

ETS1/2 对非洲爪蛙胰腺发育的影响

李 卉,殷晨阳,李德利,郭 静,刘 佳,袁 栋*

(南京医科大学生物化学与分子生物学系,江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:探讨 ETS1/2 对非洲爪蛙胚胎胰腺发育的影响。方法:设计并合成特异性抑制 ETS1/2 表达的反义吗啉代寡核苷酸(morpholino oligonucleotide,MO),通过显微注射的方法将 MO 转入爪蛙胚胎,利用整胚原位杂交和定量 RT-PCR 检测标志性基因的表达变化。结果:单独敲降 ETS1 或 ETS2 对爪蛙胚胎发育无明显影响,共同敲降 ETS1/2 后会使爪蛙胚胎发育异常,胰腺标志基因表达上升,肠道标志基因表达下降,肝脏和胃标志基因无明显变化;胰腺标志基因 *ngn3*、*igf1*、*foxa1* 的启动子区存在 ETS1/2 的结合位点。结论:单独敲降 ETS1 或 ETS2 对爪蛙胚胎发育无明显影响,敲降 ETS1/2 促进爪蛙胚胎胰腺发育,抑制肠道发育,对肝脏和胃的发育无明显影响。

[关键词] ETS1/2;非洲爪蛙;胰腺发育

[中图分类号] Q132

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-785-07

doi:10.7655/NYDXBNS20170701

Effects of ETS1/2 on pancreas development of *Xenopus laevis*

Li Hui, Ying Chenyang, Li Deli, Guo Jing, Liu Jia, Yuan Li*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of ETS1/2 on pancreas development of *Xenopus laevis*. **Methods:** The specific morpholino oligonucleotides (MOs) were designed to knockdown the ETS1/2 by microinjection. The expression of marker genes was tested during pancreas formation by whole mount *in situ* hybridization and quantitative RT-PCR. ETS1/2 downstream genes were screened by bioinformatics analysis. **Results:** Knockdown of ETS1 or ETS2 had no effect on embryo development of *Xenopus laevis*. Knockdown of both ETS1/2 promoted the expression of pancreas marker genes while inhibited the expression of intestine marker genes, and had no effects on the expression of liver and stomach marker genes. The binding sites of ETS1/2 were found in the promoter regions of pancreatic marker genes *ngn3*, *igf1* and *foxa1*. **Conclusion:** Knockdown of ETS1/2 promoted the pancreas development of *Xenopus laevis* while inhibited the intestine development, and had no effects on the development of the liver and stomach.

[Key words] ETS1/2; *Xenopus laevis*; pancreas development

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):785-791]

胰腺调节人体内营养物质的代谢平衡,其功能异常与人类多种疾病相关。由于胰腺重要的生物学功能,理解和掌握胰腺发育和调控机制一直都是发育生物学领域关注和研究的焦点之一。胰腺发育是一个复杂而且保守的过程,胰腺起源于中胚层,由胰腺前体细胞逐步形成成熟的胰腺。在这一过程中有

一系列的信号通路和转录因子级联调控网络发挥了重要作用^[1]。

转录因子 ETS1 和 ETS2 属于 ETS 家族,ETS 家族普遍存在于多细胞生物中^[2-3]。正常成年小鼠组织中,ETS1 表达于一些免疫组织,例如胸腺、脾脏、淋巴结等^[4-5],而在小鼠胚胎时期,ETS1 在各组织中高表达^[6]。ETS2 则主要在早期肝癌细胞^[7]、晚期恶性肿瘤细胞、甲状腺组织及相关良性肿瘤中高表达^[8]。

ETS 家族基因主要参与细胞的增殖、分化、凋亡与转化过程^[9]。ETS1 在很多正常生理过程中发挥重要作用,如正常的细胞分裂与分化^[10]、血管的再生^[11]

[基金项目] 国家自然科学基金(81200125);江苏省自然科学基金(BK2012648);江苏省“青蓝工程”(JX2161015061);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:yuanli@njmu.edu.cn

和造血^[12]。近年发现,ETS1 不仅在人体正常胰腺细胞中发挥作用^[13],而且也在胰腺癌的发病过程中起一定的作用^[14],如 ETS1 的激活是导致肿瘤细胞转化、转移以及增殖的重要因素^[15]。ETS2 在肿瘤的增殖和转化过程中也发挥重要的作用^[16-17],在小鼠胰腺的发育过程中,ETS2 可增强胰腺腺泡和导管细胞的增殖分化^[18],同时 ETS2 在正常脂肪组织分化过程中起重要作用^[19]。但 ETS1 和 ETS2 在胰腺发育中的影响和作用知之甚少,因此本研究以非洲爪蛙作为模式动物,研究 ETS1 和 ETS2 在胰腺发育中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

