

转录因子 ETS1 与 LEF1 协同下调在早产儿支气管肺发育不良疾病中的研究



扫码阅读电子版

杨敏 陈艳萍

湖南省儿童医院呼吸二科, 长沙 410007

通信作者: 陈艳萍, Email: hnchengyanping@163.com

【摘要】 目的 探讨血管新生相关转录因子 ETS1 与 LEF1 在早产儿支气管肺发育不良 (BPD) 发生、发展中的作用。方法 对来自 Gene Expression Omnibus 公共数据库的早产儿血液样本表达谱芯片数据进行分析, 比较 ETS1、LEF1 和基质金属蛋白酶基因 (MMPs) 在 BPD 与非 BPD 以及不同疾病严重程度 BPD 中的表达情况; 并分析这些基因表达的相关性。结果 与非 BPD 组早产儿相比, 转录因子 ETS1 与 LEF1 表达量在 BPD 早产儿中均显著降低, 且疾病越严重表达量越低, 出生周龄越大表达量越高。ETS1 与 LEF1 表达有相关性 ($r = 0.921$, $P < 0.001$)。MMP1、MMP2、MMP7 以及 MMP13 在早产儿中表达量均较低, MMP9 表达量随 BPD 严重程度增加而升高。结论 在早产儿中转录因子 ETS1 与 LEF1 表达下调与 BPD 疾病具有相关性。BPD 发病机制可能是 ETS1 与 LEF1 协同下调表达以及早产儿中低水平表达的 MMPs 共同阻碍了血管内皮细胞的增殖和迁移, 进而导致了 BPD 的病变基础即肺泡和肺血管发育不良。

【关键词】 婴儿, 早产; 支气管肺发育不良; ETS1; LEF1

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.04.008

The synergistic effect of transcription factor ETS1, LEF1 in bronchopulmonary dysplasia development

Yang Min, Chen Yanping

The Second Department of Respiratory Medicine, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China

Corresponding author: Chen Yanping, Email: hnchengyanping@163.com

【Abstract】 Objective The aim of this study was to investigate the function of angiogenesis related transcriptional factors ETS1, LEF1 in development of bronchopulmonary dysplasia. **Methods** A gene expression dataset of preterm infant published in Gene Expression Omnibus database. The expression values of ETS1, LEF1 and matrix metalloproteinase (MMPs) in BPD and no BPD samples were compared and the correlation analysis of these genes was performed. The possible mechanism of ETS1 and LEF1 to participate in the development of BPD via the regulation of MMPs was discussed. **Results** Expression levels of ETS1 and LEF1 were significantly downregulated in BPD samples and related with the severity of BPD and its complication retinopathy of prematurity. The expression of ETS1 and LEF1 had a good fitting rate ($r = 0.921$, $P < 0.001$). **Conclusions** The down regulation of ETS1 and LEF1 at least in part related with BPD development. The potential mechanism would be synergism downregulation of ETS1 and LEF1 attenuated the expression and function of MMPs, which may affect the migration and proliferation of vascular endothelial cell. It also leads to the lesion basis of BPD, the dysplasia of alveoli and pulmonary vessels.

【Key words】 Infant, premature; Bronchopulmonary dysplasia; ETS1; LEF1

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-436X.2019.04.008

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是目前早产儿最为常见和棘手的

慢性疾病之一。随着新生儿重症监护技术的发展, 极低体质量早产儿存活率提高的同时, BPD 的发

病率也在升高^[1]。BPD 的发生可能与遗传易感、氧化应激、炎症反应、机械通气气压损伤等因素相关^[2]。BPD 的病理特征为严重的肺泡和血管发育不良，参与其中的分子机制仍然不十分明确。研究表明，血管新生相关的基因的改变参与 BPD 的发生和发展过程^[3-5]。笔者对早产儿表达谱芯片的分析也发现转录因子 ETS1 与 LEF1 在 BPD 与非 BPD 早产儿中的表达量有差异^[6]。研究发现，ETS1 与 LEF1 可以直接作用于多种基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs) 基因的启动子区域^[7-13]，从而加强后者降解细胞外基质、促进血管新生的作用。本研究对 BPD 与非 BPD 早产儿相关基因的表达量进行了比较，观察了受 ETS1 和 LEF1 调控的 MMPs，如 MMP1、MMP2、MMP7、MMP9 以及 MMP13 在早产儿中的表达情况，并对转录因子 ETS1 与 LEF1 通过调控 MMPs 参与 BPD 发生、发展的机制进行了探讨。

