

研究论文

HDAC6通过调控HSP90影响A β 诱导的大鼠海马神经元细胞功能和形态的研究

刘镇¹ 郝凯敏¹ 祁文秀^{2*}(¹山西医科大学汾阳学院, 汾阳 032200; ²山西医科大学汾阳学院生理学教研室, 汾阳 032200)

摘要 该文旨在探讨组蛋白去乙酰化酶6(histone deacetylase 6, HDAC6)通过调控热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)影响体外培养A β 诱导的大鼠海马神经元细胞功能及形态的变化。取孕18天SD大鼠胎鼠, 体外培养海马神经元细胞, 7天后用 β -tubulin III抗体鉴定海马神经元纯度。用寡聚体A β 1-42干预24 h, 随后分别加入HDAC6抑制剂TSA、HDAC6激动剂Theo、HSP90抑制剂Gane或生理盐水; 细胞不加A β 1-42干预作为对照。用CCK8法检测细胞的活力, 免疫荧光法观察神经元细胞突起的长度及形态变化, Western blot检测HDAC6和HSP90蛋白表达, qRT-PCR检测hsp90基因的mRNA表达水平。结果表明, 应用HDAC6抑制剂可下调HDAC6水平, 同时促进了hsp90 mRNA和HSP90蛋白的表达, 也提高了海马神经元活性、突起长度和分支数目, HDAC6激动剂则引起相反的效应; 而应用HSP90抑制剂后则降低了神经元活性和突起长度以及分支数目, 但HDAC6没有变化。因此, 推测HDAC6可能通过调控HSP90水平影响A β 诱导的大鼠海马神经元细胞功能和形态的变化。

关键词 阿尔茨海默病; 组蛋白去乙酰化酶6; HSP90; 海马神经元细胞

HDAC6 Modulates Amyloid β -Induced Hippocampal Neurons Function and Morphology by Regulating HSP90

LIU Zhen¹, HAO Kaimin¹, QI Wenxiu^{2*}(¹Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China;²Department of Physiology, Fenyang College of Shanxi Medical University, Fenyang 032200, China)

Abstract The aim of this study was to investigate the effect of HDAC6 (histone deacetylase 6) on the functional and morphology of the A β (amyloid beta)-induced primary hippocampal neurons by regulating HSP90. *In vitro* primary culture was conducted on the hippocampal neurons of 18 days pregnant SD rats, the purity of hippocampal neurons was identified with β -tubulin III antibody after 7 days. After oligomeric-A β 1-42 (oligomeric-amyloid beta peptides 1-42) cultured 24 hours, a variety of drugs including HDAC6 inhibitor TSA (tubastatin A

收稿日期: 2019-12-10 接受日期: 2020-03-02

山西省自然科学基金(批准号: 201801D121348)和山西医科大学汾阳学院科研项目(批准号: 2018C06)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0358-2892014, E-mail: fycqwx@163.com

Received: December 10, 2019 Accepted: March 2, 2020

This work was supported by Shanxi Provincial Natural Science Foundation Project (Grant No.201801D121348) and the Scientific Research of Fenyang College of Shanxi Medical University (Grant No.2018C06)

*Corresponding author. Tel: +86-358-2892014, E-mail: fycqwx@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5214>

hydrochbride), HDAC6 agonist Theo (theophylline), HSP90 inhibitor Gane (ganetespil), or saline ($A\beta$ +NS group) were added and then cultured 24 h, Saline group as a control (NS group). Then cell viability was detected by CCK-8 assay, the length and branches of neurons were used with immunofluorescence staining, the levels of HDAC6 and HSP90 protein were detected by Western blot, and the mRNA expressions of *hsp90* were performed to use qRT-PCR (quantitative Real-time polymerase chain reaction). The results showed that HDAC6 inhibitor could not only down-regulate the level of HDAC6 and promote the expressions of *hsp90* mRNA and HSP90 protein, but also could increase the activity of hippocampal neurons, the length of protuberances and the number of branches. However, there appeared to be an opposite effect in the agonist of HDAC6. Moreover, the cell viability, synaptic length and number of branches after the application of HSP90 inhibitor were decreased, but no significant changes in the level of HDAC6. Thus, we speculate that HDAC6 may influence the functional and morphology of the $A\beta$ -induced primary hippocampal neurons by regulating HSP90 levels.