非洲爪蛙(eNASCO 公司,美国);人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin,hCG,Sigma 公司,美国);DNase I、限制性核酸内切酶、T7 聚合酶、T4 连接酶和 RevertAid™ first strand cDNA synthesis kit(Thermo Fermentas 公司,美国);RNA 纯化试剂盒 RNeasy Mini Kit(QIGEN 公司,德国);Dig-UTP、anti-Dig-AP、BM purple(Roche 公司,瑞士);RNA 合成试剂 SP6 mMessage™ Kit (Ambion 公司,美国);Taq DNA 聚合酶、PrimeSTAR™ HS DNA 聚合酶、SYBR® Green Premix EX Taq™ 定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)。β-actin(鼠抗)、ETS1(兔抗)、ETS2(鼠抗)(Santa Cruz 公司,美国)。根据 ETS1、ETS2 基因 5'端序列设计特异性封闭的反义吗啉代寡核苷酸(morpholino oligonucleotide,MO),分别命名为 ETS1 MO、ETS2 MO,ETS1 MO 序列为:5'-GTTTGAGATCTAGCGCAGCTTTCAT-3',ETS2 MO 序列为:5'-CGAATTCCAAACCTCTGTCATTGGCCGCCAATGACAGAGTTTGGAATTCG-3',由美国 Gene Tools 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 胚胎处理和显微注射

实验前 12 h 左右注射 300~600 U hCG 诱导雌性爪蛙排卵,体外受精 30 min 后,去受精卵外胶质膜,在 0.1×MBSH [1×MBSH:88 mmol/L NaCl,2.4 mmol/L NaCO₃,1 mmol/L KCL,0.82 mmol/L MgSO₄,0.41 mmol/L CaCl₂,0.33 mmol/L Ca(NO₃)₂,10 mmol/L HEPES,pH 7.4]中培养至相应发育阶段。胚胎时期的划分依照 Nieuwkoop 和 Faber 分期^[20]。

在非洲爪蛙四细胞期,分别单独注射 50 ng 的 ETS1 MO 或 50 ng 的 ETS2 MO 或 ETS1 MO 和 ETS2 MO 各 25 ng 至 4 个细胞中;然后将胚胎置于恒温培养箱中培养,观察表型和分析基因表达情况。

1.2.2 质粒构建

根据 GenBank 提供的 ETS1(NM_001087613.1)、ETS2(NM_001088036.1)基因序列设计克隆引物,并通过 RT-PCR 方法对 ETS1、ETS2 编码区进行扩增,双酶切 PCR 产物之后将其连接到 pcs²⁺质粒构建质粒 pcs²⁺-ETS1 和 pcs²⁺-ETS2。

1.2.3 RT-PCR 和 qRT-PCR

收集相应发育阶段的胚胎并提取 RNA,以 DNase I 消化并纯化。取 1 μg RNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应条件为:95 ℃ 3 min 预变性,94 ℃ 50 s,56 ℃ 50 s,72 ℃ 50 s,30 个循环,72 ℃ 5 min 退火延伸。

将上述逆转录的 cDNA 1:10 稀释后,利用 SYBR®Green Premix EX Taq™ 定量 PCR 试剂盒进行实时定量 PCR。引物序列见表 1。反应条件为:95 ℃ 2 min 预变性,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,68 ℃ 20 s。

1.2.4 整胚原位杂交

分别将 pcs²⁺-insulin 用 *EcoR* I 单酶切,pcs²⁺-amylase 用 *EcoR* V 单酶切,用 T3 制备探针;pcs²⁺-pdx1 用 *Sal* I 单酶切,pcs²⁺-hex 用 *Bam*H I 单酶切,pcs²⁺-darmin 用 *Cla* I 单酶切,并用 T7 制备探针,pcs²⁺-ptf1α 用 *Sac* II 单酶切,并用 SP6 制备探针。反应体系中加入 Dig-UTP 用以标记探针。

收集并固定爪蛙胚胎,用梯度浓度乙醇进行再水化,用蛋白酶 K 处理后进行杂交,加入 anti-Dig-AP 抗体后,与底物液 BM purple 进行显色反应。

1.2.5 Western blot

收集目标胚胎,利用南京凯基全蛋白试剂盒提取蛋白,通过 10%SDS-PAGE 电泳,随后转移到 PVDF 膜上。ETS1(兔源)、ETS2(鼠源)、β-actin(鼠源)抗体均为美国 Santa Cruz 公司产品,抗体稀释比例为 1:400。