1 资料与方法

1.1 Gene Expression Omnibus 数据库 BPD 数据集分析 登陆并下载数据库中的早产儿表达谱芯片数据集 GSE32472 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE32472>)，本数据集共包含取自 106 例早产儿血液标本的表达谱芯片数据，每例早产儿出生后第 5、14 和 28 天分别采集 1 份血液标本。去除不合格样本后，对 299 份血液样本进行了表达谱芯片检测。入组早产儿基本信息情况及 BPD 严重程度分级标准详见 GSE32472 及 Pietrzyk 等^[3]文献。去除疾病严重程度分类不全的样本后，使用 Gene Cloud of Biotechnology Information (GCBI) 在线数据分析平台，对 294 份样本进行分析 (分析方法参见 <http://college.gcbi.com.cn/>)。对 BPD 与非 BPD 中差异表达的基因 (1.2 倍差异) 进行 Gene Ontology 分析，提

取 Gene Ontology 结果中血管新生相关基因和 MMPs 的表达数据，对 2 类基因与 BPD 疾病及其并发症的相关性进行分析。

1.2 统计学分析 使用 SAS JMP 10 分析软件对数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 *t* 检验与方差分析进行数据比较；计数资料以百分比表示，采用 χ^2 检验进行数据比较。采用直线相关分析统计各个基因表达值之间的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

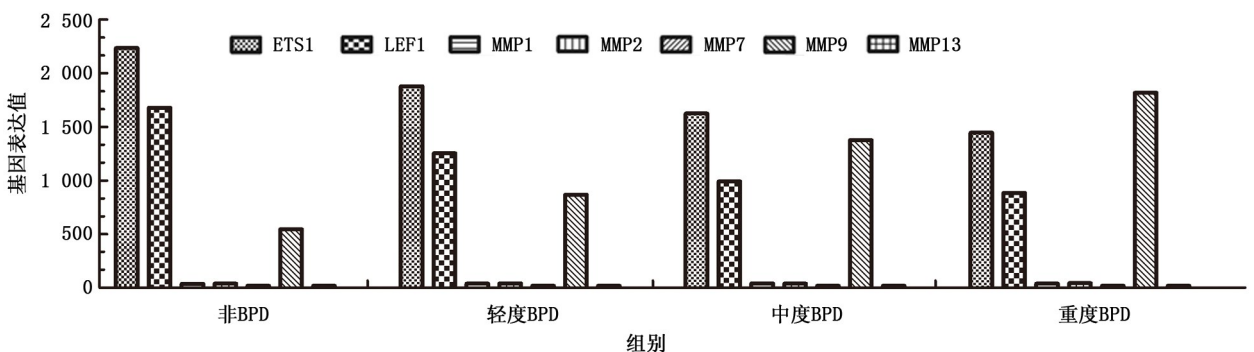
2.1 ETS1、LEF1 在 BPD 早产儿中表达下调 根据本课题组的前期研究，笔者对 Gene Ontology 结果中的 ETS1、LEF1 以及文献报道的受两者调控的 MMPs 基因的表达量进行了分析 (图 1)。促进血管新生的转录因子 ETS1 和 LEF1 在 BPD 早产儿中表达下调，且其表达量与疾病严重程度相关。MMP9 在 BPD 中表达升高，且与疾病严重程度呈正相关。而 MMP1、MMP2、MMP7 及 MMP13 表达水平均较低。

2.2 ETS1、LEF1 与 BPD 严重程度、并发症早产儿视网膜病 (retinopathy of prematurity, ROP) 及出生周龄的关系 ETS1、LEF1 表达量均与 BPD 严重程度及其并发症 ROP 相关，ETS1 与 LEF1 基因的表达量随早产儿周龄的增加而增加 (图 2、图 3)。