Keywords Alzheimer's disease; histone deacetylase 6; HSP90; hippocampal neurons

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)也被称为老年性痴呆, 由于人类寿命的延长, 其发病率逐年提高。目前, 在临床上针对其病理学变化的治疗收效甚微, 而且病人一旦出现认知障碍就会发生不可逆转的神经元损伤以及进行性的认知功能下降^[1]。因此, 对AD的早期诊断和治疗至关重要。

近年来, 对表观遗传学在AD中的作用有了一定的了解。研究表明, 翻译后的组蛋白乙酰化修饰会影响基因的转录。在AD动物模型中, 组蛋白乙酰化水平发生了改变^[2]。组蛋白乙酰化水平由组蛋白乙酰化酶(histone acetyltransferases, HATS)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDACs)调节。HDACs是由18种亚型组成的家族, 根据它们的系统发育特征分为四类, 其中II类6亚型(HDAC6)主要表达于神经元细胞质中, 在调控AD的发生和发展中起着一定的作用^[3]。本课题组在前期的研究中发现, 在认知障碍大鼠模型脑组织中HDAC6水平升高^[4]。而导致其升高的机制以及组蛋白调控认知行为学功能的机制, 目前还不清楚。研究认为, 组蛋白乙酰化通过促进DNA与组蛋白的解离, 核小体结构松弛, 从而激活基因的转录^[5]。近年来发现, HDAC6还可能介导非组蛋白去乙酰化, 如通过对热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)和抗氧化蛋白等乙酰化水平的修饰来调控细胞的功能^[6]。研究表明, HSP90作为细胞分子伴侣, 能维持多种功能蛋白质的稳定性和细胞存活率^[7]。HSP90是HDAC6的主要作用底物, HDAC6通过调节底物HSP90, 在细胞运动、细胞信号转导和细胞存活率等发挥重要作用^[8]。研究发现, 在老龄人脑中, 应用HSP90抑制剂可翻转Tau过度磷

酸化导致的染色质重组^[9], HSP90也可以在AD早期抑制 $A\beta$ 的聚集^[10]。但是, 关于HDAC6是否通过介导HSP90的乙酰化水平, 而影响AD神经元的发生, 目前还不清楚。

本研究通过用 $A\beta$ 1-42预处理的海马神经细胞, 分别加入HDAC6抑制剂和激动剂、以及HSP90抑制剂, 观察各种药物对海马神经细胞的活性和神经元形态的影响, 以分析HDAC6和HSP90在调控AD发生中的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

取成年雄性和雌性Sprague Dawley(SD)大鼠(220~250 g)(购于山西医科大学动物实验中心)自由交配, 交配完成后, 观察母鼠阴道涂片, 出现精子细胞即算孕半日。母鼠孕18天, 深度麻醉后解剖母鼠, 取胎鼠提取细胞。上述动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定, 并已通过山西医科大学动物实验及实验动物伦理委员会审查批准。

1.2 实验试剂

实验试剂包括: DMEM(11960044, Thermo)、B-27(17504044, Thermo)、Neurobasal培养基(21103049, Thermo)、L-谷氨酰胺(25030081, Thermo)、DNA酶(EN0521, Thermo)、马血清(04-004-1A, Biological Industries)、木瓜酶(abs47014927, Absin)、青霉素和链霉素(abs9244, Absin)、多聚-L-赖氨酸(abs9172, Absin)、 β -tubulin III抗体(AB0043, abways)、DAPI染色(AR1176, 博士德)、超敏发光液(AR1191, 博士德)。

1.3 大鼠海马神经元细胞的分离与培养

取孕18天的SD大鼠的胎鼠(操作方法参照以往发表的文献[11])。将取出的海马放在配制好的DMEM培养基(45 mL DMEM+5 mL马血清+0.25 mL青霉素和链霉素)中,用眼科剪将海马剪成1 mm³的块状,以2 mg/mL的木瓜酶在37 °C、5% CO₂培养箱中消化30 min(每5 min振荡1次),加入1 mL马血清终止消化,仔细去掉上层的液体,保留下面的组织块。重新加入1.5 mL新鲜培养基,用1 mL枪头轻轻吹打10次(每次吹打前加入10 μ L的DNA酶),随后静置2 min,吸取上清液于离心管中,重复以上操作3次。用200目网筛过滤细胞悬浮液,并于4 °C离心机1 500 r/min离心5 min后取上清,加入DMEM培养基。利用细胞计数板计数,以7 $\times$ 10⁵个/mL的密度接种于多聚-L-赖氨酸包被过的6孔板中,每孔加入2 mL的DMEM培养基(96孔板加入200 μ L),放置37 °C、5% CO₂培养箱内培养。4 h后,将DMEM培养基换成Neurobasal培养基(50 mL Neurobasal培养基+1 mL B-27+0.25 mL谷氨酰胺+0.25 mL青霉素和链霉素)培养,每隔3天更换培养基1次。

