

C/EBP β 对APP基因的表达式调控作用的研究

柴娟¹ 李永玲² 芦晓红² 张茜² 马琳¹ Huichen Wang³ 孙涛¹ 崔建奇^{1,2*}

(¹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; ²宁夏医科大学基础医学院, 银川

750004; ³美国艾莫里大学Winship肿瘤研究所, 放射肿瘤学研究室, 亚特兰大 30322, 美国)

摘要 该研究成功地构建了C/EBP β 过表达慢病毒载体, 在体外人胚肾细胞(HEK293FT)进行病毒包装并感染小鼠海马神经元细胞(HT22)。通过荧光素酶报告基因实验(luciferase assay)检测C/EBP β 对淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)启动子活性的影响; 通过实时荧光定量PCR(Q-PCR)来检测C/EBP β 对APP和Sp1在转录水平上的表达; 通过蛋白免疫印迹分析(Western blot assay)检测C/EBP β 对APP和Sp1蛋白表达的作用。萤火虫荧光素酶分析结果显示, C/EBP β 对APP启动子的表达有正调控作用; Western blot和Q-PCR分析的结果表明, C/EBP β 对APP和Sp1基因的表达有正调控作用。C/EBP β 对APP基因表达的调控作用的机制可能在于C/EBP β 上调了内源性转录因子Sp1的基因表达, 而Sp1基因表达的增强直接导致了APP基因表达的上调。

关键词 C/EBP β ; 淀粉样前体蛋白; 阿尔茨海默病; Sp1; 基因表达调控

Effects of C/EBP β on APP Gene Expression

Chai Juan¹, Li Yongling², Lu Xiaohong², Zhang Qian², Ma Lin¹, Huichen Wang³, Sun Tao¹, Cui Jianqi^{1,2*}

(¹Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, the Incubation Base of National Key Laboratory;

²School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

³Department of Radiative Oncology, Winship Cancer Institute, Emory University, Atlanta 30322, USA)

Abstract The C/EBP β lentivirus expression vector was successfully constructed and the viron was packaged by virus packaging kit in HEK293FT cells. Rat hippocampus neuron (HT22) was infected with the packaged viron for the study. The luciferase assay was performed to evaluate the effects of C/EBP β on APP promoter activities; the effects of C/EBP β on amyloid precursor protein (APP) and Sp1 gene expression were estimated with Q-PCR and Western blot. The results of luciferase assay demonstrated that C/EBP β could up-regulate APP promoter activities, and the results of Q-PCR and Western blot confirmed that C/EBP β could increase APP and Sp1 gene expressions both in transcriptional and translational levels. The possible mechanism for C/EBP β to upregulate APP gene expression may lie in C/EBP β facilitating the endogenous Sp1 gene expression, and the increasing expression of Sp1 directly promotes the APP gene expression.

Keywords C/EBP β ; amyloid precursor protein; Alzheimer's disease; Sp1; regulation of gene expression

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的一个明显病理特征是纤维状的淀粉样 β 蛋白多肽(amyloid

β , A β)在神经组织中的沉积, 而这些A β 则来源于淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的异

收稿日期: 2014-12-30 接受日期: 2015-02-04

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

*通讯作者。Tel: 0951-6880697, E-mail: jianqi@yahoo.com

Received: December 30, 2014 Accepted: February 4, 2015

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

*Corresponding author. Tel: +86-951-6880697, E-mail: jianqi@yahoo.com

网络出版时间: 2015-04-07 11:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150407.1148.003.html>

常裂解^[1]。APP在AD的发病过程中扮演着极为重要的角色。有研究报导认为, APP表达的增加可能会对AD的病理发展有促进作用^[2-3], 并由此引起神经组织的损害^[4]。先前的研究表明, APP是一种广泛表达的跨膜蛋白, 在整个进化过程中极为保守, 而且与突触形成的关系非常密切^[5]。在鼠体内, APP表达的最高水平出现在小鼠胚胎第二周, 而这个时期正是突触形成的高峰时期, 此后其表达水平逐渐下降, 并以成年时期最低。APP有多种异构体形式, 许多研究表明, 在哺乳动物的神经系统中, 这些异构体的表达形式并不是均一的^[1]。大多数对于APP的研究都集中在A β 对神经系统的毒害作用^[6-7], 而较少关注APP基本的生物学功能以及它在神经系统发育过程中的作用^[1]。体外研究已经证实, APP能促进神经突触的生长和突触形成, 调节神经兴奋性和突触可塑性, 并且能保护神经元免于氧化应激的损害。