2.3 转录因子 ETS1、LEF1 与 MMPs 相关性分析 转录因子 ETS1 与 LEF1 在早产儿中的表达有相关性 ($r = 0.921, P < 0.001$)，见图 4；而 MMPs 与转录因子 ETS1、LEF1 均无相关性 (表 1)。

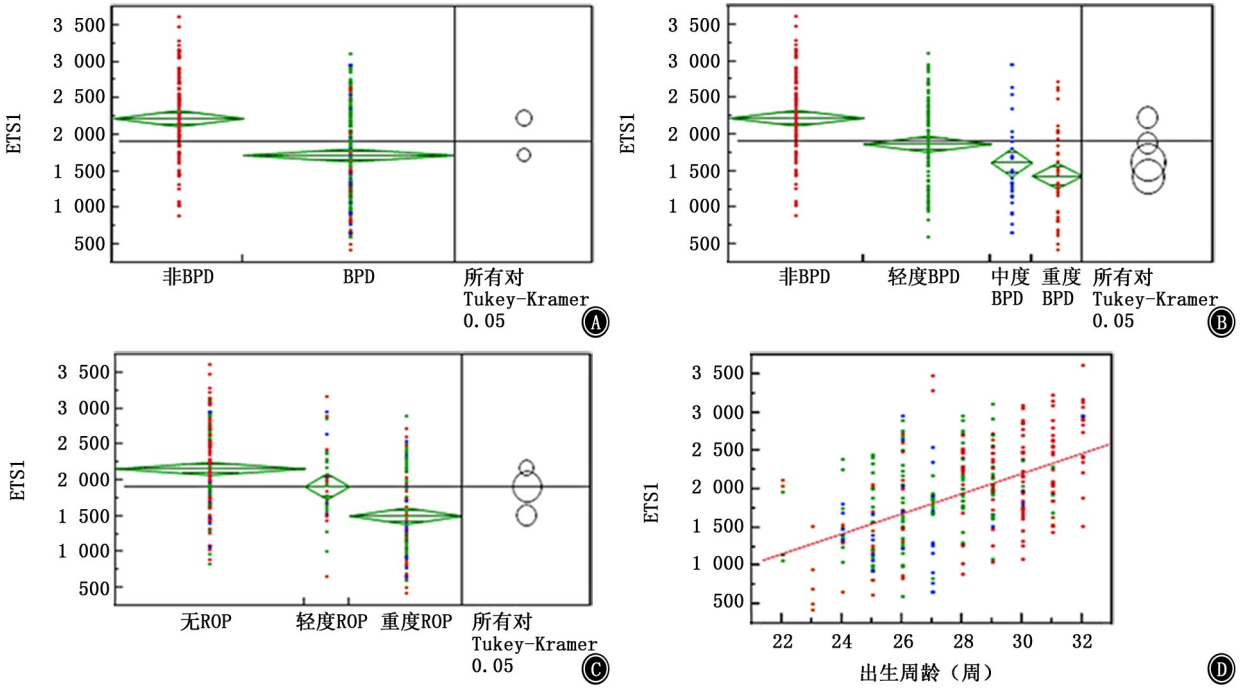
3 讨论

BPD 的重要病理特征之一为肺血管发育不良，血管新生受阻参与 BPD 的发生、发展。目前已有



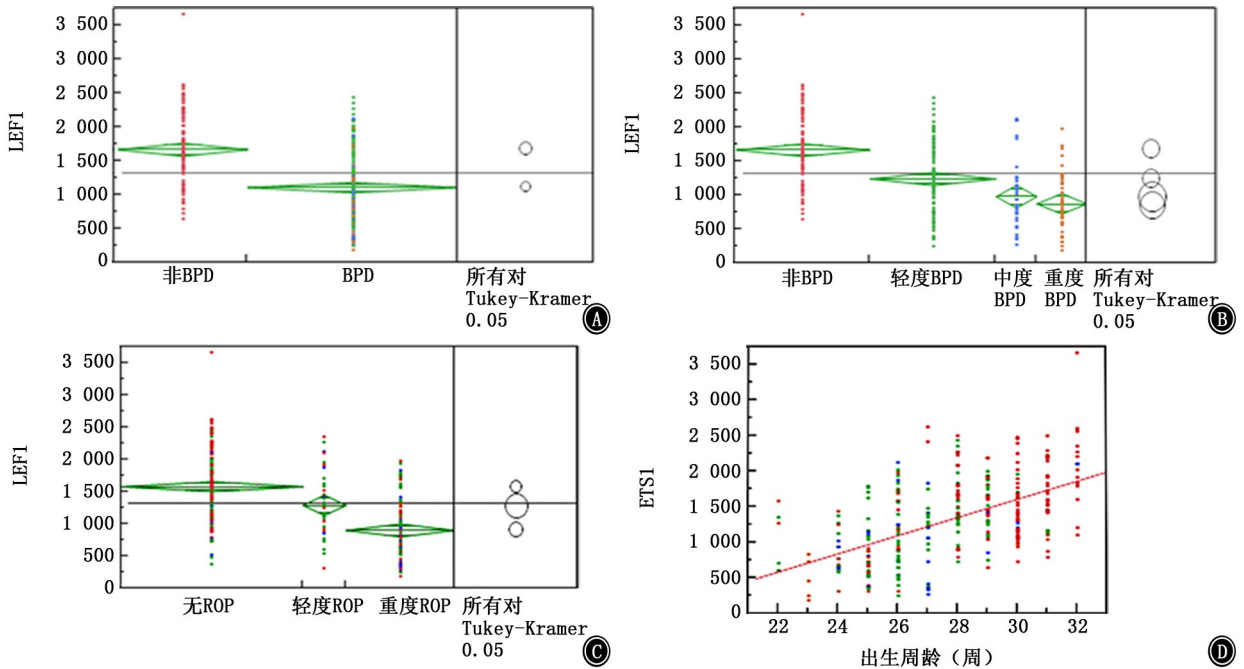
注：MMPs 为基质金属蛋白酶；BPD 为支气管肺发育不良

图 1 血管新生相关基因与 MMPs 在不同疾病程度早产儿中表达情况



注：BPD为支气管肺发育不良；ROP为早产儿视网膜病；A为BPD与非BPD样本ETS1基因表达差异情况；B为不同疾病严重程度样本中ETS1基因表达情况；C为不同并发症ROP严重程度与ETS1基因表达情况；D为出生周龄与ETS1基因表达情况分析

图2 ETS1表达量与BPD严重程度、并发症以及出生周龄的关系



注：BPD为支气管肺发育不良；ROP为早产儿视网膜病；A为BPD与非BPD样本LEF1基因表达差异情况；B为不同疾病严重程度样本中LEF1基因表达情况；C为不同并发症ROP严重程度与LEF1基因表达情况；D为出生周龄与LEF1基因表达情况分析

图3 LEF1表达量与BPD严重程度、并发症以及出生周龄的关系