1.4 免疫荧光染色鉴定海马神经元细胞

神经元培养7天后,将6孔板中的爬片取出,用PBS轻柔洗3次。4%多聚甲醛固定60 min,用PBS浸洗3次,每次5 min。5% BSA和1% Triton X-100室温封闭1 h。孵育 β -tubulin III抗体(1:100),4 °C过夜。第2天室温复温60 min,1 $\times$ PBS洗4次,孵育荧光二抗山羊抗兔(1:100, BA1105, 博士德),37 °C、1 h。用DAPI(AR1176, 博士德)染细胞核15 min,抗荧光衰减封片剂(AR1109, 博士德)封片。荧光显微镜下检测细胞的阳性率,以阳性率大于95%作为细胞存活的标准。

1.5 分组及给药

将海马神经元细胞用聚集态A β 1-42(40 μ mol/L)干预24 h后,随机分为5组。分别加入HDAC6抑制剂tubastatin A hydrochloride(TSA, Sigma, SML0044, 2 μ mol/L, A β +TSA组)、HDAC6激动剂theophylline(Theo, 爱必信, abs42028317, 300 μ mol/L, A β +Theo组)、HSP90抑制剂ganetespil(Gane, Mce, HY15205, 50 μ mol/L, A β +Gane组)以及生理盐水(normal saline, NS, A β +NS组);海马神经元中加NS作为模型对照(NS组)。每组各与药物共同孵育。

1.6 CCK8检测细胞活性

神经元细胞与药物孵育24 h后,可见细胞的形态发生了明显的变化。各组细胞中均加入200 μ L

CCK8溶液,在细胞培养箱孵育4 h后,用酶标仪在450 nm处检测吸光度值,分析神经元的活性。

1.7 免疫荧光染色检测细胞突起长度和分支数

神经元活性检测结束,分别对各组细胞进行免疫荧光染色,其步骤如上述。各组细胞均加入 β -tubulin III一抗(1:100)、山羊抗兔二抗(1:100),将细胞核用DAPI进行染色。每组在荧光显微镜下随机选取5个20 $\times$ 视野观察细胞形态,同时应用ImageJ里面的Neuron J和Sholl Analysis插件分别测量每个视野的海马神经细胞突起的长度及分支数,取其平均值作为各组1次检测的数据,每组分别应用上述方法连续检测5次。

1.8 Western blot检测HDAC6和HSP90蛋白表达

各组细胞分别经过药物处理后,在6孔板的每个孔加入60 μ L细胞裂解液,并按1:100比例加入PMSF,在冰上静置15 min后,用细胞刮刮取细胞,将2个孔合并为1个孔,将裂解产物移入到新的EP管中,离心,提取蛋白。参照本实验室以往的实验方法^[4],按照组别顺序依次加样、电泳、蛋白转印、封闭等处理后,加入HDAC6兔抗大鼠多克隆抗体(1:1 000, ab1440, Abcam, USA)或HSP90兔抗大鼠单克隆抗体(1:1 000, ab203126, Abcam, USA)或 β -actin兔抗大鼠多克隆抗体(1:5 000, AP0060, Bioworld Technology Inc, MN, USA),4 °C过夜,山羊抗兔二抗(1:100)室温孵育2 h。将免疫复合物和超敏发光液混合反应,曝光。以 β -actin作为内参,计算蛋白的相对表达含量。

1.9 qRT-PCR技术检测hsp90 mRNA表达

用PrimerBlast(NCBI, Bethesda, MD)针对靶基因hsp90设计引物和内参, hsp90的上义序列5'-CCC AAC AAG CAA GAC CGA ACC-3',下义序列5'-CCA GCC TGC AAA GCC TCC ATG-3';内参 β -actin的上义序列5'-TGA ACG GGA AGC TCA CTG G-3',下义序列5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'。利用Trizol法提取RNA,各组细胞经药物处理后,在6孔板的各个孔加入100 μ L Trizol,静置5 min后,用细胞刮刮散细胞。按照Quanti Nova Reverse Transcription Kit(205410, Germany)说明书进行检测,25 °C 6 min,45 °C 20 min,85 °C 10 min,将RNA反转录成cDNA,-30 °C保存。根据标准曲线确定扩增效率,确定样品质量2.5 μ g,引物浓度1 μ mol/L,用10 μ L反应体系,循环条件为:94 °C变性5 min,60 °C退火延伸1 min,循环40次,最后用Bio-Rad CFX Manager(Bio-

Rad, USA)软件进行分析。

1.10 统计学分析

应用SPSS 22.0软件对数据进行统计学分析, 所有数据均以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组之间的数据比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 海马神经元细胞免疫荧光染色鉴定结果

