

## Egr-1对APP基因表达的调控作用

马琳<sup>1#</sup> 周瑜<sup>2#</sup> 李永玲<sup>2</sup> 柴娟<sup>1</sup> 贾中发<sup>2</sup> 郭克<sup>2</sup> 孙涛<sup>1</sup> 崔建奇<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>宁夏颅脑疾病重点实验室, 省部共建国家重点实验室培育基地, 银川 750004; <sup>2</sup>宁夏医科大学基础医学院, 银川 750004)

**摘要** 该研究构建了含有APP启动子的荧光素酶报告质粒以及缺失突变的报告质粒, 将该质粒与Egr-1真核表达载体pCDNA3-Egr-1共转染到HEK293与U87MG细胞中进行荧光素酶活性测定, 以确定Egr-1对APP基因表达的调控作用。通过染色质免疫共沉淀实验(chromatin immunoprecipitation assay, ChIP)和凝胶电泳迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)确定Egr-1蛋白在APP启动子上的结合部位, 同时利用组蛋白去乙酰化酶抑制剂TSA(trichostatin A)和butyrate诱导内源性Egr-1的表达以及Egr-1抑制剂suramin来作用于细胞, 通过蛋白免疫印迹分析(Western blot)检测Egr-1对APP蛋白表达的作用。结果显示, Egr-1蛋白在APP基因启动子上5'UTR区域有特异性的结合部位, 去除该结合部位则Egr-1失去对APP基因启动子的调控作用, ChIP和EMSA的结果也证实了该结合位点; 通过HDAC抑制剂和suramin干扰内源性Egr-1的表达则显著影响了Egr-1对APP基因表达的调控作用。

**关键词** Egr-1; 淀粉样前体蛋白; 阿尔茨海默病; 基因表达调控

## Regulatory Effects of Egr-1 on APP Gene Expression

Ma Lin<sup>1#</sup>, Zhou Yu<sup>2#</sup>, Li Yongling<sup>2</sup>, Chai Juan<sup>1</sup>, Jia Zhongfa<sup>2</sup>, Guo Ke<sup>2</sup>, Sun Tao<sup>1</sup>, Cui Jianqi<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, the Incubation Base of National Key Laboratory, Yinchuan 750004, China;

<sup>2</sup>School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**Abstract** The luciferase reporter plasmids which contain APP gene promoter and mutant APP gene promoter were constructed. The Egr-1 eukaryotic expression vector pCDNA3-Egr-1 and the constructed reporter plasmids were co-transfected into HEK293 and U87MG cells to analyze the effects of Egr-1 on APP promoter activities. The chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) and electrophoretic mobility shift assay (EMSA) were performed to determine the binding sites of Egr-1 on 5'UTR in APP promoter. Cells were treated with histone deacetylase (HDAC) inhibitor trichostatin A (TSA) and butyrate as well as Egr-1 inhibitor suramin and Western blot was performed to evaluate the changes of endogenous Egr-1 expression and the effects of Egr-1 on APP promoter activities were verified. The results of luciferase assay demonstrated that Egr-1 could up-regulate APP gene expression, and Egr-1 could bind to the specific binding sites in the 5'UTR of APP promoter. The up-regulatory effects of Egr-1 on APP promoter would be eliminated when these binding sites were deleted. ChIP and EMSA results confirmed that Egr-1 could bind to these sites. In addition, the effects of Egr-1 on APP promoter activities were dramatically influenced if the endogenous expression of Egr-1 was disturbed by HDAC inhibitor and suramin.

**Keywords** Egr-1; amyloid precursor protein; Alzheimer's disease; regulation of gene expression

收稿日期: 2014-11-06

接受日期: 2014-11-26

国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2012CB722408)和国家自然科学基金(批准号: 81260197)资助的课题

#共同第一作者

\*通讯作者。Tel: 0951-6880697, E-mail: jjiani@gmail.com

Received: November 6, 2014

Accepted: November 26, 2014

This work was supported by the State Key Development Program for Basic Research of China (973 Program) (Grant No.2012CB722408) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81260197)

#These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author. Tel: +86-951-6880697, E-mail: jjiani@gmail.com

网络出版时间: 2014-12-19 11:55

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20141219.1155.001.html>

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种不可逆转的、渐进性的神经损害性疾病, 缓慢地引起记忆和思维能力的衰退<sup>[1]</sup>。AD的发病机理至今尚未明确, 但经典的A- $\beta$ 学说受到了广泛认可, A- $\beta$  (amyloid  $\beta$ -peptide) 是由淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 经过分泌酶异常裂解而产生, 并在细胞外大量沉积后形成老年斑<sup>[2-3]</sup>。APP是一种多功能的跨膜蛋白, 广泛存在于哺乳动物体内, 在整个进化过程中是高度保守的, 在发育方面的调控作用与突触形成是相平行的<sup>[4]</sup>。APP有多种异构体, 越来越多的研究表明, 这些异构体的表达模式在哺乳动物的神经系统是不相同的<sup>[3]</sup>。目前, 大多数的研究所关注的是APP的裂解和所释放的A- $\beta$ 及其神经毒性作用<sup>[5-6]</sup>。体外研究表明, APP能促进神经元的分支发生和突触形成, 调节神经元的兴奋性和突触可塑性并可能保护神经元免于氧化应激的损伤。除了这些在神经系统发育过程中的重要作用之外, 在许多其他组织细胞中也检测到了APP的存在<sup>[4]</sup>。APP在非神经组织中的功能并没有得到详尽的研究, 但已经有越来越多的证据表明, APP在血液凝固、血小板活化以及免疫细胞对损伤和感染的应答方面有潜在功能<sup>[7]</sup>。对APP基因敲除小鼠的研究提供了大量的有关APP通路的信息以及它在神经胶质细胞正常功能中也有重要作用<sup>[8]</sup>。APP的表达受到多种细胞介导因子的调控<sup>[9]</sup>。