CCAAT-增强子结合蛋白(CCAAT enhancer binding proteins β , C/EBP β)是转录因子C/EBPs家族的重要成员^[8]。在神经细胞中, 有多个信号通路可以激活C/EBP β : 与损伤再生有关的MEK-ERK途径^[9]、与感觉神经元轴突再生有关的JAK-STAT通路^[10]以及CAMP级联通路等^[10]。C/EBP β 在小鼠神经元细胞中广泛表达, 参与大鼠海马区突触可塑性, 在基因转录中也有重要作用, 并且参与轴突受损后的再生^[11-12]。C/EBP β 可促进胚胎小鼠皮层中祖细胞分化成神经细胞^[13], 在小鼠神经细胞瘤中过表达C/EBP β 能诱导神经元分化^[14]。C/EBP β 在神经系统中的作用越来越受到重视, 尤其是在阿尔茨海默病的发病过程中所扮演的角色不能忽视。有研究发现, 淀粉样前体蛋白可通过C/EBP同源蛋白所倡导的通路促进内质网应激而导致细胞的死亡^[15]。炎症反应在AD的发病过程中起着重要的作用, 有研究发现, 炎症刺激因子、白介素1 β 、肿瘤坏死因子 α 、人艾滋病病毒(HIV-1)以及脂多糖均可引起C/EBP β 在星形胶质细胞中的表达。在阿尔茨海默病、帕金森氏病和与艾滋病有关的痴呆病人大脑的星形胶质细胞中均检测到了C/EBP β 的表达^[16], 说明C/EBP β 参与了神经组织的炎症反应, 与神经组织的退行性病变的发生有关系, 这其中也包括阿尔茨海默病, 因为已有大量的实验数据证实炎症反应与AD的发生有关。

本研究旨在探讨转录因子C/EBP β 对APP基因表达调控的作用机制及其对APP启动子转录活性的

影响, 进一步探讨其在AD发病过程中的作用, 为AD的预防和治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

pGL3 basic质粒购自美国Promega公司; pGL3-APP170/147由本实验室购建^[38]; pCDH-EF1-MCS-T2A-CopGFP购自美国SBI公司; 人胚肾细胞293FT (human embryonic kidney 293FT, HEK293FT)和人胶质瘤细胞(U87MG)为本实验室所保存; 小鼠海马神经元细胞(HT22)购自广州吉尼欧公司; 包装病毒载体及试剂购于SBI公司; C/EBP β 、Sp1和GAPDH抗体购于美国Abcam公司; APP抗体购自Millipore公司; 荧光二抗购自LI-COR公司; 报告基因检测系统试剂盒购于美国Promega公司。

1.2 构建pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP-C/EBP β 慢病毒过表达载体

利用PCR技术以pCDNA3-C/EBP β 为模板, 用高保真PCR试剂盒(pfu PCR polymerase)对目的基因C/EBP β 进行扩增(引物见表1), 将扩增得到的DNA片段纯化, 用限制性内切酶BamH I和EcoR I进行双酶切, 回收酶切片段, 亚克隆到用同样内切酶酶切的pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP载体上, 构建C/EBP β 慢病毒过表达载体pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP-C/EBP β 。

1.3 包装病毒

病毒的包装按SBI公司的病毒包装试剂盒说明书进行。简言之, 将构建好的C/EBP β 过表达慢病毒载体转染到HEK293FT细胞中, 24 h后更换新鲜培养基, 继续培养48 h、72 h后分别收集病毒液。将病毒液与PEG-it混合, 冷冻过夜, 1 500 $\times$ g离心30 min, 对病毒液进行浓缩, 重悬病毒颗粒并分装, 保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱中备用。

1.4 荧光素酶报告基因实验(Luciferase assay)

将C/EBP β 真核表达载体pCDNA3-C/EBP β 与APP报告质粒pGL3APP170/147共转染到U87MG细胞中, 对照组用pCDNA3空载体替换pCDNA3-C/EBP β , 培养48 h后弃去培养液, 用预冷的PBS轻轻地洗涤细胞2次, 加入100 μ L(6孔板)1 $\times$ 裂解液裂解细胞, 12 000 $\times$ g离心15 min。室温条件下, 吸取50 μ L上清加入到96孔板中。设置自动进样器2和3, 分别加入50 μ L Luciferase Assay Substrate和Stop & Glo[®]试剂, 用

表1 本文所用的引物

Table 1 The primers used in this article

引物 Primer	序列 Sequence	用途 Usage
Primer1-F	5'-CCG GAA TTC ATG CAC CGC CTG CTG GCC-3'	Constructed <i>C/EBPβ</i> overexpression plasma
Primer1-R	5'-CGC GGA TTC CTA GCA GTG GCC CGC CGA-3'	Constructed <i>C/EBPβ</i> overexpression plasma
Primer2-F	5'-AGC GAC GAG TAC AAG ATC-3'	Q-PCR for <i>C/EBPβ</i>
Primer2-R	5'-AGC TGC TTG AAC AAG TTC-3'	Q-PCR for <i>C/EBPβ</i>
Primer3-F	5'-TCG CCT TCC TAC CAA GAT-3'	Q-PCR for <i>Sp1</i>
Primer3-R	5'-ATT ATT GCC ACC AA TCC TT-3'	Q-PCR for <i>Sp1</i>
Primer4-F	5'-ATT CTT ACA CCA GGA GAG-3'	Q-PCR for <i>APP</i>
Primer4-R	5'-GAA TCC ACA TTG TCA CTT-3'	Q-PCR for <i>APP</i>