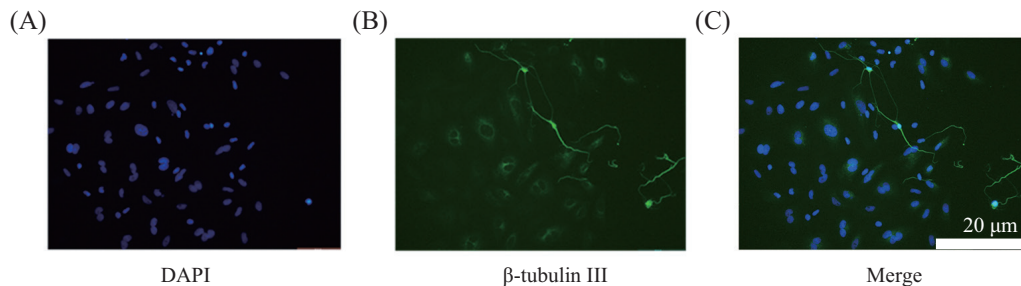
免疫荧光染色显示细胞核为蓝色(图1A), 细胞质显示为绿色(图1B), 图1C是以上两张图的合并图。在20 $\times$ 视野下, 随机选取5个视野的细胞, 以DAPI和 β -tubulin III的阳性细胞数占总细胞数的百分比作为培养的神经元细胞阳性率, 每组均经过计数分析, 其阳性率 $>95\%$, 表示神经元活性达标, 可进行下面的实验; 如其阳性率 $<95\%$, 则视为不达标, 需重新进行细胞培养和活性鉴定。

2.2 海马神经元细胞活性和形态的检测结果

图2为应用CCK8法对海马神经元细胞的活性检测结果; 图3为采用免疫荧光染色对细胞形态检测的结果, 图3A为各组细胞显微照相结果, 图3B和图3C分别为各组神经元突起的长度和分支数结果。与NS组相比, A β +NS组的细胞活力显著下降($P<0.05$), 海马神经细胞突起长度和分支数也明显降低($P<0.01$), 表明在A β 诱导神经元后其细胞功能和形态均受到抑制。与A β +NS组比较, 细胞活力以及细胞突起长度和分支数, 在A β +TSA组明显提高($P<0.05$); 而A β +Theo组和A β +Gane组则均降低(均为 $P<0.05$)。结果表明, 激动HDAC6或抑制HSP90后神经元活性或细胞长度及分支数下降了, 而抑制HDAC6后则引起相反的效应。

2.3 Western blot检测HDAC6和HSP90蛋白的表达结果

图4为用Western blot检测的神经元细胞HDAC6和HSP90表达的免疫印迹和蛋白相对含量结果。与

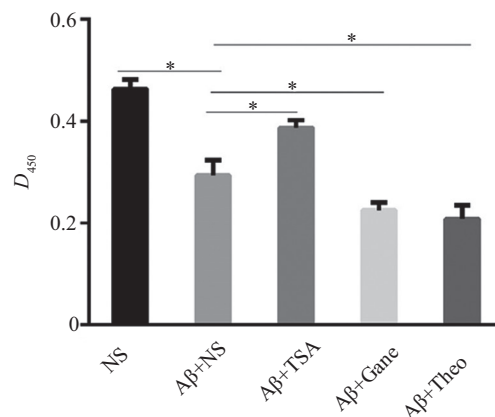


A: 细胞核被DAPI染成蓝色; B: 细胞质被 β -tubulin III染为绿色; C: 两张图的合并。

A: the nuclei stained with DAPI (blue); B: the cytoplasm stained with β -tubulin III (green); C: the combination of the Fig.A and Fig.B.