早期反应因子-1 (early responsive factors-1, *Egr-1*) (也叫做*NGFI-A*) 是一种早期生长反应基因, 属于转录因子锌指蛋白家族成员。在许多细胞中, 包括神经元, 早期反应因子-1显示出Fos样诱导功能。早期反应因子-1能够调控突触可塑性过程及维持长时程效应中的某些晚期反应因子<sup>[10]</sup>。*Egr-1*可以在小鼠大脑皮质组成型表达, 但是在某些刺激条件下 (如暴露于新环境、恐怖条件下及认知任务等), 可快速在前额叶和海马组织诱导表达<sup>[11-13]</sup>。*Egr-1*可以上调早老素在神经元细胞中的表达<sup>[14]</sup>, 最终导致 $\gamma$ -分泌酶对APP的裂解。在AD病人的大脑中, *Egr-1*的表达上调, 过表达的*Egr-1*通过活化CDK5和失活PP1控制Tau蛋白的磷酸化和去磷酸化<sup>[15]</sup>。但*Egr-1*对APP基因表达调控的影响至今未见报道。本研究利用报告基因技术探索*Egr-1*对APP表达的调控作用及其机制, 为AD的预防及新药的开发提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PCDNA3-*Egr-1*、pGL3-basic及pCDNA3-Puro $\alpha$ 真核表达载体系本实验室保存; HEK293和U87MG细胞为本实验室所保存; 抗体均来自于美国Abcam公司; 报告基因检测系统试剂盒购于美国Promega公司。

### 1.2 构建pGL3-APP启动子真核表达载体

通过计算机辅助分析发现, 在APP基因的5'UTR区域存在着*Egr-1*结合位点, 以此来设计引物。利用PCR技术, 以APP启动子为模板, 使用设计好的引物扩增APP启动子DNA, 将扩增得到的DNA片段纯化, 回收, 克隆到pGL3-basic报告质粒荧光素酶基因上游, 构建pGL3-APP170/147、pGL3-APP100/147及pGL3-APP100/147缺失突变体报告质粒。

### 1.3 荧光素酶报告基因实验

将构建好的质粒分别转染到HEK293和U87MG细胞中, 培养48 h后吸出细胞培养皿中的培养液, 然后用冷的PBS洗涤细胞, 用细胞刮将细胞从培养皿中刮除, 转移到EP管中后加入100  $\mu$ L细胞裂解液, 将细胞重悬后放于冰盒使细胞充分裂解, 12 000  $\times$ g离心15 min, 取100  $\mu$ L上清加入到96孔板中, 用报告基因试剂盒和化学发光检测系统进行测定。

### 1.4 染色质免疫共沉淀实验 (chromatin immunoprecipitation, ChIP)

用*Egr-1*真核表达质粒pCDNA3-*Egr-1*转染培养的U87MG细胞, 甲醛固定细胞20 min后超声破碎, 提取核蛋白, 加入*Egr-1*抗体孵育过夜, 与靶蛋白*Egr-1*-DNA复合物相互结合, 加入protein A, 结合抗体-*Egr-1*-DNA复合物, 离心, 去上清, 对沉淀下来的复合物进行清洗, 除去一些非特异性结合, 用洗脱液洗脱, 得到富集的*Egr-1*-DNA复合物, 解交联后纯化富集的DNA片段, 将其进行PCR分析。

### 1.5 凝胶迁移实验 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

将*Egr-1*真核表达质粒pCDNA3-*Egr-1*转染到U87MG细胞中, 用细胞裂解液裂解细胞, 加入总反应体积为20  $\mu$ L、含20  $\mu$ g细胞核蛋白、60 000 cpm [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP]末端标记的单链寡核苷酸探针于反应缓冲液中。冰上孵育30 min后, 上样于8%的非变性聚丙烯酰胺胶中电泳4 h。干胶后进行放射自显影。对于竞争和迁移分析, 在加入同位素标记探针之前,

表1 构建pGL3-APP启动子表达载体的引物  
 Tabel 1 Primers for constructed pGL3-APP promoter plasmid