1.3 统计学方法

Ct 值分析所得 2^{-ΔΔCt} 数据以均数±标准差($\bar{x}±s$)表示,利用 SPSS10.0 统计软件进行配对 *t* 检验分析。*P*≤0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 单独敲降 ETS1 和 ETS2 不影响爪蛙胚胎发育

为研究 ETS1 和 ETS2 在爪蛙早期胚胎发育中的作用,利用显微注射技术分别将 ETS1 MO 和 ETS2 MO 注射入四细胞期的爪蛙胚胎中以实现基因的敲降。为验证敲降效果,收集注射 MO 后发育至 S18 期的胚胎,利用 RT-PCR 和 Western blot 方法进

表 1 定量 PCR 引物序列
Table 1 Sequences of real-time quantity PCR

名称	引物(5'→3')
insulin	F: ATGGATGCAGTGTCTGCCC; R: TGTGCTTGTTCGATGTCCCG
pdx1	F: ATGAATGCTGATGACCAATA; R: GGTGAGGAACAATGGGCTCT
amylase	F: ATGAACGTAATTGAAAGAGC; R: ACTCTCTCTCCCGTTCCGC
trypsinogen	F: GATGATGATAAGATTGTAGG; R: CATGATGTCAATTGTCCAGGT
ptf1 α	F: ATGAAAACGGTCCTGGAGCA; R: TCCGTCACAGGGCGTCCCTAG
ngn3	F: CCAGATTTACAGACAACGAGG; R: CTGTTTTACGACGACGCCGT
foxo1	F: GGATTTTGAGCCCTTTTCTC; R: AAATCCCCGCATACTCCAAG
neurod1-a	F: TGGGTGGACGAATGCCTGAG; R: CATCTTCATCGTCTCCTCC
neurod1-b	F: GCCGAGACCCAGGCTCCAG; R: CTCCACCCGGGCTTTGGTCA
pim3	F: CCCAAGCAACATGGAGCATC; R: GACCATCACGCCGTTCAAAG
foxa1-a	F: AGGACGCCAGGAGGGCTAT; R: GACCCCATTCATTCATTGC
foxa1-b	F: AAGGACATGAGACGACAGAT; R: TAGGGCTCAGTCCCGCTCCC
foxa2	F: ATGCTTGGGGCTGTGAAAAT; R: CCCATGCCAGTCATTGCCCC
gata6-a	F: ACCTGAGTGAGGACAGCTGG; R: AATGTGATCCAAGTCCCTAA
gata6-b	F: GGAGGCCACCTGCCTCCTAT; R: GTCAGCATGGAGCCAACCT
igf1	F: ATGCTCCCCAGCTGTTTC; R: TTGTTTAGAGGGAGAATGCC
hex	F: CGCGCCAAGGGACATTTAAG; R: TGCTGGTACTGCATGTTCGAT
for1	F: GCAAAGCTGTAGGGATGCTT; R: CATGCCTGCTATCACTTCCA
hnf4a	F: TACCCTGCGGAACCTTAG; R: CAAGAAAAGCAAGGCATGAT
sfrp5	F: TATGCCAGGTAGTGCCTGAC; R: GCTGGGTGACTTGTTCCTG
sox2	F: GGGAACTGTGGAAACTGA; R: TCCGGGCTGTTCTATTCTG
darmin	F: TGTGATGGTCTTCCAGTGA; R: AAAGCCACCAGACTGCAGAT

行检测。结果显示,与对照组相比,敲降胚胎中 ETS1 或 ETS2 的表达量明显减少(图 1A)。但是,在对单独敲降 ETS1 或 ETS2 后胚胎发育过程的观察中发现,胚胎发育至原肠胚期(S11 期)、神经胚期(S18 期)、尾芽期(S32 期)和蝌蚪期(S42 期)时,敲降胚胎表型与对照组相比无明显变化(图 1B、C)。

2.2 同时敲降 ETS1/2 影响爪蛙胚胎的发育

2.2.1 同时敲降 ETS1/2 导致胚胎肠道发育异常

由于单独敲降 ETS1 或 ETS2 对胚胎的发育并无明显影响,遂将 ETS1 MO 和 ETS2 MO 各 25 ng 共注射入四细胞期的爪蛙胚胎中,以实现 ETS1 和 ETS2 两个基因的共同敲降。观察发现,胚胎在生长至尾芽期(S32 期)时,敲降组与对照组胚胎表型无明显差别,但是在胚胎发育至蝌蚪期(S42 期)时,敲降组胚胎肠道扭转异常(图 2)。正常胚胎仅在腹部左侧有一条小沟,胰腺即在此处发育;而敲降组肠道有多条小沟,已无法判断胰腺及其他相邻器官的位置。

