



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2019 년도 8 월
석사학위 논문

ETV2 에 의한 혈관평활근세포 이동 기전 규명

조선대학교 대학원

의 과 학 과

이 대 현

ETV2 에 의한 혈관평활근세포 이동 기전 규명

The role of ETV2 in vascular smooth
muscle cells migration

2019 년 8 월 23 일

조선대학교 대학원

의 과 학 과

이 대 현

ETV2 에 의한 혈관평활근세포 이동 기전 규명

지도교수 송 희 상

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2019 년 8 월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

이 대 현

이대현의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 방일수 (인)
위 원 조선대학교 교 수 이준식 (인)
위 원 조선대학교 부교수 송희상 (인)

2019 년 8 월

조선대학교 대학원

목 차

List of Table	1
List of Figures	2
Abstract	3
I. 서론	5
II. 연구재료 및 방법	9
1. 실험재료 및 시료 준비	9
2. 혈관평활근세포 분리 및 배양	9
3. ETV2 과발현 아데노바이러스 제작	10
4. ETV2 저해 siRNA 도입	10
5. ETV2 에 의한 혈관평활근세포의 이동성 분석	11
6. Western blotting	12
7. Gelatin zymography	13
8. Quantitative reverse transcription – polymerase chain reaction	13
9. Immunohistochemistry	14
10. 죽상동맥경화증 동물모델 (Balloon Injured rat-model)	14
11. 통계 분석	15

III. 연구 결과	17
1. Adenoviral ETV2 제작 및 ETV2-siRNA 도입	17
2. ETV2 과발현이 혈관평활근세포 이동에 미치는 영향.....	21
3. ETV2 과발현에 의한 MMPs 단백질 발현 변화	24
4. ETV2 과발현에 의한 MMPs mRNA 발현 변화	28
5. ETV2 silencing 에 의한 MMP9 단백질 발현 변화	31
6. ETV2 과발현에 의한 혈관평활근세포 표현형 변화	34
7. 풍선확장술을 시행한 동맥경화모델에서의 ETV2 발현	36
IV. 결론 및 고찰	42
V. 참고문헌.....	46

List of Table

Table 1. Primer sequences for qPCR analysis.....	16
--	----

List of Figures

Figure 1. Construction of ETV2 adenoviral vector and ETV2 silencing using siRNA.....	19
Figure 2. Effects of ETV2 overexpression on VSMCs.....	23
Figure 3. Altered protein levels of MMPs by ETV2 overexpression.....	26
Figure 4. Altered mRNA levels of MMPs by ETV2 overexpression.....	30
Figure 5. Altered protein levels of MMP9 by ETV2 silencing.....	33
Figure 6. Alteration of phenotypic makers in ETV2-overexpressed VSMCs	35
Figure 7. Expression levels of ETV2 in balloon-injured rat carotid artery.....	38

Abstract

The role of ETV2 in vascular smooth muscle cells migration

Dae Hyeon Lee

Advisor : Associate Prof. Heesang Song, Ph.D.

Department of Medical Science

Chosun University Graduate School

The ETS (E-twenty six) family of transcription factors consist of 12 subfamilies. Among the ETS factors, ETV2 is transiently expressed and known to play a key role in angiogenesis during embryonic development. However, it is not expressed in the adult. Recently, ETV2 has been found that damaged tissues of the adult are expressed for improved vascular regeneration and remodeling. In this study, the role of ETV2 was confirmed in the process of migration and proliferation vascular smooth muscle cells (VSMCs), the cause of arteriosclerosis and restenosis. First, ETV2 adenoviral vectors were constructed, VSMCs in ETV2 overexpression and inhibitor were identified, MMP9 upregulation by ETV2 overexpression and MMP9 downregulation by silencing were confirmed. In addition, ETV2 overexpression shown the phenotype change in VSMCs, as the expression level of contractile maker α -SMA, Myocd were decreased, while the expression level of synthesis maker Connexin43 was increased, the confirming the effect of

phenotype control of VSMCs by ETV2 regulation. Furthermore, the expression of ETV2 was confirmed in rat model with balloon injury and VSMCs specificity.

In conclusion, the present result demonstrated that ETV2 activated MMP9 induce cell migration in VSMCs. Furthermore, Effect of ETV2 overexpression has necessary to study in detail the effects on VSMCs.