引物 Primers	序列 Sequence	用途 Usage
Primer 1-F	5'-GGG GTA CCG GCG GCG CCG CTA GGG TC-3'	Constructed pGL3APP100/147 plasmid and pGL3-APP100/147Mutant plasmid
Primer 1-R	5'-GTC TCC CGG GGC CCC CGC GCA C-3'	Constructed pGL3-APP100/147Mutant plasmid
Primer 2-F	5'-GGG CAG AGC AAA GGA CGC GGC G-3'	Constructed pGL3-APP100/147Mutant plasmid
Primer 2-R	5'-TTA TAA ATG TCG TTC GCG GGC GCA-3'	Constructed pGL3-APP100/147Mutant plasmid
Primer 3-F	5'-CGC CGC GTC CTT GCT CTG CCC GTC TCC CGG GGC CCC CGC GCA C-3'	Constructed pGL3-APP100/147Mutant plasmid
Primer 3-R	5'-GTG CGC GGG GGC CCC GGG AGA CGG GCA GAG CAA GGA CGC GGC G-3'	Constructed pGL3-APP100/147Mutant plasmid
Primer 4-F	5'-CGC CAA GGG CGC GTG CAC CTG TGG-3'	Constructed pGL3-APP170/147 plasmid
Primer 4-R	5'-CGC GAC CCT GCG CGG GGC ACC GAG-3'	Constructed pGL3-APP170/147 plasmid and pGL-3APP100/147plasmid

由于pGL3-APP100/147Mutant是缺失突变体,故需要利用引物1从pGL3-APP170/147中扩增出-100到+62的片段,用引物2从pGL3-APP170/147中扩增出从+83到+147的片段。将两次PCR的片段纯化后作为模板,再用引物3将两个片段连接、扩增,即得到pGL3APP100/147Mutant的构建载体。Since pGL3-APP100/147 is deletion mutant plasmid, the primer 1 was used to amplify the fragment of APP promoter from -100 to +62 from pGL3-APP170/147 and primer 2 to amplify the fragments of APP promoter from +83 to +147. Purified the fragments from the 2 PCRs and used it as template, the primer 3 was used to amplify, sub-clone into pGL3 basic vector to construct the pGL3-APP100/147Mutant plasmid.

于细胞提取液中分别加入非标记的寡核苷酸探针, Egr-1抗体或者正常血清在4 °C孵育过夜。实验所用的寡核苷酸探针来自APP启动子的+63到+89部位5'-ACG GCG GTG GCG CGG GCA GA-3',非特异性竞争性寡核苷酸为富含AT的序列: 5'-TCT GTA CGT GAC CAC ACT CAC CTC-3'。

### 1.6 Egr-1的表达对APP基因的影响

U87MG和HeLa细胞用DNA去乙酰化抑制剂trichostatin A(TSA, 10 nmol/L)、butyrate(1 nmol/L)和/或Egr-1抑制剂苏拉明(suramin, 100 μmol/L)处理细胞4 h后收获细胞蛋白,取50 μg总蛋白的细胞裂解液进行常规Western blot分析,并进行荧光素酶实验。U87MG细胞分别转染pCDNA3.0、pCDNA3-Purα和pCDNA3-Egr-1真核表达质粒后,取50 μg总蛋白的细胞裂解液进行常规Western blot分析。U87MG细胞分别转染pCDNA3-Egr-1表达载体以及pCDNA3空载体,48 h后进行RT-PCR分析,检测APP基因的表达。

## 2 结果

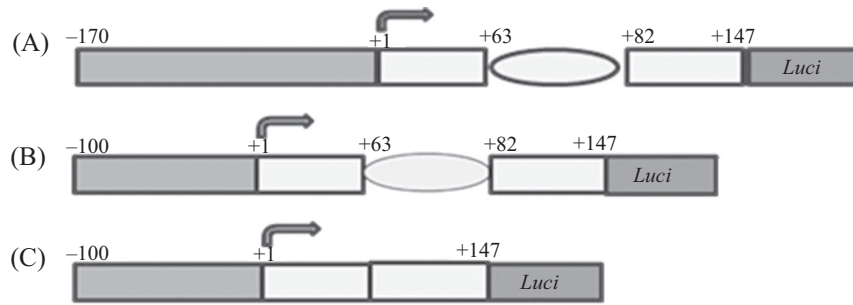
### 2.1 构建的pGL3-APP启动子报告质粒载体

为了证实Egr-1对APP启动子的调控作用,通过计算机辅助分析从理论上确定了Egr-1在APP启动子序列上两个结合位点分别位于5'UTR区的+63到+79和+66到+82。本研究构建了包括这两个结合位点

在内的长度从APP启动子-170到+147的荧光素酶报告质粒pGL3-APP170/147。在APP启动子的近端,含有多个Egr-1结合位点,但位于5'UTR区域的这两个Egr-1结合位点起着主导作用。为了进一步研究APP启动子的5'UTR区域的Egr-1位点的功能,排除其他部位的Egr-1和其他结合位点的干扰,本研究构建了含有长度从APP启动子-100到+147的荧光素酶报告质粒pGL3-APP100/147,该启动子是从转录起始位点上游100 bp的地方一直延伸到翻译起始位点之前,在这个区域,仅存在有5'UTR区域的两个Egr-1结合位点。为了确定这两个结合位点的功能,本研究还通过PCR的方法,删掉了APP启动子上从+63到+82这段区域,构成长度从-100到+147的荧光素酶报告质粒pGL3-APP100/147缺失突变体(图1)。