图1 原代培养的海马神经元的 β -tubulin III免疫荧光染色

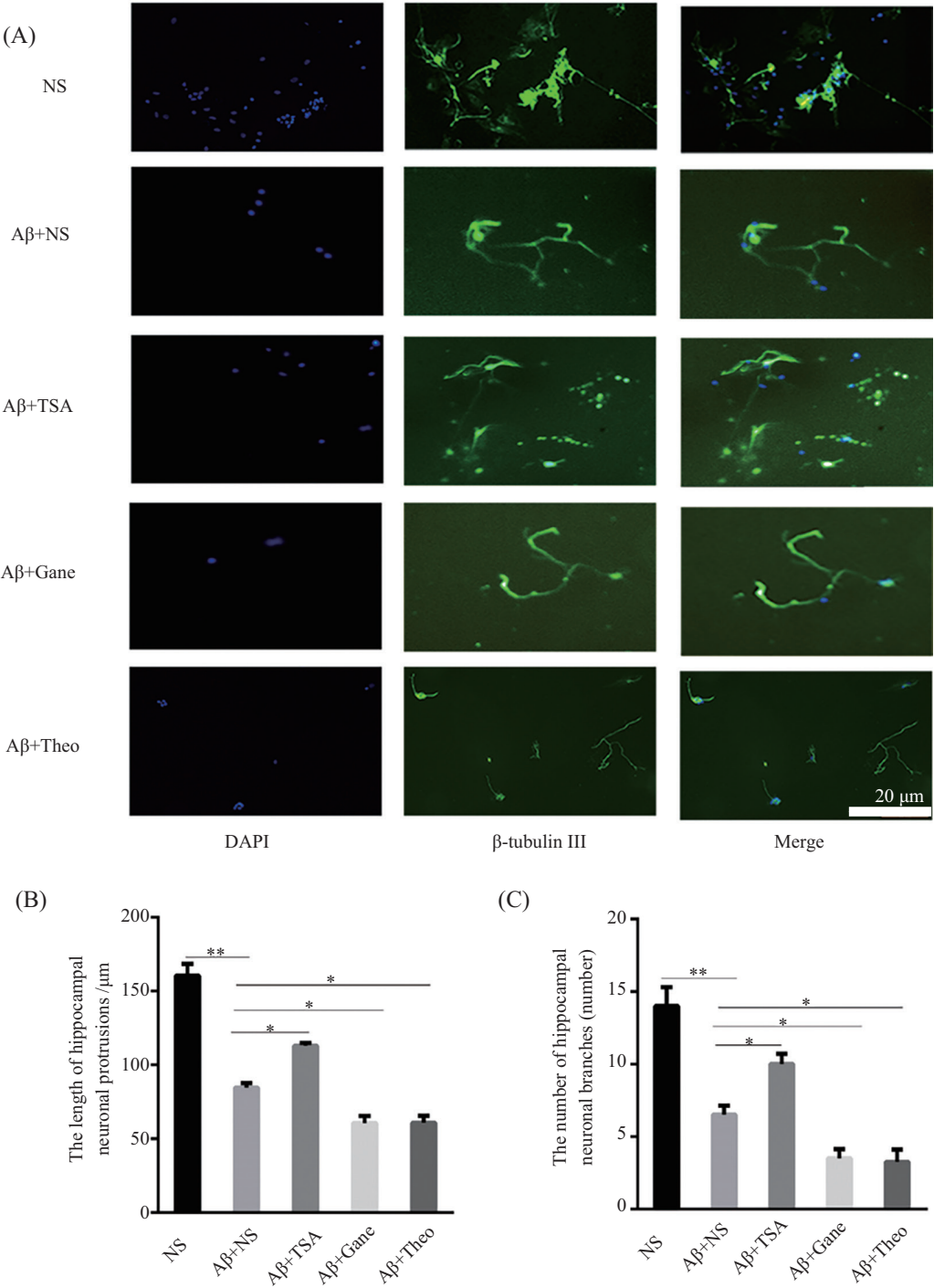
Fig.1 Immunofluorescence images of β -tubulin III in primary cultured hippocampal neurons (immunofluorescence staining)



* $P<0.05$.

图2 应用CCK8检测的各组海马神经元细胞活性的结果

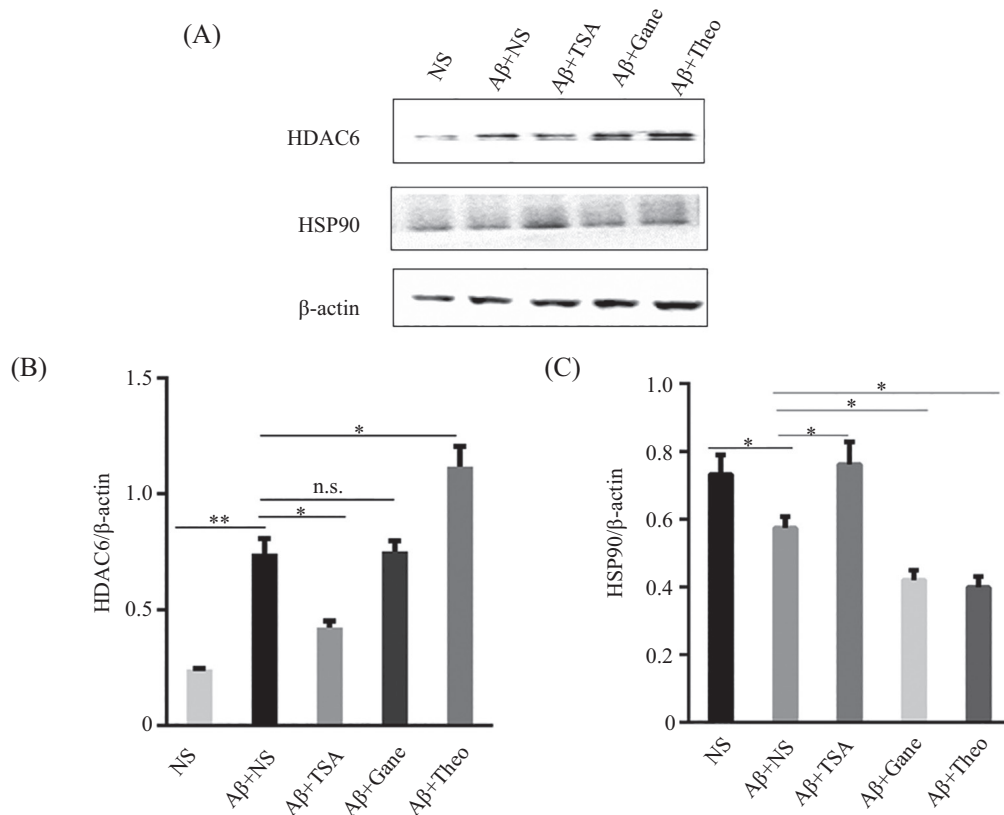
Fig.2 The result of CCK8 detection of hippocampal neuronal cell activity in five groups