很多ETS1、LEF1及MMPs与血管新生的关系的报道，而三者与BPD的发生、发展未见有报道。本研究基于一组包含111例早产儿表达谱芯片的数据，发现转录因子ETS1、LEF1的表达水平与BPD及其并发症有相关性。研究发现MMPs与

BPD的发生有相关性，转录因子ETS1、LEF1也与BPD有相关性^[6]。因此笔者推测异常表达的ETS1、LEF1以及MMPs共同参与了BPD的发生。

ETS转录因子家族是一类具有ETS结构域的转录因子，参与了细胞生长、分化和器官的形成过

程，在胚胎血管生成和成人血管新生过程中都起到了重要作用^[14]。ETS1 是 ETS 转录因子家族的一员，研究表明在血管新生和血管内皮受损后修复时 ETS1 表达量出现瞬时增高^[15-16]，进一步研究发现 ETS1 可以促进血管内皮细胞的迁移^[17]。血管新生是一个复杂的多步骤过程，至少包括血管内皮细胞的增殖、趋化迁移以及在细胞外基质中内皮细胞管样结构的生成。MMPs 和血浆酶原的激活所引起的细胞外基质降解是血管新生必要步骤，被激活的血管内皮细胞会诱导性表达 MMPs^[18]。研究发现，内皮细胞中过表达 ETS1 基因时，MMP1、MMP3 和 MMP9 的表达会反应性升高；而抑制 ETS1 的表达则会导致上述基因在内皮细胞中的低表达，可见 ETS1 参与了血管内皮细胞的活化与 MMPs 的表达调控，在多种组织来源的细胞中均发现 ETS1 能够促进 MMPs 的合成^[7-10]。ETS1 在胎儿出生后的血管新生中也是必不可少的^[19]。