### 2.2 荧光素酶报告基因实验

将构建的pGL3-APP170/147荧光素酶报告质粒转染到HEK293及U251MG细胞中,同时共转Egr-1过表达质粒及对照质粒,然后用PROMEGA公司的luciferase试剂盒测定荧光素酶活性。结果显示,与对照组相比,pGL3-APP170/147报告质粒启动子活性明显被Egr-1上调(图2);为了进一步研究APP启动子5'UTR区的功能,将构建的pGL-3APP100/147转染到HEK293及U251MG细胞中,其活性依然能被Egr-1上调(图3),说明APP启动子5'UTR区的两个Egr-1结合位点对Egr-1上调APP启动子活性起

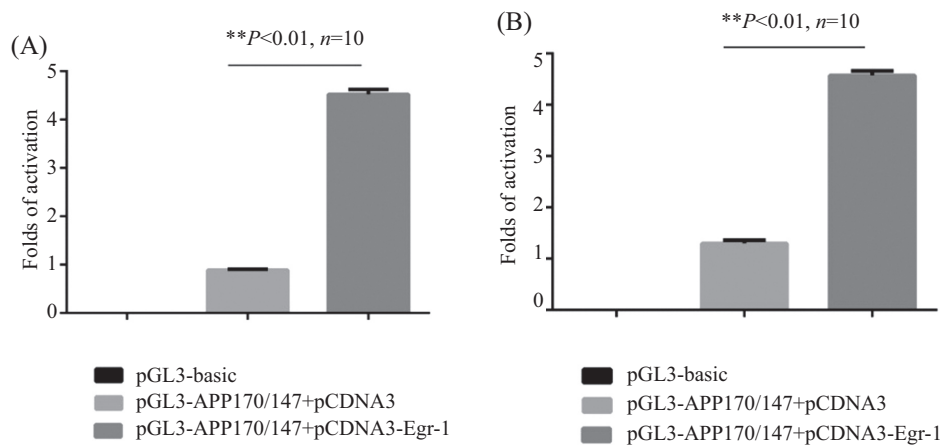


A: pGL3-APP170/147质粒结构示意图; B: pGL3-APP100/147质粒结构示意图; C: pGL3-APP100/147Mutant缺失突变体质粒结构示意图。

A: schematic illustration of pGL3-APP170/147 plasmid construct; B: schematic illustration of pGL3-APP100/147 plasmid construct; C: schematic illustration of pGL3-APP100/147Mutant plasmid construct.

图1 构建的质粒结构示意图

Fig.1 Schematic construction of plasmids

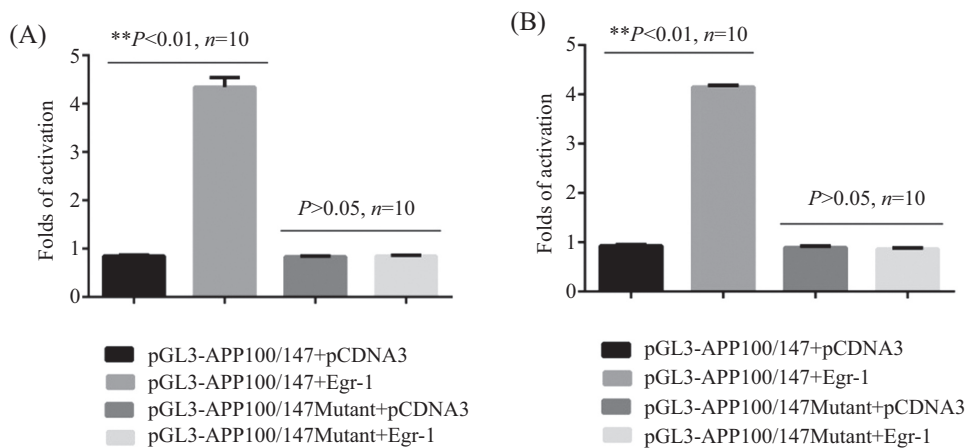


A: HEK293细胞中Egr-1对pGL3-APP170/147质粒活性的影响; B: U251MG细胞中Egr-1对pGL3-APP170/147质粒活性的影响。

A: the effects of Egr-1 on pGL3-APP170/147 activities when co-transfected into HEK293 cells; B: the effects of Egr-1 on pGL3-APP170/147 activities when co-transfected into U251MG cells.

图2 pGL3-APP170/147荧光素酶报告基因实验结果

Fig.2 The results of pGL3-APP170/147 with Luciferase assay

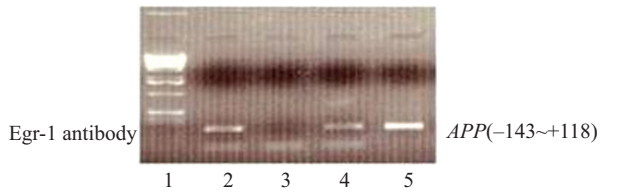


A: HEK293细胞中Egr-1对pGL3-APP100/147及pGL3-APP100/147Mutant缺失突变体质粒活性的影响; B: U251MG细胞中Egr-1对pGL3-APP100/147及pGL3-APP100/147Mutant缺失突变体质粒活性的影响。

A: the effects of Egr-1 on pGL3-APP100/147 and pGL3-APP100/147Mutant activities when co-transfected into HEK 293 cells; B: the effects of Egr-1 on pGL3-APP100/147 and pGL3-APP100/147Mutant activities when co-transfected into U251MG cells.