Centro LB 960进行测定,实验采用美国Promega公司生产的Dual-Glo® Luciferase Assay System进行萤火虫荧光素酶活性测定,用Renilla作为内参来校正转染效率。

1.5 实时定量荧光PCR(Q-PCR)

将包装成功的*C/EBP β* 过表达病毒和空载体病毒感染HT22细胞,培养48 h后用Trizol法提取细胞总RNA,用Nanodrop分光光度仪检测RNA浓度,当 $D_{260/280}$ 在2.0左右时进行实验,用Thermo逆转录和荧光Mix进行反转录和Q-PCR,用CFX96™ Real-time System检测各因子在mRNA水平上的表达。PCR反应所用的引物见表1,用*GAPDH*作为内参。

1.6 蛋白免疫印迹(Western blot)

将包装成功的*C/EBP β* 过表达病毒和空载体病毒感染HT22细胞,培养48 h后提取细胞蛋白,用凯基试剂测蛋白浓度。取40 μ g总蛋白进行聚丙烯酰胺

凝胶电泳,电泳结束后进行转膜,5%脱脂牛奶封闭,一抗孵育过夜,TBST洗膜5次,每次5 min,然后加入相应的二抗,室温下孵育70 min,TBST洗膜5次,用ODYSSEY CLx进行检测。一抗比例1:1 000,内参*GAPDH*比例1:5 000,荧光二抗比例1:8 000。

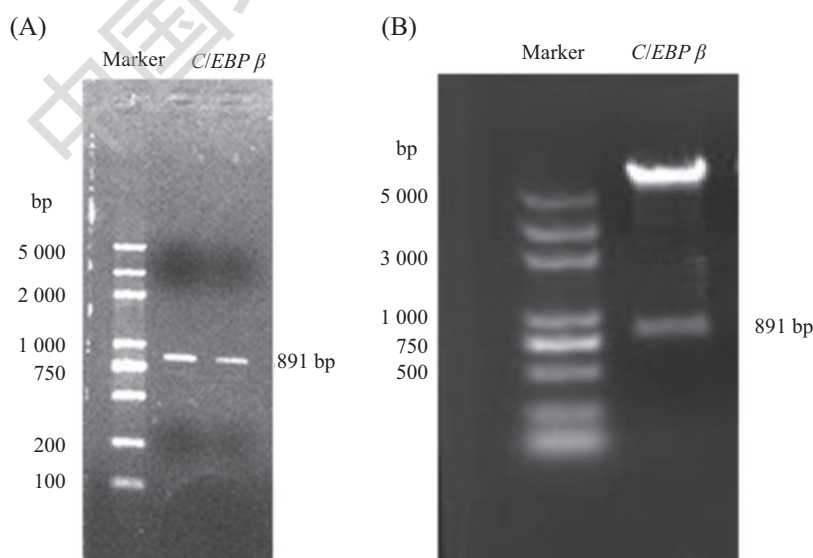
1.7 统计学分析

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用SPSS 20.0软件进行统计学处理,采用单因素方差分析,多组间比较用LSD法进行均数间的两两比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,实验均重复3次以上。

2 结果

2.1 成功构建PCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP-C/*EBP β* 过表达慢病毒载体

通过PCR技术和亚克隆技术成功构建了*C/EBP β*



A: PCR扩增*C/EBP β* 全长基因(891 bp)结果; B: PCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP-C/*EBP β* 过表达慢病毒载体双酶切鉴定结果。

A: the results of amplified *C/EBP β* full length gene (891 bp) with PCR; B: identification of the overexpression lentivirus construct pCDH-EF1-T2A-copGFP-C/*EBP β* with *EcoR* I and *Bam*HI cutting.

图1 pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP-C/*EBP β* 质粒构建及鉴定结果

Fig.1 Construction and identification of pCDH-EF1-MCS-T2A-copGFP-C/*EBP β* plasmid