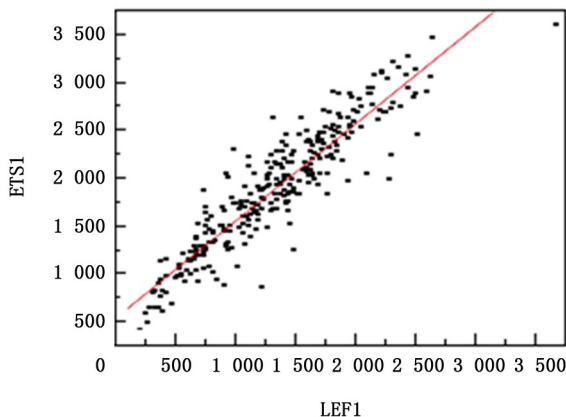


图4 转录因子 ETS1 与 LEF1 直线相关分析散点图

表1 转录因子 ETS1、LEF1 与 MMPs 的直线相关分析

变量	MMP1		MMP2		MMP9		MMP13	
	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值	r 值	P 值
ETS1	0.158	0.300	0.169	0.277	0.643	<0.01	0.151	0.141
LEF1	0.177	0.219	0.218	0.064	0.616	<0.01	0.135	0.292

ETS1 作为 MMPs 的上游基因，可以促进 MMP1 和 MMP9 的表达^[20-21]。在卵巢癌中，ETS1 能够直接结合到 MMP9 和 MMP13 的启动子区，上调后两者的表达^[10]。与 ETS1 的功能相似，转录因子 LEF1 也能够通过结合 MMP13 启动子区，促进 MMP13 的表达^[11]。一项在肝细胞中的研究表明 ETS1、LEF1、c-Jun 等转录因子能够协同作用于孕丸 X 受体基因的启动子区，并增强后者的表达；并且 ETS1 能够增强 LEF1、c-Jun 等对孕丸 X 受体基因启动子活性的调控^[12,22]。LEF1 与

ETS1 2 个转录因子具有广泛的协同作用，在多种疾病中发挥作用^[23-24]。LEF1 可与 ETS 家族中的 PEA3/ERM/ER81 协同作用，通过调控 Wnt 信号通路来调节 MMP7 的表达^[24]。与 ETS1 功能相似，体外实验研究发现 LEF1 也能够增强血管内皮细胞的增殖和在基质中的侵袭能力，且其侵袭能力的增强可能是通过增强 MMP2 的作用实现的^[13]。尽管在血管新生及多种疾病发生过程中 ETS1、LEF1 均可以通过 MMPs 起到作用，然而在本研究中对早产儿基因表达数据的分析并未发现 ETS1、LEF1 与 MMPs 表达有相关性。

ETS1、LEF1、MMPs 与 BPD 发生、发展的关系未见报道。本研究发现，在早产儿的血液中，ETS1 与 LEF1 的表达水平具有相关性 ($r = 0.921, P < 0.001$)。ETS1、LEF1 在 BPD 组早产儿中表达下调，且与 BPD 严重程度和其并发症的程度相关。血管新生在胎儿与早产儿中均应是持续活跃的，然而 BPD 的主要病理学特征之一为严重的肺血管发育不良，其并发症 ROP 的发生也与视网膜新生血管异常有关。笔者推测在早产儿中，促进血管新生的转录因子 ETS1、LEF1 的异常低表达以及 MMPs 的低表达，阻碍了肺和视网膜的血管新生过程，累积效应导致了 BPD 和 ROP 的发生。而 MMP9 在 BPD 中的高表达可能是由于另一个抑制血管新生的基因凝血酶敏感蛋白 1 的持续高表达所引起的^[25-27]。