图3 pGL3-APP100/147和pGL3-APP100/147Mutant荧光素酶报告基因实验结果

Fig.3 The results of pGL3-APP100/147 and pGL3-APP100/147Mutant with Luciferase assay



1: marker; 2: 细胞核提取物; 3: 同源非免疫血清; 4: 非转染组; 5: 转染Egr-1真核表达质粒组。

1: marker; 2: the nuclear extracts; 3: the non-immune serum; 4: control (the untransfected cells); 5: transfected with Egr-1 eukaryotic expression plasmid.

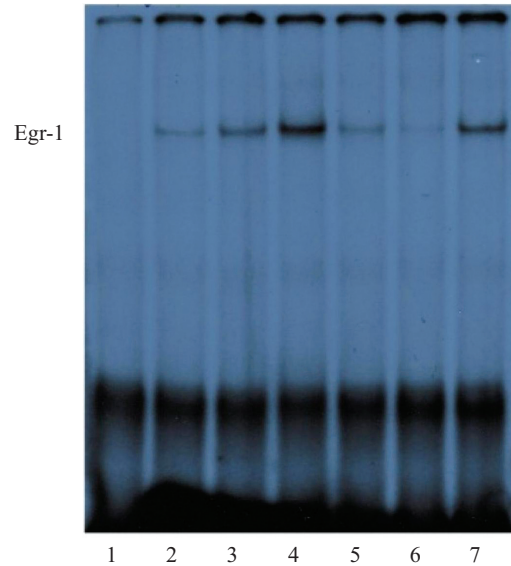
图4 Egr-1与APP启动子免疫共沉淀实验结果

Fig.4 The results of Egr-1 interacting with APP promoter determined by ChIP

着主导作用。为了验证这一点,本研究将pGL3-APP100/147缺失突变体转染到HEK293细胞及U251MG胶质瘤细胞系中,发现删掉了+63到+82区域的质粒同时共转染了过表达的Egr-1质粒,其荧光素酶活性与对照组相比没有显著差异,即说明Egr-1将不再能上调+63到+82区域缺失的APP启动子活性(图3)。由此可以推断,APP启动子5'UTR区+63到+82区域为Egr-1的结合位点,当这段结合序列从APP启动子区删除时,Egr-1对APP启动子5'UTR区的调控作用消失。

### 2.3 染色质免疫共沉淀实验

染色质免疫共沉淀实验结果显示,免疫共沉淀产物扩增出了长度约为260 bp的片段,也就是APP启动子区-143到+118的长度(图4),即APP启动子上的特定序列能与Egr-1抗体复合物进行免疫共沉淀,这说明APP的启动子上富含GC序列的区域有Egr-1的



1: 未加入探针; 2: Egr-1蛋白0.5 μg; 3: Egr-1蛋白1.0 μg; 4: Egr-1蛋白2.5 μg; 5: 加入Egr-1抗体; 6: 加入10×冷探针; 7: 加入非特异性探针。

1: free probe; 2: Egr-1 protein 0.5 μg; 3: Egr-1 protein 1.0 μg; 4: Egr-1 protein 2.5 μg; 5: plus Egr-1 antibody; 6: plus 10× cold oligo; 7: plus non-specific oligo.

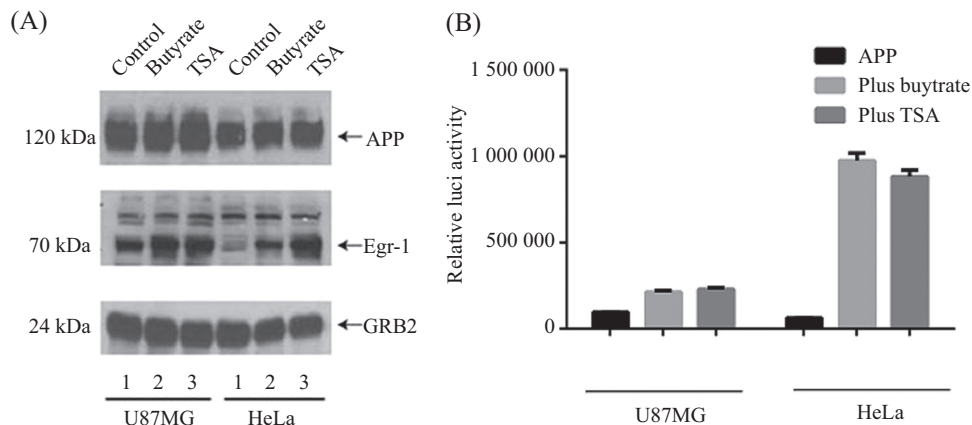
图5 Egr-1与APP启动子寡核苷酸片段结合的EMSA实验结果

Fig.5 The results of Egr-1 interacting with sequences within APP promoter demonstrated by EMSA