A: 各组海马神经元形态图, DAPI标记细胞核(蓝色荧光), β -tubulin III标记突起(绿色荧光); B: 海马神经元细胞突起长度; C: 海马神经元细胞核分支数。 $P<0.05$, $**P<0.01$ 。
A: the morphological images of hippocampal neurons in each group, the nuclei are labeled with DAPI (blue fluorescence) and the protrusions are labeled with β -tubulin III (green fluorescence); B: the length of hippocampal neuronal protrusions; C: the number of hippocampal neuronal branches. $*P<0.05$, $**P<0.01$.

图3 免疫荧光染色的各组细胞形态变化的结果
Fig.3 Morphological changes of hippocampal neurons stained with immunofluorescence in five groups

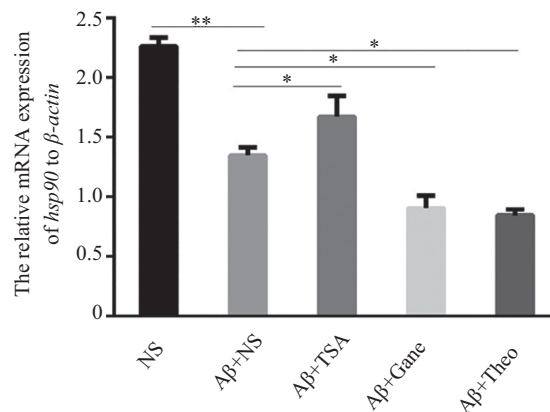
NS组相比, Aβ+NS组的HDAC6蛋白表达相对含量升高($P<0.01$), 而HSP90则降低($P<0.05$)。与Aβ+NS组比较, Aβ+TSA组HDAC6含量明显降低($P<0.05$), 而HSP90含量则升高($P<0.05$); Aβ+Theo组HDAC6含量升高($P<0.05$), HSP90则降低($P<0.05$); 而Aβ+Gane组HDAC6含量不变($P>0.05$), HSP90则明显降低



A: HDAC6和HSP90的原始免疫印迹图; B: HDAC6和 β -actin的相对表达量; C: HSP90和 β -actin的相对表达量。* P <0.05; ** P <0.01; n.s.: P >0.05。
A: the original immunoblot images of HDAC6 and HSP90; B: the relative expression of HDAC6 to β -actin; C: the relative expression of HSP90 to β -actin.
* P <0.05; ** P <0.01; n.s.: P >0.05.

图4 Western blot检测的海马神经元细胞HDAC6和HSP90的蛋白表达

Fig.4 Western blot was used to detect the levels of HDAC6 and HSP90 in hippocampal neurons in five groups



* P <0.05, ** P <0.01.

图5 qRT-PCR检测的各组海马神经元细胞中*hsp90* mRNA相对表达含量

Fig.5 The results of qRT-PCR of *hsp90* mRNA in hippocampal neurons in five groups

(P <0.05)。

可见,在A β 诱导的神经元细胞中HDAC6表达升高,而HSP90表达则降低。应用HDAC6抑制剂使HDAC6降低的同时HSP90表达升高了,而应用HDAC6激动剂使HDAC6升高的同时HSP90表达则