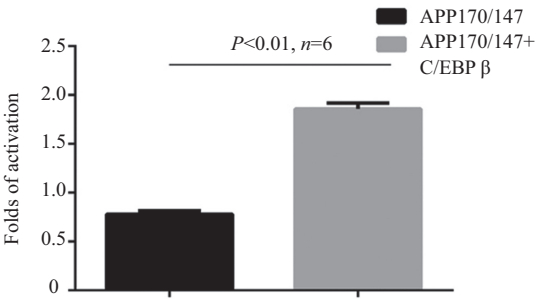


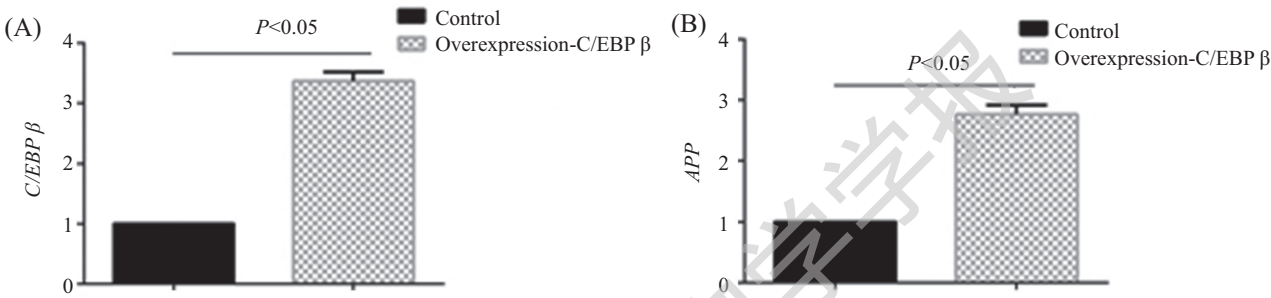
图2 U87MG细胞中*C/EBP β*对pGL3- APP170/147 启动子活性的影响

Fig.2 The effects of *C/EBP β* on APP promoter activities when co-transfected into U87 MG cells

慢病毒过表达载体, 经酶切鉴定与原设计一致(图1), 并将构建好的质粒同时进行测序分析, 以作进一步鉴定。

2.2 荧光素酶报告基因实验

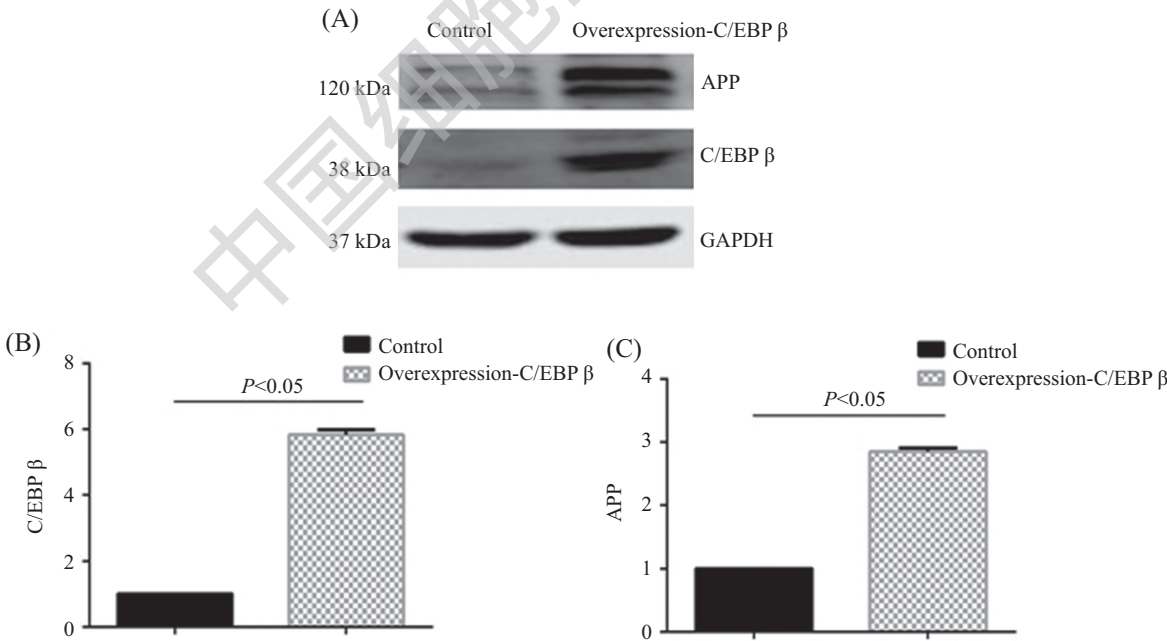
将荧光素酶报告质粒pGL3-APP170/147质粒与或不与*C/EBP β*真核表达载体同时共转染U87MG细胞, 48 h后收集细胞, 测定荧光素酶活性。结果显示, 与对照组相比, 包含*APP*启动子-170到+147序列的pGL3-APP170/147质粒其启动子活性可以被*C/EBP β*上调(图2)。



A: Q-PCR检测*C/EBP β*过表达; B: *C/EBP β*过表达对*APP*基因表达的影响。
A: Q-PCR results of overexpression of *C/EBP β*; B: Q-PCR results of *APP* expression when *C/EBP β* was overexpressed.