结合位点,且Egr-1能够直接与APP启动子区(-143到+118)结合。

### 2.4 Egr-1在APP启动子上的结合情况

凝胶迁移实验结果显示,Egr-1能与单链寡核苷酸探针特异性结合,并且随着Egr-1蛋白浓度的增加,结合的寡核苷酸片段的放射性也随之增强,二者之间有明显的量效关系;高浓度冷探针能够竞争性抑

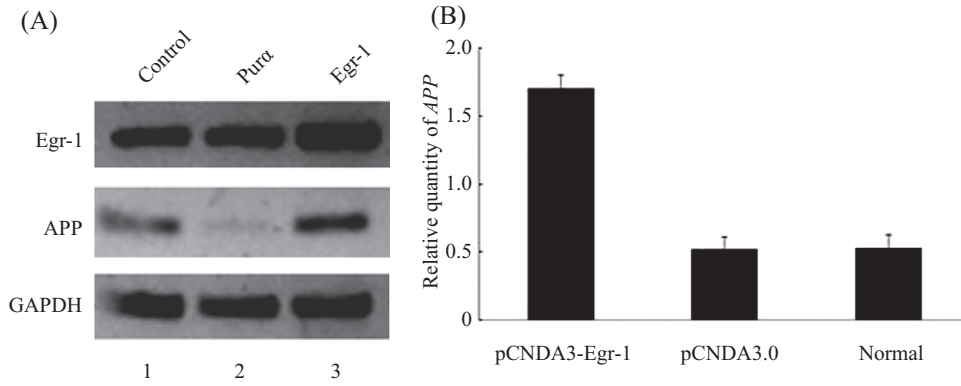


A: TSA和butyrate分别处理U87MG和HeLa细胞后的Western blot结果; B: TSA和butyrate分别处理U87MG和HeLa细胞后的荧光素酶实验结果。

A: Western blot results of U87MG and HeLa cells treated with butyrate and TSA; B: Luciferase assay results of U87MG and HeLa cells treated with butyrate and TSA.

图6 HDAC抑制剂对Egr-1和APP蛋白表达的影响

Fig.6 The effects of HDAC inhibitors on the expressions of Egr-1 and APP

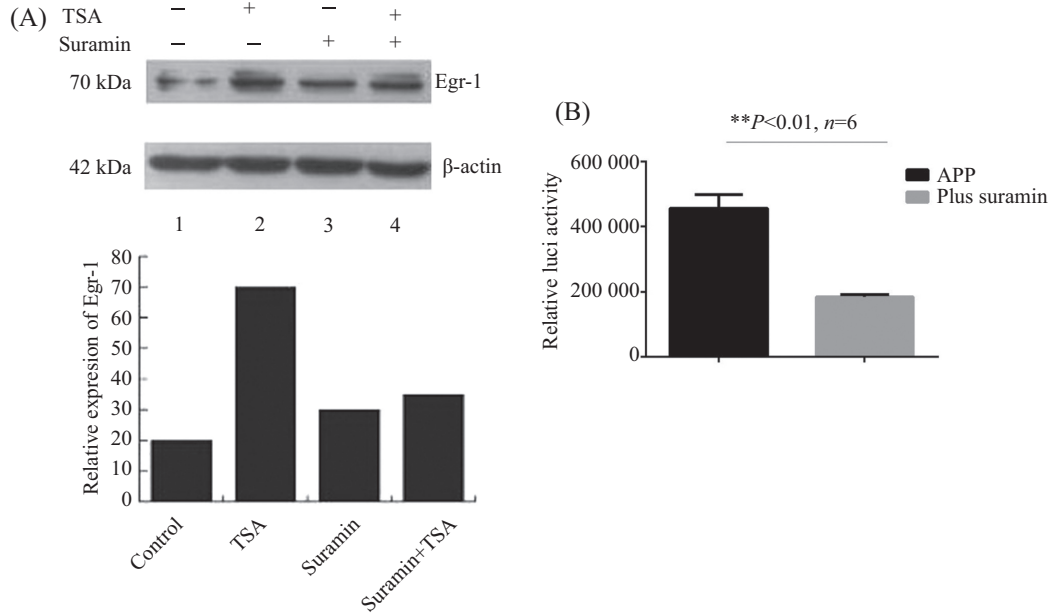


A: U87MG细胞分别转染pCDNA3.0、pCDNA3-Purα和pCDNA3-Egr-1真核表达质粒后的Western blot结果; B: U87MG细胞分别转染pCDNA3-Egr-1真核表达质粒以及pCDNA3.0的RT-PCR结果。

A: Western blot results of U87MG cells transfected with pCDNA3.0, pCDNA3-Purα and pCDNA3-Egr-1; B: RT-PCR assay of U87MG cells transfected with pCDNA3-Egr-1 and pCDNA3.0.