2.2.2 敲降 ETS1/2 影响胰腺标志基因的表达

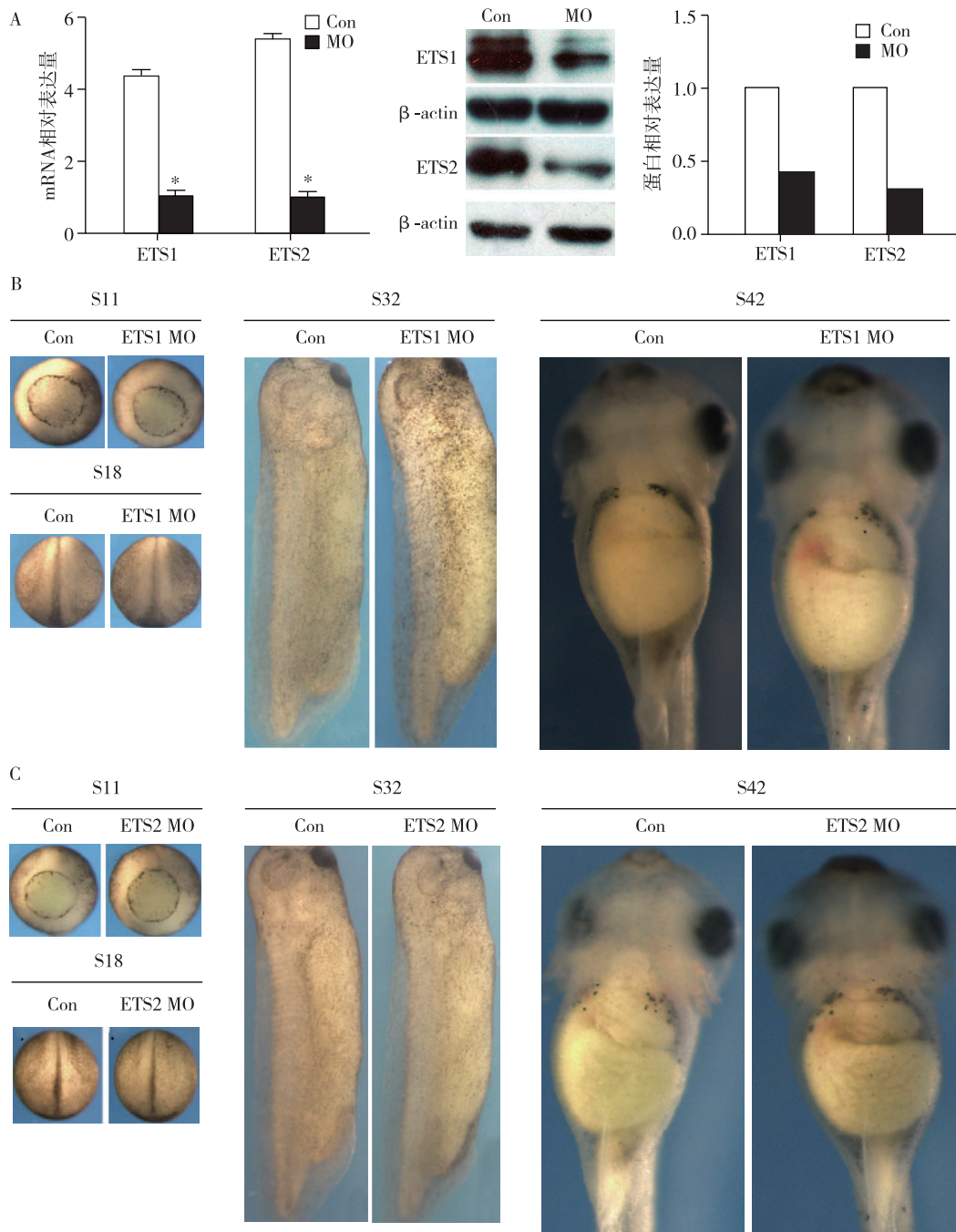
为验证同时敲降 ETS1 和 ETS2 是否影响胰腺

发育,利用原位杂交技术检测胚胎不同时期胰腺标志基因的表达。结果显示,在 S32 期敲降胚胎中,胰腺前体细胞标志基因 pdx1、ptf1 α 的表达量明显上升(图 3A);在 S42 期,胰腺内外分泌部的标志基因 insulin、amylase 的表达量有明显的上升(图 3A)。