图3 *C/EBP β*过表达在转录水平上对*APP*基因表达的影响

Fig.3 The effects of *C/EBP β* overexpression on *APP* gene expression in transcriptional level

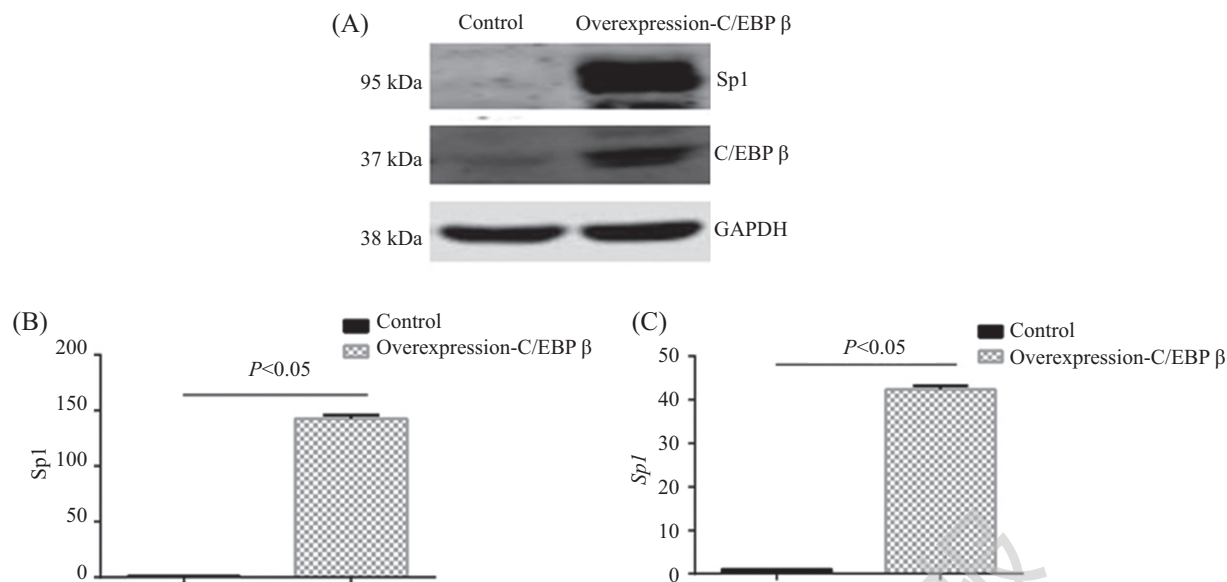


A: 蛋白免疫印迹分析检测*C/EBP β*过表达对*APP*基因表达的作用; B: *C/EBP β*蛋白印迹分析结果的统计分析; C: *APP*蛋白印迹分析结果的统计分析。与对照组相比, *C/EBP β*过表达对*APP*蛋白表达有明显的促进作用。

A: the effects of *C/EBP β* overexpression on *APP* gene expression evaluated with Western blot; B: statistical analysis of Western blot results for *C/EBP β*; C: statistical analysis of Western blot results for *APP*. The results demonstrated that compared with the control group, overexpression of *C/EBP β* could dramatically promote *APP* expression.

图4 *C/EBP β*过表达对*APP*蛋白表达的影响

Fig.4 The effects of *C/EBP β* overexpression on *APP* expression



A: 蛋白免疫印迹分析检测C/EBP β过表达对内源性Sp1基因表达的作用; B: Sp1蛋白免疫印迹分析统计结果; C: Q-PCR检测C/EBP β在转录水平上对Sp1基因表达的影响。

A: the effects of C/EBP β overexpression on endogenous Sp1 gene expression evaluated with Western blot; B: statistical analysis results of Western blot assay; C: the results of Q-PCR for the effects of C/EBP β overexpression on Sp1 gene expression in transcriptional level.

图5 C/EBP β过表达对内源性Sp1基因表达的影响

Fig.5 The effects of C/EBP β overexpression on endogenous Sp1 gene expression

2.3 实时定量荧光PCR实验(Q-PCR)

为了进一步确定C/EBP β在转录水平上对APP基因表达的调控作用,我们用包装好的C/EBP β病毒感染HT22细胞,然后提取细胞总RNA,通过Q-PCR实验检测C/EBP β与APP基因在转录水平上的表达。实验结果显示, C/EBP β过表达对APP基因在转录水平上有上调作用(图3)。

2.4 蛋白免疫印迹

将包装好的C/EBP β过表达病毒和空载体病毒感染HT22细胞, 48 h后提取蛋白质进行常规Western blot, 检测细胞中C/EBP β和APP蛋白的表达。结果表明, C/EBP β对APP蛋白的表达有很强的正调控作用(图4)。