降低了;应用HSP90的抑制剂降低了HSP90的表达,却没有引起HDAC6的变化。

2.4 海马神经元细胞*hsp90* mRNA结果

图5为qRT-PCR检测的6组海马神经元细胞中*hsp90* mRNA相对表达量的结果。与NS组相比,

A β +NS组的mRNA水平明显降低($P<0.01$)。与A β +NS组比较, 的mRNA水平在A β +TSA组中升高($P<0.05$), A β +Theo组和A β +Gane组则均降低(均为 $P<0.05$)。表明, 抑制HDAC6后的mRNA表达水平升高了, 而激动HDAC6后则引起相反的效果。

3 讨论

关于组蛋白乙酰化在AD中的作用, 研究认为, 抑制HDACs会改善AD模型脑组织的病理变化和行为学功能^[12]。而在临床病例中也发现, HDAC水平明显升高, 如ALSADANY等^[13]和DING等^[14]发现, 在AD患者血浆或脑组织中HDAC总体水平较对照者显著增高。GOVINDARAJAN等^[15]通过对APP Ψ 1-21及基因敲除后的AD小鼠模型的行为学研究表明, 基因敲除的AD小鼠的认知功能好于AD小鼠, 提示的基因表达下降对于AD小鼠的认知功能具有保护作用。可见, 基因敲除改善了AD模型小鼠的认知功能。在本实验室前期的实验结果也发现, 在A β 诱导的认知功能障碍大鼠海马组织中HDAC6的表达明显增加, 应用HDAC6抑制剂后可下调HDAC6的表达, 同时也改善了大鼠的认知功能。可见, 不论是在AD样动物模型或是在临床病例的研究中均表明, HDAC6的升高可能与AD病理学和行为学变化有关。

有关HDAC6在AD中的作用机制, 研究表明, 组蛋白乙酰化有利于DNA与组蛋白的解离, 核小体结构松弛, 从而激活了对某些AD易感基因的转录, 诱导了AD的病理学变化^[5,16], HDAC6通过降低组蛋白乙酰化水平, 进而可能抑制某些易感基因的激活, 而抑制AD的发生^[17]。也有研究认为, HDAC6不一定直接参与基因的调控, HDAC6除有组蛋白去乙酰化酶活性外, 还可能介导非组蛋白去乙酰化, 如HSP90和抗氧化蛋白等乙酰化水平的修饰^[18]。

研究认为, HSP90是在细胞受到各种刺激时产生的具有重要生理功能和高度保守的分子伴侣, 参与蛋白质的合成、折叠、装配、转运和降解等过程, 维持细胞蛋白自稳, 提高细胞对应激原的耐受性, 增强抗氧化作用, 使细胞维持正常的生理功能^[19]。关于HSP90在AD中的作用, 有文献报道, 分子伴侣的激活可阻断或预防Tau聚集^[20]; 同时上调HSP90可促进A β 的清除^[21], 也可抑制A β 的聚集^[10]。在衰老和疾

病过程中分子伴侣的生物学活性或表达水平的下降, 不能及时帮助细胞修复损伤, 导致了细胞内错误折叠的蛋白质的聚集, 而打破分子伴侣与蛋白质相互作用的平衡, 从而启动细胞一系列病理变化过程^[22]。

本研究结果表明, 在A β 诱导的海马神经元细胞HDAC6的表达明显增加, 而 mRNA和HSP90蛋白则降低, 神经元活性和形态变化均明显降低。应用HDAC6抑制剂可下调HDAC6水平, 同时促进了 mRNA和HSP90蛋白的表达, 也提高了海马神经元活性、突起长度和分支数目; HDAC6激动剂则引起相反的效果; 而应用HSP90抑制剂使 mRNA表达和HSP90蛋白下降后, 同时也降低了神经元活性和突起长度以及分支数目, 但HDAC6没有变化。研究认为, HDACs通过修饰调控染色质, 进而改变转录因子活性和转录延伸, 因而能直接监管HSP90的活性^[23], 失活或敲低能够导致HSP90过度乙酰化^[8]。因此推测, HDAC6可能通过增强对HSP90去乙酰化下调HSP90水平而使蛋白质转录后调控作用的平衡失调, 进而影响参与神经元信号转导或神经元发生中的蛋白质功能, 导致神经元活性或形态的变化。在A β 诱导的海马神经元细胞中, 下调HDAC6可能通过对HSP90的去乙酰化作用的降低而提高HSP90的活性, 通过HSP90分子伴侣的调控促进神经细胞运动、细胞信号转导以及细胞存活率^[24], 从而提高神经元的活性和促进神经元的形态变化。以上研究推测, HDAC6可能通过调控HSP90水平进而影响A β 诱导的大鼠海马神经元细胞功能和形态的变化。但是, 二者作用的机制及其对AD动物模型脑组织中病理学变化的影响还有待于进一步研究。

参考文献 (References)