定量 RT-PCR 结果显示,S42 期敲降胚胎与对照组相比,胰腺标志基因 amylase、insulin、trypsinogen、pdx1、ptf1 α 表达量均有明显上升(图 3B)。S18 期胚胎的早期胰腺发育相关如 ngn3、mrx1、neurod1、foxa1、gata6、igf1、foxa2 都呈上升趋势(图 3C)。

2.2.3 敲降 ETS1/2 对肝脏、胃、小肠发育的影响

为研究敲降 ETS1 和 ETS2 对肝脏、胃、小肠的影响,利用原位杂交和定量 RT-PCR 技术检测 S42 期肝脏、胃、小肠标志基因的表达。结果显示,与对照组相比,敲降组肝脏标志基因 hex 表达量无明显变化,而小肠标志基因 darmin 的表达量有明显的下调(图 4A);定量 RT-PCR 结果显示,肝脏、胃标志基因 hex 和 sfrp5 无明显变化,而小肠标志基因 cyl18、i-fabp 和 darmin 敲降组较对照组有明显的下调(图



A:ETS1 MO 和 ETS2 MO 敲降效率验证;B:敲降 ETS1 后爪蛙胚胎不同时期的表型;C:敲降 ETS2 后爪蛙胚胎不同时期的表型(* $P<0.05$, $n=3$)。

图 1 敲降 ETS1 或 ETS2 对爪蛙胚胎发育的影响

Figure 1 Effects of ETS1 or ETS2 knockdown on the development of embryos of *Xenopus laevis*

4B)。提示,敲降 ETS1 /2 抑制爪蛙小肠发育,但是对肝脏和胃的发育并无明显影响。

2.3 *ngn3*、*foxa1*、*igf1* 启动子区存在 ETS1/2 的结合位点

上述定量实验结果显示 ETS1 和 ETS2 敲降后许多胰腺相关的转录因子表达发生改变。通过生物信息学分析发现,表达发生改变的基因中,*ngn3*、*foxa1*、*igf1* 这 3 个转录因子的启动子序列中存在

ETS1/2 共同的结合位点(图 5)。

3 讨论

在胰腺发育过程中,有多种转录因子通过级联调控网络发挥重要的作用,如 *pdx1*、*p48*、*ngn3* 等胰腺发育相关转录因子。本研究发现,转录因子 ETS1/2 共同影响非洲爪蛙胚胎时期胰腺发育。

ETS1 和 ETS2 均可在胚胎发育过程中发挥作

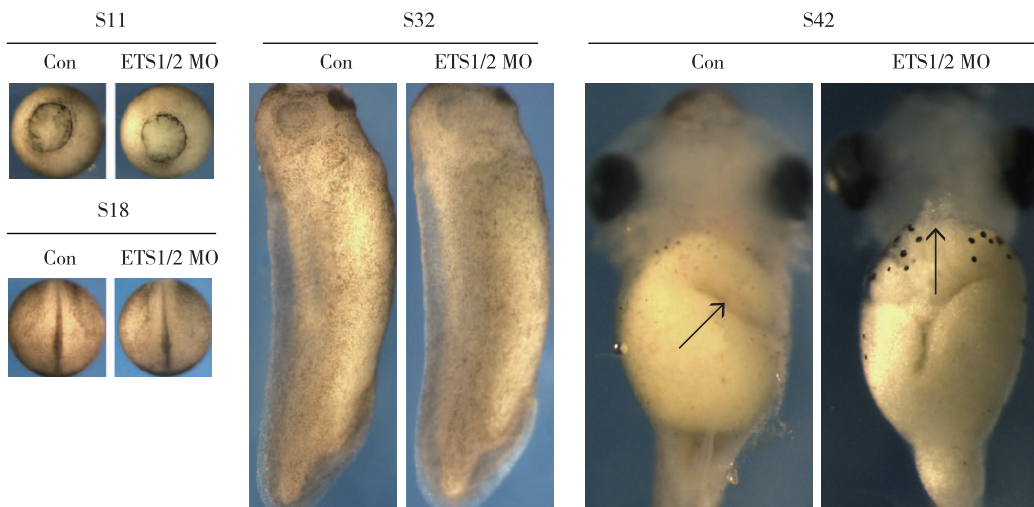
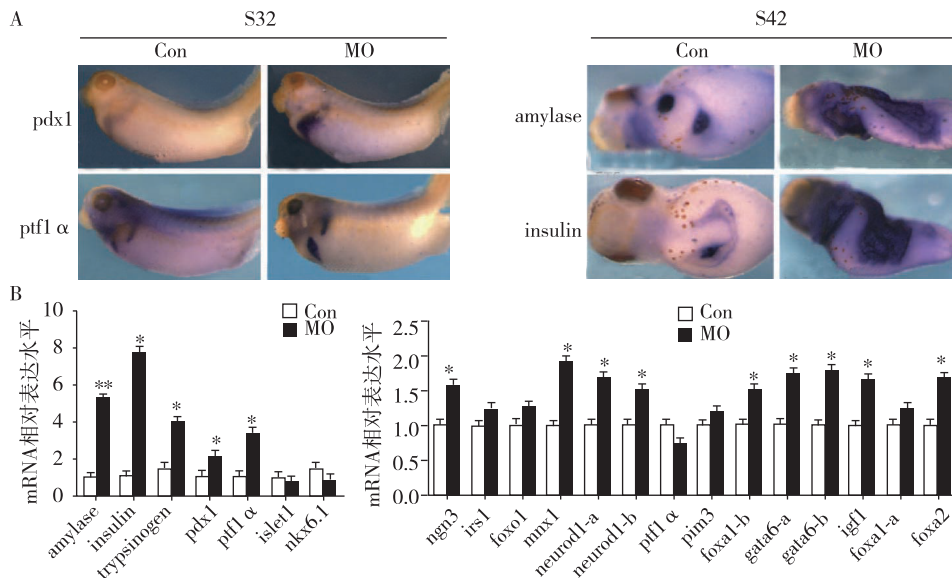