MMPs 通过对细胞外基质的重构，能够促进血管内皮细胞的迁移和毛细血管的出芽，而 MMP2 和 MMP9 是主要的降解细胞外基质和基底膜的 MMPs。在血管新生过程中 MMP2 与 MMP9 均能够促进血管平滑肌细胞的增值和迁移^[28-29]，然而与 MMP9 相比，高表达 MMP2 与肿瘤的进展、恶性程度以及预后关系更加密切^[30]。笔者推测 MMP2 在细胞外基质降解和促进血管内皮细胞迁移中的作用比 MMP9 要大，所以本研究中虽然观察到 MMP9 在 BPD 中表达升高，但仍不能逆转血管新生受阻和 BPD 的发生。早产儿肺血管新生和 BPD 的发生与发展是多种信号通路与基因调控的共同结果，是一个极其复杂的过程，本研究表明 ETS1 与 LEF1 至少在部分程度上参与了 BPD 的发生。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Fischer HS, Bührer C. Avoiding endotracheal ventilation to prevent bronchopulmonary dysplasia: a meta-analysis [J]. Pediatrics, 2013, 132 (5): e1351-e1360. DOI: 10.1542/peds.

- 2013-1880.
- [2] 李春杰,肖志辉.极低体质量早产儿支气管肺发育不良的发生率及其影响因素研究[J].中国全科医学,2015,18(10):1165-1167,1171. DOI:10.3969/j.issn.1007-9572.2015.10.016.
- [3] Pietrzyk JJ, Kwinta P, Wollen EJ, et al. Gene expression profiling in preterm infants: new aspects of bronchopulmonary dysplasia development [J]. PLoS One, 2013, 8(10): e78585. DOI:10.1371/journal.pone.0078585.
- [4] De Paepe ME, Mao Q, Powell J, et al. Growth of pulmonary microvasculature in ventilated preterm infants [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(2): 204-211. DOI:10.1164/rccm.200506-927OC.
- [5] Thébaud B, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(10): 978-985. DOI:10.1164/rccm.200611-1660PP.
- [6] Yang M, Chen BL, Huang JB, et al. Angiogenesis-related genes may be a more important factor than matrix metalloproteinases in bronchopulmonary dysplasia development [J]. Oncotarget, 2017, 8(12): 18670-18679. DOI: 10.18632/oncotarget.14722.
- [7] Ito H, Duxbury M, Benoit E, et al. Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2 [J]. Cancer Res, 2004, 64(20): 7439-7446. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1177.
- [8] Gao H, Peng C, Liang B, et al. $\beta 6$ integrin induces the expression of metalloproteinase-3 and metalloproteinase-9 in colon cancer cells via ERK-ETS1 pathway [J]. Cancer Lett, 2014, 354(2): 427-437. DOI:10.1016/j.canlet.2014.08.017.
- [9] Kato T, Fujita Y, Nakane K, et al. ETS1 promotes chemoresistance and invasion of paclitaxel-resistant, hormone-refractory PC3 prostate cancer cells by up-regulating MDR1 and MMP9 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(3): 966-971. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.12.047.
- [10] Ghosh S, Basu M, Roy SS. ETS-1 protein regulates vascular endothelial growth factor-induced matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-13 expression in human ovarian carcinoma cell line SKOV-3 [J]. J Biol Chem, 2012, 287(18): 15001-15015. DOI:10.1074/jbc.M111.284034.
- [11] Elayyan J, Lee EJ, Gabay O, et al. LEF1-mediated MMP13 gene expression is repressed by SIRT1 in human chondrocytes [J]. FASEB J, 2017, 31(7): 3116-3125. DOI: 10.1096/fj.201601253R.
- [12] Kumari S, Saradhi M, Rana M, et al. Pregnane and Xenobiotic Receptor gene expression in liver cells is modulated by Ets-1 in synchrony with transcription factors Pax5, LEF-1 and c-Jun [J]. Exp Cell Res, 2015, 330(2): 398-411. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.09.020.
- [13] Planutiene M, Planutis K, Holcombe RF. Lymphoid enhancer-binding factor 1, a representative of vertebrate-specific Lef1/Tcf1 sub-family, is a Wnt-beta-catenin pathway target gene in human endothelial cells which regulates matrix metalloproteinase-2 expression and promotes endothelial cell invasion [J]. Vasc Cell, 2011, 3: 28. DOI:10.1186/2045-824X-3-28.