图7 过表达Egr-1对APP表达的影响

Fig.7 The effect of over expression of Egr-1 on APP expression



A: TSA和suramin处理U87MG后的Western blot结果; B: TSA和suramin处理U87MG后的荧光素酶实验结果。

A: Western blot results of U87MG cells treated with suramin and TSA; B: Luciferase assay results of U87MG cells treated with suramin and TSA.

图8 内源性Egr-1对APP表达的影响

Fig.8 The effect of endogenous Egr-1 on APP expression

制Egr-1与单链寡核苷酸探针的特异性结合;这种特异性结合能够被Egr-1抗体减弱;而非特异性的寡核苷酸并不能减弱Egr-1与单链寡核苷酸探针结合,这说明Egr-1与APP启动子的结合是特异的(图5)。进一步证明了Egr-1的结合位点位于APP启动子5'UTR区域。

## 2.5 Egr-1的表达对APP基因的影响

用HDAC抑制剂TSA和butyrate分别处理U87MG和HeLa细胞后,检测细胞中Egr-1和APP的

蛋白表达。结果表明,在U87MG和HeLa细胞中,TSA和butyrate可以促进内源性Egr-1的表达,并进一步引起APP的表达上调(图6A);在荧光素酶实验中,butyrate和TSA可以提高APP启动子的活性,但在HeLa细胞中这种作用更明显(图6B)。将U87MG细胞分别转染pCDNA3.0、pCDNA3-Purα和pCDNA3-Egr-1真核表达载体,Western blot提示Egr-1过表达可增加细胞内APP蛋白的表达(图7A);进行RT-PCR分析后,实验结果显示Egr-1过表达可以从基因水平上

调APP的表达(图7B)。Egr-1抑制因子suramin处理细胞后,内源性的Egr-1表达明显减少,并且可以逆转由TSA引起的内源性的Egr-1表达增加(图8A);同时,用suramin处理过的细胞转染APP启动子的报告基因后,APP启动子的活性也明显下降,说明内源性Egr-1的表达水平改变可以直接影响到APP基因的表达(图8B)。

### 3 讨论

APP是一种存在于体内的跨膜蛋白,其编码基因位于人类第21条染色体上,一般认为APP表达的增加可能会诱发A- $\beta$ 的产生和沉积,对AD病人病理学方面的改变有促进作用,并由此引发神经组织的损害和功能减退<sup>[16]</sup>。以往对APP的研究注重于APP的裂解和A- $\beta$ 的释放<sup>[17]</sup>,但是对影响APP表达的调控因子的作用机制知之甚少。目前,已知APP表达异常会引起病变,如唐氏愚型患者染色体含有3个APP基因拷贝,导致神经系统表现出早期的AD样改变<sup>[18]</sup>。有研究证明,在有些AD病人的大脑中的某些部位有APP的过度表达<sup>[19]</sup>,而在APP基因敲除的小鼠中表现为出生后的生长缺陷症状、活性减低、肌张力减弱、海马神经活性减弱并伴有发育迟滞的现象<sup>[8]</sup>,说明APP对神经系统的发育有着很重要的意义。

由于APP在AD病因学说的重要地位,研究APP基因表达的调控因子及其作用机制能够为人们深入地认识和防治AD提供帮助。本研究结果表明,Egr-1可以上调APP基因的表达,无论是在神经系统来源的细胞(如U87MG和U251MG细胞)或者是非神经系统来源的其他上皮细胞(如HEK293和HeLa细胞),Egr-1对APP的基因表达均有明显的上调作用。这种作用的机制在于Egr-1蛋白能结合到APP启动子5'UTR区域中的特殊部位,实验证实Egr-1是体内调节APP基因表达的一个重要的因子。

Egr-1是一种早期生长反应因子<sup>[20]</sup>,位于人的染色体5q23-q31部位,编码两个外显子,其DNA结合区含有3个Cys2\_His2构成的锌指样结构,其亚基常常优先结合于富含GC的区域<sup>[21]</sup>。最近有研究报道,当小鼠暴露于新的环境中,APP可以诱导Egr-1在小鼠大脑中的异位表达。同时发现,AD病人的APP蛋白对于涉及记忆形成的即早基因的异位调控有着重要的作用,APP可以通过在相应的基因启动子上抑制对CREB的募集和改善对HDAC2的重新募集来促进

小鼠前额叶低水平的Egr-1和c-fos的表达<sup>[22-23]</sup>。从另一个侧面展示了APP在神经系统里与Egr-1之间的相互作用,提示了Egr-1更为复杂的调作用以及APP蛋白在更深层次上的功能。

Egr-1依赖性基因表达涉及到Egr-1和越来越多的其他转录或调节因子功能上的协调(正协调或负协调),包括活化的T细胞的核因子(NFAT)、内固醇生成因子(SF-1)、AP2和糖皮质激素受体等<sup>[24]</sup>。由此可见,Egr-1并不是单独发挥作用,而是和其他转录因子一起发挥作用的,我们希望能寻找到Egr-1调控APP启动子的上游基因。通过对APP启动子序列的分析,发现在+63到+77部位,有符合Pur $\alpha$ 结合位点特征的序列(GGN)n。这个区域也是Egr-1与APP启动子结合的位点,我们以前的研究也曾经证实Pur $\alpha$ 蛋白,一种在进化过程中高度保守的调节蛋白,对APP的表达有着明显的负调控作用<sup>[25]</sup>。这种结构上的特异性和相同的结合位点也提示Pur $\alpha$ 可能与Egr-1存在竞争性结合,从而影响Egr-1对APP启动子的调控作用(待发表数据)。还有哪些调控因子、通过什么方式调节APP尚有待进一步研究。