图 2 共同敲降 ETS1 和 ETS2 对爪蛙胚胎发育的影响

Figure 2 Effects of both ETS1/2 knockdown on the development of embryos of *Xenopus laevis*



A: 整胚原位杂交检测同时敲降 ETS1 和 ETS2 后爪蛙胰腺标志基因表达; B, C: 定量 RT-PCR 检测同时敲降 ETS1 和 ETS2 后爪蛙胰腺发育相关基因表达(与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n = 3$)。

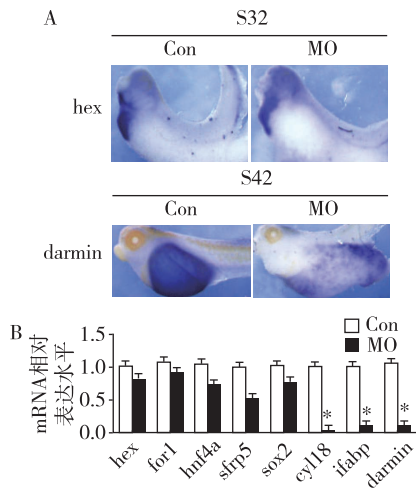
图 3 敲降 ETS1/2 对胚胎胰腺发育的影响

Figure 3 Effects of ETS1/2 knockdown on the pancreatic development of embryos

用, 如 ETS1 影响小鼠 T 细胞和 B 细胞的发育及分化过程^[21-22]; ETS2 可调控成纤维细胞分化为心肌细胞前体^[23], 也可调控胰腺腺泡和导管的增殖分化^[18]。但在某些情况下, ETS1 或 ETS2 单独作用无明显影响, 需要二者协同发挥作用。例如, ETS1 和 ETS2 通过协同作用, 促进血管内皮细胞的形成^[24]; 共同通过 RAS 信号通路, 影响肿瘤细胞形成、增殖和分化^[25]。本研究发现, 单独敲降 ETS1 或 ETS2 后, 对非洲爪蛙胚胎发育并无明显影响, 而在共同敲降 ETS1 和 ETS2 后, 胚胎发育出现明显异常, 提示在非洲爪蛙的发育过程中, ETS1 和 ETS2 存在协同作用。二者