2.5 C/EBP β过表达对Sp1基因表达的影响

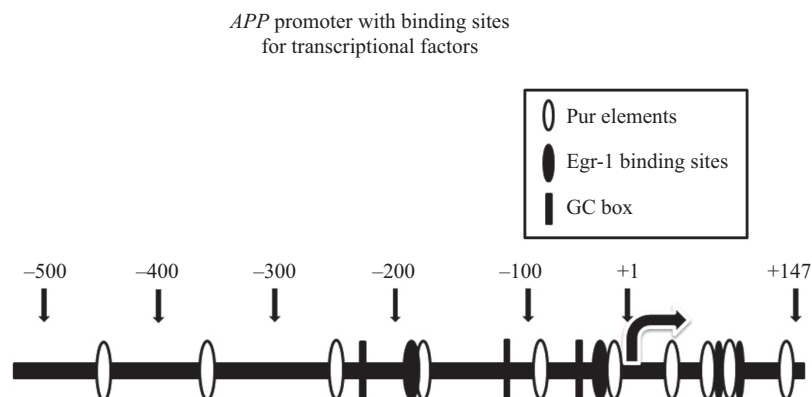
将包装好的C/EBP β慢病毒以及对照的空载体病毒感染小鼠海马神经元细胞HT22, 48 h后收获细胞, 分别提取细胞总RNA和细胞总蛋白, 进行Q-PCR和蛋白免疫印迹分析以检测C/EBP β过表达对细胞内Sp1基因表达的影响。结果表明, C/EBP β过表达可以明显上调细胞内Sp1基因的表达水平(图5)。

3 讨论

Aβ在脑组织中的沉积被认为是导致AD发生的

一个重要的因素。一般认为, 更好地理解多肽的形成机制, 对于开发新的治疗AD的方法具有重要的意义。长期以来, 人们所关注的是Aβ产生的机制。Aβ在很大程度上来源于其前体蛋白APP的异常水解, 决定这一环节的是APP分泌酶(APP secretase)的活性; 而另一个关注的焦点则是与APP的合成有关, 究竟是什么因素可以使APP的合成增加。有文献报导, APP的表达异常与AD的发生有着很密切的关系。Rumble等^[17]的研究发现, 唐氏综合征患者的染色体中含有额外的APP基因拷贝, 在其神经系统中出现了早期AD样改变。Johnson等^[18]的研究发现, 在有些AD病人的大脑中, 某些部位有APP的过度表达。所有这些都说明, APP的表达水平与AD的发生有着密切的关系。

APP是一种由695个氨基酸组成的跨膜磷酸化蛋白, 在经过一系列的蛋白酶水解之后, 形成了42~43个氨基酸组成的多肽, 这种渐进性的水解受淀粉蛋白前β位分解酶1(β-site APP-cleaving enzyme 1, BACE1)和γ-分泌酶复合物的调节。γ-分泌酶的活性是早老素依赖性的。Aβ形成后对大脑神经组织的损伤作用是一个复杂的过程, 它可以诱发和加剧其他神经毒性因子的作用, 形成一种级联反应, 进而加剧对神经组织的损伤^[19]。Hattori等^[20]曾报导过



图中可见有多种转录因子结合位点, GC box即为转录因子Sp1的结合位点。

There are many different binding sites for diverse transcriptional factors such as GC box, a specific binding site for transcriptional factor Sp1.

图6 APP启动子近端结构示意图

Fig.6 Schematic diagram of the characteristics of proximal APP promoter

APP的启动子序列为9 147 bp(-9000/+147)。Lahiri等^[6]曾详细地研究了APP启动子的活性区域,认为近端约200 bp部位含有最基本的维持启动子功能的元件。迄今为止,研究发现,对APP启动子有正调控作用的因子包括生长因子和炎症前细胞因子(如NGF、bFGF和IL-1)。Goldgaber等^[21]、Lahiri等^[22]和Ge等^[23]曾报导过这些因子可以促进APP基因的转录和表达。我们最近的研究也发现,早期生长反应因子-1(early growth responsive factor, Egr-1)可以上调APP基因的表达,因为它可以结合到APP启动子5'UTR上的特殊结合位点上^[38]。而另外一些因子如Pur α ,则对APP的表达有负调控作用^[24]。本实验的结果首次发现, C/EBP β 对APP基因表达有很强的正调控作用。Luciferase assay结果证实, C/EBP β 过表达可上调APP启动子的活性, Q-PCR和Western blot结果分别确定了C/EBP β 在转录和翻译水平上对APP基因表达的正调控作用,目前尚未见类似的报导。

CCAAT-增强子结合蛋白(CCAAT enhancer binding protein, C/EBP)家族是碱性亮氨酸拉链蛋白家族的一个亚家族,其家族成员包括C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 和C/EBP ζ 等蛋白^[25]。C/EBP家族成员的共同特征是其蛋白质分子包含3个相似的结构组分: C末端的亮氨酸拉链、N末端的转录激活域和中间的DNA结合域^[26]。C/EBP β 是C/EBP家族中最受关注的成员,它有多种生物学功能,可以调控多种细胞的分化,尤其是神经元细胞的分化^[2,13],参与肝脏的再生^[27]与能量代谢^[28],并参与炎症反应^[16,29],与肿瘤的发生与调控^[30-31]以及病毒的转录^[32]都有关系,其功能非常广泛。近来的研究