- [1] SCHELTENS P, BLENNOW K, BRETELER M M B, et al. Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2016, 388(10043): 505-17.
- [2] Sharma S, Sarathlal K C, Taliyan R. Epigenetics in neuro-degenerative diseases: the role of histone deacetylases [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2019, 18(1): 11-8.
- [3] LI G, JIANG H, CHANG M, et al. HDAC6 α -tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases [J]. J Neurol Sci, 2011, 304(1/2): 1-8.
- [4] WANG H Y, LIU Z, WANG Y L, et al. Nitric oxide modulates the cognitive function of beta-amyloid-induced cognitive dysfunction rats by s-nitrosylation of histone deacetylase 6 [J]. Acta medica mediterranea, 2019, 35(5): 2751-9.
- [5] LIU S, CHANG W, JIN Y, et al. The function of histone acetyla-

- tion in cervical cancer development [J]. *Biosci Rep*, 2019, 12(4): 39-45.
- [6] XIONG Y, ZHAO K, WU J, et al. HDAC6 mutations rescue human tau-induced microtubule defects in *Drosophila* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(12): 4604-9.
- [7] YAO L, OHLSON S, DYMOCK B W. Design and synthesis of triple inhibitors of janus kinase (JAK), histone deacetylase (HDAC) and heat shock protein 90 (HSP90) [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(8): 1357-62.
- [8] JIMENEZ-CANINO R, LORENZO-DIAZ F, JAISSE F, et al. Histone deacetylase 6-controlled Hsp90 acetylation significantly alters mineralocorticoid receptor subcellular dynamics but not its transcriptional activity [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(6): 2515-32.
- [9] KLEIN H U, MCCABE C, GJONESKA E, et al. Epigenome-wide study uncovers large-scale changes in histone acetylation driven by tau pathology in aging and Alzheimer's human brains [J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(1): 37-46.
- [10] KOREN J, JINWAL U K, LEE D C, et al. Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(4): 619-30.
- [11] XU S Y, WU Y M, JI Z, et al. A Modified technique for culturing primary fetal rat cortical neurons [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 2012: 8030-9.
- [12] DE SIMONE A, MILELLI A. Histone deacetylase inhibitors as multitarget ligands: new players in Alzheimer's disease drug discovery [J]? *Chem Med Chem*, 2019, 14(11): 1067-73.
- [13] ALSADANY M A, SHEHATA H H, MOHAMAD M I, et al. Histone deacetylases enzyme, copper, and IL-8 levels in patients with Alzheimer's disease [J]. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2013, 28(1): 54-61.
- [14] DING H, DOLAN P J, JOHNSON G V. Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau [J]. *J Neurochem*, 2008, 106(5): 2119-30.
- [15] GOVINDARAJAN N, RAO P, BURKHARDT S, et al. Reducing HDAC6 ameliorates cognitive deficits in a mouse model for Alzheimer's disease [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(1): 52-63.
- [16] KHANGURA R K, BALI A, JAGGI A S, et al. Histone acetylation and histone deacetylation in neuropathic pain: An unresolved puzzle [J]? *Eur J Pharmacol*, 2017, 795(15): 36-42.
- [17] SCHOLZ B, SCHULTE J S, HAMER S, et al. HDAC (histone deacetylase) inhibitor valproic acid attenuates atrial remodeling and delays the onset of atrial fibrillation in mice [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2019, 12(3): e007071.
- [18] BRINDISI M, SARASWATI A P, BROGI S, et al. Old but gold: tracking the new guise of histone deacetylase 6 (HDAC6) enzyme as a biomarker and therapeutic target in rare diseases [J]. *J Med Chem*, 2019, 63(1): 23-39.
- [19] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein [J]. *Science*, 2002, 295(5561): 1852-8.
- [20] GORANTLA N V, CHINNATHAMBI S. Tau protein squired by molecular chaperones during Alzheimer's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 66(3): 356-68.
- [21] ZHANG M, QIAN C, ZHENG ZG, et al. Jujuboside a promotes A β clearance and ameliorates cognitive deficiency in Alzheimer's disease through activating Axl/HSP90/PPAR γ pathway [J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4262-78.
- [22] SANTRA M, DILL K A, DE GRAFF A M R. Proteostasis collapse is a driver of cell aging and death [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(44): 22173-8.
- [23] Joshi A D, Barabutis N, Birmpas C, et al. Histone deacetylase inhibitors prevent pulmonary endothelial hyperpermeability and acute lung injury by regulating heat shock protein 90 function [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 309(12): L1410-9.
- [24] WANG K, SHANG Y, DOU F. Brain aging: Hsp90 and neurodegenerative diseases [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1086: 93-103.