氨基酸序列同源性为 54%, 也可能是它们具有类似功能、彼此互补的结构基础。

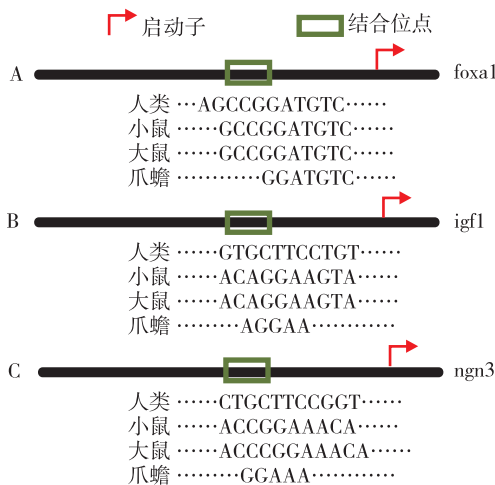
多种转录因子调控了胰腺发育, 如 pdx1、ngn3、mafa 可以诱导形成胰岛 β 样细胞, 促进 insulin 的合成^[26]; gata4 和 gata6 共同调节胰腺内分泌细胞的形成^[27]; 内胚层向胰腺内外分泌前体细胞分化则需要 pdx1 和 P48 的调控^[28]; ngn3 促进胰腺内分泌细胞的形成^[29]; igf1 缺失可使小鼠胰岛缩小 90%^[30]等。本研究发现转录因子 ETS1/2 敲降后, 在胰腺前体细胞形成阶段, 胰腺内分泌前体标志基因 pdx1、胰腺外分泌前体标志基因 pfl1 α 表达量明显上升; 在胰腺发



A: 整胚原位杂交检测同时敲降 ETS1 和 ETS2 后爪蛙肝脏、小肠标志基因表达; B: 定量 RT-PCR 检测同时敲降 ETS1 和 ETS2 后爪蛙肝脏、胃、小肠标志基因的表达(与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 3$)。

图 4 敲降 ETS1 和 ETS2 对肝脏、胃、小肠的影响

Figure 4 Effects of ETS1/2 knockdown on the liver, stomach and intestine



A: ETS1/2 与 foxa1 结合位点预测; B: ETS1/2 与 igf1 结合位点预测; C: ETS1/2 与 ngn3 结合位点预测。

图 5 ETS1/2 与下游转录因子结合位点预测

Figure 5 Prediction of downstream transcription factor binding sites ETS1/2

育完成时,胰腺内分泌标志基因 insulin、胰腺外分泌标志基因 amylase 和 trypsinogen 表达量均有明显上升。以上结果提示,ETS1/2 敲降同时影响胰腺内分泌和外分泌部的形成,而且在胰腺发育早期,内外分泌前体细胞形成时即发挥作用。

文献报道,ETS1 和 ETS2 可通过形成二聚体,识别相同的 DNA 片段而影响端粒酶活性^[31]。我们分析了 ETS1/2 敲降后表达发生改变的基因的启动子区,发现 ngn3、igf1、foxa1 的启动子区存在 ETS1

和 ETS2 共同的结合位点 (GGAA)。但是 ETS1 和 ETS2 是否会形成二聚体结合于下游基因的启动子区而发挥转录调控作用,从而影响非洲爪蛙胰腺发育还需要通过体内实验进一步验证。

肠道器官,如胰腺、肝脏、小肠和胃等均起源于中胚层。本文发现,ETS1/2 不仅影响胰腺发育,对小肠发育也有较明显影响,但对胃及肝脏的形成无明显影响。本研究中,ETS1/2 敲降后,胰腺和肠道标志基因变化呈相反的趋势。文献报道,使用示踪技术标记斑马鱼肝脏的标志基因 Bmp2b,发现胰腺与肝脏在发育过程中存在胰腺细胞向肝脏细胞转化的现象^[32-33]。而在爪蛙胚胎发育过程中,敲降 ETS1/2 是否有可能使部分肠道细胞转化为胰腺细胞,需要利用细胞谱系示踪技术(single-cell-lineage tracing)进一步研究胰腺与肠道前体细胞之间是否存在相互转化。

综上所述,在非洲爪蛙发育的过程中,单独敲降 ETS1 或 ETS2 对爪蛙胚胎发育没有影响,但是共同敲降 ETS1 和 ETS2 后,促进胰腺的发育,抑制小肠的发育,胰腺发育相关基因 foxa1、ngn3 和 igf1 的启动子区都存在 ETS/2 共同识别的结合位点,但 ETS1/2 是否通过转录调控下游因子而影响胰腺发育还有待进一步研究和探讨。

[参考文献]

- [1] Jensen J. Gene regulatory factors in pancreatic development [J]. Dev Dyn, 2004, 229(1):176-200
- [2] Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(11):827-837
- [3] Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors [J]. Annu Rev Biochem, 2011, 80:437-471
- [4] Bhat NK, Fisher RJ, Fujiwara S, et al. Temporal and tissue-specific expression of mouse ets genes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84(10):3161-3165
- [5] Bhat NK, Komschlies KL, Fujiwara S, et al. Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells [J]. J Immunol, 1989, 142(2):672-678
- [6] Kola I, Brookes S, Green AR, et al. The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(16):7588-7592
- [7] Ito Y, Miyoshi E, Takeda T, et al. Linkage of elevated ets-2 expression to hepatocarcinogenesis [J]. Anticancer Res, 2002, 22(4):2385-2389
- [8] Findlay VJ, Larue AC, Turner DP, et al. Understanding