I. 서론

심혈관질환 중 하나인 죽상동맥경화증은 혈관벽에 단순히 지질이 침착되어 발생하는 질병으로 인식하였으나, 최근에는 내피세포, 면역세포, 혈관평활근세포의 염증작용에 따른 혈관 내부의 조직적 변화로 알려졌다.[1] 비정상적인 콜레스테롤 수치, 비만, 고혈압, 당뇨병 등 다양한 위험인자에 노출된 혈관내피세포는 화학적 기계적, 면역학적 반응을 통해서 손상을 받게 되고 산화된 LDL 콜레스테롤 및 여러 부착분자가 복합적으로 작용하여 최종적으로 대식세포, T 림프구, 혈관평활근세포에 지속적인 만성 염증반응을 야기함으로써 죽상동맥경화를 일으키게 된다.[2] 이렇게 발생하는 죽상동맥경화증에 관련된 다양한 인자들이 예측 가능한 표지자가 될 수 있고, 죽상동맥경화증의 활성도에 따라 질병의 발생기전에 중요하게 작용하기 때문에 많은 연구들이 진행되어 오고 있다. 죽상동맥경화의 병리학적 변화에 있어 면역반응에 의한 염증반응으로 형성된 단순한 지방덩어리인 지방선조가 더욱 심한 병변인 지방반, 플라크로 진행하게 되면서, 이 때 혈관중간층에 위치하고 있던 혈관평활근세포가 형질변화에 따라 증식하게 되고 혈관 내막으로 이동한다. 초기 동맥경화 진행의 단계는 혈관평활근세포의 이동으로부터 시작되며, 혈관평활근세포 형질변화에 growth factor, cytokine, shear stress, 지질 등의 다양한 인자들에 의해서 작용한다.[1, 3, 4] 그 중 Matrix metalloproteinase (MMP)는 성장인자와 세포-기질 상호작용 및 세포-세포간의 상호작용을 유도하는데 주요한 역할을 하며, 혈관평활근세포의 이동과 증식 및 생존여부를 담당하는 단백질분해효소로써 이 과정에서 세포 외막을 분해하여

세포외기질의 재구성을 통해서 혈관평활근세포에 영향을 주고, 죽상동맥경화증 병변에서 세포외기질을 분해시키는 작용을 통해 plaque 형성에 관여한다.[5] 특히 마우스 모델에서 동맥경화를 일으켰을 때, MMP2 와 MMP9 이 활성화되면서, 혈관평활근세포의 이동 및 증식에 크게 관여한다는 연구결과가 밝혀졌다.[6, 7] 이와 같이 죽상동맥경화증의 병리학적 변화의 핵심은 혈관평활근세포의 형질변화에서부터 시작되어, 혈관평활근세포의 증식 및 이동을 조절하는 핵심 조절자를 찾아 그 기전을 규명하는 것이 필요한 바, 그 핵심조절자로서 ETV2에 의한 혈관평활근세포의 이동 기전을 밝히고자 하였다.

ETS (E26 transformation-specific) 전사인자 중 하나인 ETV2는 배아발생 동안 난황낭, 혈도, 큰 혈관 등을 포함하는 등대동맥에서 일시적으로 발현하는 것으로 알려졌다.[8-10] 이와 관련된 논문에서 zebrafish 및 mouse의 배아발생과정에서 혈관형성에 관여하는 혈액내피세포와 조혈세포가 분화하는데, ETV2가 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며[11-13], ETV2를 결핍시킨 임신쥐에서 혈액내피세포 및 조혈세포가 분화되지 않아 혈구세포 및 심내막형성이 차단되어 태아발생 10 일경에 유산된다는 것이 밝혀졌다. [11-13] 즉 ETV2는 배아발생과정에서 조혈 및 혈관 발달에 필수적인 기능을 담당한다.[14] 그러나 ETV2가 배아발생단계에서 뿐만 아니라, 손상된 조직에서도 발현된다는 것이 밝혀졌는데, 정상적인 혈관상태가 아닌 손상된 혈관에서 ETV2를 결핍하여 관찰한 결과 기존의 손상된 혈관의 조건에서 더 손상되는 결과를 나타냈으며, 쥐의 뒷다리를 묶어 하지허혈을 유도시킨 후 ETV2 바이러스를 주입하였을 때 혈관신생 관련 유전자의 발현이 증가하며, 혈관재생이 향상되었다.[15] 또한 심근경색 질환치료에 ETV2가 크게 영향을 주는 연구