### 参考文献 (References)

- 1 Saidlitz P, Voisin T, Vellas B, Payoux P, Gabelle A, Formaglio M, *et al.* Amyloid imaging in Alzheimer's disease: A literature review. *J Nutr Health Aging* 2014; 18(7): 723-40.
- 2 Theleritis C, Politis A, Siarkos K, Lyketsos CG. A review of neuroimaging findings of apathy in Alzheimer's disease. *Int Psychogeriatr* 2014; 26(2): 195-207.
- 3 Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997; 77(4): 1081-132.
- 4 Ohta M, Kitamoto T, Iwaki T, Ohgami T, Fukui M, Tateishi J. Immunohistochemical distribution of amyloid precursor protein during normal rat development. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 75(2): 51-61.
- 5 Lahiri DK, Ge YW. Role of the APP promoter in Alzheimer's disease: Cell type-specific expression of the beta-amyloid precursor protein. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1030: 310-6.
- 6 Neve RL, McPhie DL. Dysfunction of amyloid precursor protein signaling in neurons leads to DNA synthesis and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(4): 430-7.
- 7 Anliker B, Muller U. The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 2006; 3(4/5): 239-46.
- 8 Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, *et al.* beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 1995; 81(4): 525-31.
- 9 Lahiri DK, Ge YW, Maloney B. Characterization of the APP

- proximal promoter and 5'-untranslated regions: Identification of cell type-specific domains and implications in APP gene expression and Alzheimer's disease. *FASEB J* 2005; 19(6): 653-5.
- 10 Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, *et al.* A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 2001; 4(3): 289-96.
- 11 Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 2004; 304(5672): 839-43.
- 12 Lee JL. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 2008; 11(11): 1264-6.
- 13 Maddox SA, Monsey MS, Schafe GE. Early growth response gene 1 (Egr-1) is required for new and reactivated fear memories in the lateral amygdala. *Learn Mem* 2011; 18(1): 24-38.
- 14 Renbaum P, Beerli R, Gabai E, Amiel M, Gal M, Ehrenguber MU, *et al.* Egr-1 upregulates the Alzheimer's disease presenilin-2 gene in neuronal cells. *Gene* 2003; 318: 113-24.
- 15 Lu Y, Li T, Qureshi HY, Han D, Paudel HK. Early growth response 1 (Egr-1) regulates phosphorylation of microtubule-associated protein tau in mammalian brain. *J Biol Chem* 2011; 286(23): 20569-81.
- 16 Philibert KD, Marr RA, Norstrom EM, Glucksman MJ. Identification and characterization of Abeta peptide interactors in Alzheimer's disease by structural approaches. *Front Aging Neurosci* 2014; 6: 265.
- 17 Jung JI, Premraj S, Cruz PE, Ladd TB, Kwak Y, Koo EH, *et al.* Independent relationship between amyloid precursor protein (APP) dimerization and gamma-secretase processivity. *PLoS One* 2014; 9(10): e111553.
- 18 Rumble B, Retallack R, Hilbich C, Simms G, Multhaup G, Martins R, *et al.* Amyloid A4 protein and its precursor in Down's syndrome and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 1989; 320(22): 1446-52.
- 19 Johnson SA, McNeill T, Cordell B, Finch CE. Relation of neuronal APP-751/APP-695 mRNA ratio and neuritic plaque density in Alzheimer's disease. *Science* 1990; 248(4957): 854-7.
- 20 Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, *et al.* A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 1988; 53(1): 37-43.
- 21 Gashler A, Sukhatme VP. Early growth response protein 1 (Egr-1): Prototype of a zinc-finger family of transcription factor. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995; 50: 191-224.
- 22 Hendrickx A, Pierrot N, Tasiaux B, Schakman O, Brion JP, Kienlen-Campard P, *et al.* Epigenetic induction of EGR-1 expression by the amyloid precursor protein during exposure to novelty. *PLoS One* 2013; 8(9): e74305.
- 23 Hendrickx A, Pierrot N, Tasiaux B, Schakman O, Kienlen-Campard P, de Smet C, *et al.* Epigenetic regulations of immediate early genes expression involved in memory formation by the amyloid precursor protein of Alzheimer disease. *PLoS One* 2014; 9(6): e99467.
- 24 Fu M, Zhu X, Zhang J, Liang J, Lin Y, Zhao L, *et al.* Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 2003; 315: 33-41.
- 25 Darbinian N, Cui J, Basile A, Del Valle L, Otte J, Miklossy J, *et al.* Negative regulation of AbetaPP gene expression by pur-alpha. *J Alzheimers Dis* 2008; 15(1): 71-82.