- the role of ETS-mediated gene regulation in complex biological processes[J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 119(1): 1-61
- [9] Graves BJ, Petersen JM. Specificity within the ets family of transcription factors[J]. *Adv Cancer Res*, 1998, 75(1): 1-55
- [10] Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors[J]. *Gene*, 2003, 303(1): 11-34
- [11] Lelièvre E, Lionneton F, Soncin F, et al. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001, 33(4): 391-407
- [12] Ciau-Uitz A, Wang L, Patient R, et al. ETS transcription factors in hematopoietic stem cell development[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 51(4): 248-255
- [13] Luo Y, He F, Hu L, et al. Transcription factor Ets1 regulates expression of thioredoxin-interacting protein and inhibits insulin secretion in pancreatic β -cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99049
- [14] Dittmer J. The biology of the Ets1 proto-oncogene [J]. *Mol Cancer*, 2003, 2(1): 29
- [15] Seth A, Watson DK. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(16): 2462-2478
- [16] Nieuwkoop PD. The "organization centre". 3. Segregation and pattern formation in morphogenetic fields[J]. *Acta Biotheor*, 1967, 17(4): 178-194
- [17] Degnan BM, Degnan SM, Naganuma T, et al. The ets multigene family is conserved throughout the Metazoa [J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(15): 3479-3484
- [18] Pitarresi JR, Liu X, Sharma SM, et al. Stromal ETS2 regulates chemokine production and immune cell recruitment during Acinar-to-Ductal metaplasia[J]. *Neoplasia*, 2016, 18(9): 541-552
- [19] Birsoy K, Berry R, Wang T, et al. Analysis of gene networks in white adipose tissue development reveals a role for ETS2 in adipogenesis[J]. *Development*, 2011, 138(21): 4709-4719
- [20] Ferrés-Masó M, Sacilotto N, López-Rodas G, et al. PAPI signaling involves MAPK signal transduction[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(13): 2195-2204
- [21] Barton K, Muthusamy N, Fischer C, et al. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice[J]. *Immunity*, 1998, 9(4): 555-563
- [22] Eyquem S, Chemin K, Fasseu M, et al. The Ets-1 transcription factor is required for complete pre-T cell receptor function and allelic exclusion at the T cell receptor beta locus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(44): 15712-15717
- [23] Islas JF, Liu Y, Weng KC, et al. Transcription factors ETS2 and MESP1 transdifferentiate human dermal fibroblasts into cardiac progenitors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(32): 13016-13021
- [24] Wei G, Srinivasan R, Cantemir-Stone CZ, et al. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis [J]. *Blood*, 2009, 114(5): 1123-1130
- [25] Kabbout M, Dakhllallah D, Sharma S, et al. MicroRNA 17-92 cluster mediates ETS1 and ETS2-dependent RAS-oncogenic transformation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100693
- [26] Akinci E, Banga A, Tungatt K, et al. Reprogramming of various cell types to a beta-like state by Pdx1, Ngn3 and MafA[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e82424
- [27] Xuan S, Sussel L. GATA4 and GATA6 regulate pancreatic endoderm identity through inhibition of hedgehog signaling [J]. *Development*, 2016, 143(5): 780-786
- [28] Afelik S, Chen Y, Pieler T. Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(11): 1441-1446
- [29] Gradwohl G, Dierich A, Lemeur M, et al. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(4): 1607-1611
- [30] Kido Y, Nakae J, Hribal ML, et al. Effects of mutations in the insulin-like growth factor signaling system on embryonic pancreas development and beta-cell compensation to insulin resistance[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(39): 36740-36747
- [31] Li Y, Zhou QL, Sun W, et al. Non-canonical NF- κ B signaling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(10): 1327-1338
- [32] Chung WS, Shin CH, Stainier DY. Bmp2 signaling regulates the hepatic versus pancreatic fate decision [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(5): 738-748
- [33] Katagiri H, Imai J, Oka Y. Neural relay from the liver induces proliferation of pancreatic beta cells: a path to regenerative medicine using the self-renewal capabilities [J]. *Commun Integr Biol*, 2009, 2(5): 425-427