1215 improves cognition in Alzheimer's disease transgenic mice[J]. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2014, 41(4): 1193-1205.

(责任编辑:刘庆松)