发现, C/EBP β 与AD的发生有着密切的关系。Takahashi等^[15]研究发现, C/EBP同源蛋白介导的通路参与了APP所引起的内质网应激所导致的细胞死亡, KO等^[33]报导糖元合成酶激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)在星状细胞中介导的C/EBP δ 的磷酸化可以促进小胶质细胞/巨噬细胞的迁移和活化。Strohmeier等^[34]的研究发现, C/EBP β 在AD病人大脑皮质中的表达与非痴呆性老年人(nondemented elderly, ND)相比明显增高。综上所述, C/EBP β 有助于调节炎症因子以及一些与能量代谢有关的关键蛋白的表达。炎症因子可以在啮齿类动物的星状细胞和小胶质细胞中诱导C/EBP β 的表达,说明C/EBP β 与AD的发生和形成有着一定的关系。所以,研究C/EBP β 对APP基因表达的调控则更有实际的意义,对于理解其在AD形成过程中的作用机制是十分必要的。

C/EBP β 作为转录因子作用于顺式反应元件,可以与位于启动子上的CAAT盒结合从而对所调控的基因进行转录调控。有趣的是, APP启动子上缺乏CAAT盒,而我们的实验结果表明, C/EBP β 仍然对其有着很明显的上调作用,这说明可能存在着其他的调控机制。通过对APP启动子的序列进行分析后发现,其近端存在有大量的GC盒(图6),这些正是转录因子Sp1的结合位点,而Sp1则是APP启动子的正调控因子,这在以前的文献中已经有过报导^[2,35]。于是,我们推测Sp1极有可能参与了C/EBP β 对APP基因表达的调控作用。免疫印迹分析和实时荧光定量PCR的结果均表明, C/EBP β 过表达能引起细胞内Sp1的表达水平显著增加,说明C/EBP β 有可能上调Sp1的

表达, 从而实现对*APP*基因表达的正调控作用。*C/EBP β*与*Sp1*协同作用调控某些特殊基因的表达已经有很多的文献报导, 如Payton等^[36]曾报导*C/EBP β*与*Sp1*协同调控人还原叶酸载体启动子*C*(human reduced folate carrier promoter *C*)的转录活性; Foti等^[37]研究发现了一种核蛋白复合物含有*Sp1*、*C/EBP β*和高泳动组分基因家族(high mobility group, HMG)I-Y, 调控着人胰岛素受体基因的转录活性。这些结果都提示, *Sp1*和*C/EBP β*在基因表达调控方面有着协同作用。综合以上分析, 我们推测*C/EBP β*对*APP*基因表达的上调作用可能在于其能促进内源性*Sp1*基因的表达, 而*Sp1*则通过与*APP*基因启动子近端GC盒的结合, 促进了*APP*基因的转录和表达。这对于研究AD的发病机制, 尤其是作为具有广泛调控作用的*C/EBP β*来说, 有着重要的意义。当然, 作为转录调控这么一个复杂的过程, 其内在的机制远远不是我们所能想象的那么简单, 其更深层次的调控机制仍然有待于进一步的研究。

参考文献 (References)

- Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997; 77(4): 1081-132.
- Yu HT, Chan WW, Chai KH, Lee CW, Chang RC, Yu MS, *et al.* Transcriptional regulation of human FE65, a ligand of Alzheimer's disease amyloid precursor protein, by *Sp1*. *J Cell Biochem* 2010; 109(4): 782-93.
- Lee S, Das HK. Transcriptional regulation of the presenilin-1 gene controls gamma-secretase activity. *Front Biosci (Elite Ed)* 2010; 2: 22-35.
- Adlard PA, Tran BA, Finkelstein DI, Desmond PM, Johnston LA, Bush AI, *et al.* A review of beta-amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease. *Front Neurosci* 2014; 8: 327.
- 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): 151-61.
- 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.
- 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.
- Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation. *Biochem J* 2002; 365(Pt 3): 561-75.
- Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, Fainzilber M. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 2005; 45(5): 715-26.
- Jiang JG, Zarnegar R. A novel transcriptional regulatory region within the core promoter of the hepatocyte growth factor gene is responsible for its inducibility by cytokines via the *C/EBP* family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 1997; 17(10): 5758-70.
- Nadeau S, Hein P, Fernandes KJ, Peterson AC, Miller FD. A transcriptional role for *C/EBP beta* in the neuronal response to axonal injury. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29(4): 525-35.
- Yukawa K, Tanaka T, Tsuji S, Akira S. Expressions of CCAAT/Enhancer-binding proteins beta and delta and their activities are intensified by cAMP signaling as well as Ca^{2+} /calmodulin kinases activation in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 1998; 273(47): 31345-51.
- Menard C, Hein P, Paquin A, Savelson A, Yang XM, Lederfein D, *et al.* An essential role for a MEK-*C/EBP* pathway during growth factor-regulated cortical neurogenesis. *Neuron* 2002; 36(4): 597-610.
- Cortes-Canteli M, Pignatelli M, Santos A, Perez-Castillo A. CCAAT/enhancer-binding protein beta plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277(7): 5460-7.
- Takahashi K, Niidome T, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H. Amyloid precursor protein promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell death via *C/EBP* homologous protein-mediated pathway. *J Neurochem* 2009; 109(5): 1324-37.
- Fields J, Ghorpade A. *C/EBP beta* regulates multiple IL-1beta-induced human astrocyte inflammatory genes. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 177.
- 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. *New Engl J Med* 1989; 320(22): 1446-52.
- 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.
- Cummings JL. Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 2004; 351(1): 56-67.
- Hattori M, Tsukahara F, Furuhashi Y, Tanahashi H, Hirose M, Saito M, *et al.* A novel method for making nested deletions and its Application for sequencing of a 300 kb region of human *APP* locus. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(9): 1802-8.
- Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, *et al.* Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(19): 7606-10.
- Lahiri DK, Nall C. Promoter activity of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 32(2): 233-40.
- Ge YW, Lahiri DK. Regulation of promoter activity of the *APP* gene by cytokines and growth factors: Implications in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 463-7.
- 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.
- Tsukada J, Yoshida Y, Kominato Y, Auron PE. The CCAAT/enhancer (*C/EBP*) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 2011; 54(1): 6-19.
- Nerlov C. The *C/EBP* family of transcription factors: A paradigm for interaction between gene expression and proliferation control.

- Trends Cell Biol 2007; 17(7): 318-24.
- 27 Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, Peng Y, Ciliberto G, Poli V, *et al.* CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998; 102(5): 996-1007.
- 28 Millward CA, Heaney JD, Sinasac DS, Chu EC, Bederman IR, Gilge DA, *et al.* Mice with a deletion in the gene for CCAAT/enhancer-binding protein beta are protected against diet-induced obesity. *Diabetes* 2007; 56(1): 161-7.
- 29 Hayakawa K, Nakajima S, Hiramatsu N, Okamura M, Huang T, Saito Y, *et al.* ER stress depresses NF-kappaB activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(1): 73-81.
- 30 Shimizu Y, Kishimoto T, Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, *et al.* CCAAT/enhancer binding protein-beta promotes the survival of intravascular rat pancreatic tumor cells via antiapoptotic effects. *Cancer Sci* 2007; 98(11): 1706-13.
- 31 Wang Y, Sun DQ, Liu DG. Tumor suppression by RNA from C/EBP beta 3'UTR through the inhibition of protein kinase Cepsilon activity. *PLoS One* 2011; 6(1): e16543.
- 32 Romagnoli L, Wollebo HS, Deshmane SL, Mukerjee R, Del Valle L, Safak M, *et al.* Modulation of JC virus transcription by C/EBPbeta. *Virus Res* 2009; 146(1/2): 97-106.
- 33 Ko CY, Wang WL, Wang SM, Chu YY, Chang WC, Wang JM. Glycogen synthase kinase-3beta-mediated CCAAT/enhancer-binding protein delta phosphorylation in astrocytes promotes migration and activation of microglia/macrophages. *Neurobiol Aging* 2014; 35(1): 24-34.
- 34 Strohmeyer R, Shelton J, Loughheed C, Breitkopf T. CCAAT-enhancer binding protein-beta expression and elevation in Alzheimer's disease and microglial cell cultures. *PLoS One* 2014; 9(1): e86617.
- 35 Izumi R, Yamada T, Yoshikai S, Sasaki H, Hattori M, Sakaki Y. Positive and negative regulatory elements for the expression of the Alzheimer's disease amyloid precursor-encoding gene in mouse. *Gene* 1992; 112(2): 189-95.
- 36 Payton SG, Whetstone JR, Ge Y, Matherly LH. Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier promoter C: Synergistic transactivation by Sp1 and C/EBP beta and identification of a downstream repressor. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1727(1): 45-57.
- 37 Foti D, Iuliano R, Chiefari E, Brunetti A. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol Cell Biol* 2003; 23(8): 2720-32.
- 38 马琳, 周瑜, 李永玲, 柴娟, 贾中发, 郭克, 等. Egr-1对APP基因表达的调控作用. 中国细胞生物学学报(Ma Lin, Zhou Yu, Li Yongling, Chai Juan, Jia Zhongfa, Guo Ke, *et al.* Regulatory effects of Egr-1 on APP gene expression. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(1): 39-46.