- [14] Sato Y. Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis [J]. Cell Struct Funct, 2001, 26(1): 19-24.
- [15] Niu N, Yu C, Li L, et al. Dihydroartemisinin enhances VEGFR1 expression through up-regulation of ETS-1 transcription factor [J]. J Cancer, 2018, 9(18): 3366-3372. DOI:10.7150/jca.25082.
- [16] Chen J, Fu Y, Day DS, et al. VEGF amplifies transcription through ETS1 acetylation to enable angiogenesis [J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 383. DOI:10.1038/s41467-017-00405-x.
- [17] Chen Z, Fisher RJ, Riggs CW, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides [J]. Cancer Res, 1997, 57(10): 2013-2019.
- [18] Senger DR. Molecular framework for angiogenesis: a complex web of interactions between extravasated plasma proteins and endothelial cell proteins induced by angiogenic cytokines [J]. Am J Pathol, 1996, 149(1): 1-7.
- [19] Nakano T, Abe M, Tanaka K, et al. Angiogenesis inhibition by transdominant mutant Ets-1 [J]. J Cell Physiol, 2000, 184(2): 255-262. DOI: 10.1002/1097-4652(200008)184:2<255::AID-JCP14>3.0.CO;2-J.
- [20] Haines P, Samuel GH, Cohen H, et al. Caveolin-1 is a negative regulator of MMP-1 gene expression in human dermal fibroblasts via inhibition of Erk1/2/Ets1 signaling pathway [J]. J Dermatol Sci, 2011, 64(3): 210-216. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.08.005.
- [21] Kars MD, İşeri OD, Gündüz U. Drug resistant breast cancer cells overexpress ETS1 gene [J]. Biomed Pharmacother, 2010, 64(7): 458-462. DOI:10.1016/j.biopha.2010.01.008.
- [22] Kumari S, Mukhopadhyay G, Tyagi RK. Transcriptional regulation of mouse PXR gene: an interplay of transregulatory factors [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e44126. DOI: 10.1371/journal.pone.0044126.
- [23] Balmelle N, Zamarreño N, Krangel MS, et al. Developmental activation of the TCR α enhancer requires functional collaboration among proteins bound inside and outside the core enhancer [J]. J Immunol, 2004, 173(8): 5054-5063.
- [24] Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and disease [J]. Oncogene, 2006, 25(57): 7492-504. DOI:10.1038/sj.onc.1210056.
- [25] Radziwon-Balicka A, Santos-Martinez MJ, Corbalan JJ, et al. Mechanisms of platelet-stimulated colon cancer invasion: role of clusterin and thrombospondin 1 in regulation of the P38MAPK-MMP-9 pathway [J]. Carcinogenesis, 2014, 35(2): 324-332. DOI:10.1093/carcin/bgt332.
- [26] Albo D, Shinohara T, Tuszyński GP. Up-regulation of matrix metalloproteinase 9 by thrombospondin 1 in gastric cancer [J]. J Surg Res, 2002, 108(1): 51-60.
- [27] Qian X, Rothman VL, Nicosia RF, et al. Expression of thrombospondin-1 in human pancreatic adenocarcinomas: role in matrix metalloproteinase-9 production [J]. Pathol Oncol Res, 2001, 7(4): 251-259.
- [28] Uzui H, Lee JD, Shimizu H, et al. The role of protein-tyrosine phosphorylation and gelatinase production in the migration and proliferation of smooth muscle cells [J]. Atherosclerosis, 2000, 149(1): 51-59.
- [29] Mason DP, Kenagy RD, Hasenstab D, et al. Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery [J]. Circ Res, 1999, 85(12): 1179-1185.
- [30] Mahecha AM, Wang H. The influence of vascular endothelial growth factor-A and matrix metalloproteinase-2 and-9 in angiogenesis, metastasis, and prognosis of endometrial cancer [J]. Onco Targets Ther, 2017, 10: 4617-4624. DOI:10.2147/OTT.S132558.