가 보고 되었는데, 심근경색 유도 동물모델의 허혈성 심장에 ETV2 바이러스를 주입 시킨 후 관찰한 결과 허혈성 심장 부근에 내피세포 이동을 촉진시켜서 심혈관 기능이 향상되고, 혈관재생을 통해 다량의 섬유증으로부터 보호된 것을 확인하였다.[16, 17] 그 외에도 ETV2가 중앙혈관신생에서 크게 영향을 미치는 것이 밝혀졌는데, 혈관신생은 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관의 형성으로 중앙성장에 크게 영향을 미치므로, 중앙성장에 방해하는 수단으로 혈관신생을 억제하고자 혈관신생에 관련 있는 ETV2를 결핍하여 중앙혈관신생 억제에 영향을 주었다.[18] 최근에는 인간은 피부섬유종에 있는 세포인 체세포를 줄기세포로 변형시키는 역분화줄기세포 단계를 거쳐 세포 변환을 일으키는데,[19, 20] ETV2가 담당하며 최종적으로 체세포에서 혈관내피세포로 변형시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다.[21] 이와 같이 혈관신생과정에 따라 큰 영향을 주는 ETV2는 단순히 배아발생 과정에서 조혈 및 혈관신생의 관련성뿐만 아니라 생후의 병리적 발달과정에서 혈관신생 및 재생으로써의 역할을 하는 것을 알 수 있다. 또한 FLK1은 VEGF 수용체로서 혈관신생에 관여한다고 이미 알려져 있으며,[22] FLK1과 ETV2가 내피세포에서 혈관신생과정에 상호작용한다는 것이 최근에 밝혀졌다.[23-25] 그러나 기존의 연구들은 혈관내피세포에 대한 ETV2의 연구로서, 혈관구성의 또 다른 중요한 세포인 혈관평활근세포에 대한 연구결과는 없었다. 또한 몇몇 실험들을 통해서 혈관평활근세포의 이동이 FLK1을 통해서 유도되어 이동된다고 알려져 있으나,[26] ETV2에 대해서는 혈관평활근세포에 의한 관련성을 밝혀내지 못하였다. 그러므로 본 연구에서는 ETV2가 혈관평활근세포의 이동에 미치는 영향과 그 발생 기전에서 구체적인 신호전달을 확인하고자 하였다. 이를 위해 본 연구에서 ETV2가 혈관평활근세

포의 이동성 및 증식성을 확인하고, MMP발현 정도 및 족상동맥경화증에서 ETV2가 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 시료준비

혈관평활근세포 배양에 사용한 DMEM (Dubecco's Modified Eagle's Medium)와 FBS (Fetal bovine serum), penicillin-streptomycin 및 trypsin-EDTA는 Capricorn 사로부터 구입하였고 SMGs (selective submandibular glands)는 Gibco사에서 구입하였다. Anti-MMP2와 Anti-MMP9, Anti-ETV2는 Abcam사이며 Anti-SMA는 Santa Cruz biotechnology사, Anti- β -actin은 Sigma-Aldrich사로부터 구입하였다.

2. 혈관평활근세포 분리 및 배양

생후 6주령 수컷 Sprague-Dawley rat (Charles River Japan, Hino, Japan)에서 흉부대동맥을 적출하여 0.1 % penicillin streptomycin을 포함하는 DMEM (Dubecco's modified Eagle's medium)에서 주위의 결합조직 및 지방조직과 혈액을 제거하고 1mg/ml의 collagenase type I과 0.5 mg/ml의 elastase가 혼합된 DMEM에 넣고 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 세포 외막을 분리해낸 뒤 조각을 내어 새로운 collagenase와 elastase 혼합액에서 2시간 반응시켰다.

효소소합법으로 분리되어 나온 혈관평활근세포 (vascular smooth muscle cell)를 1,600 rpm으로 원심분리하여 침전시키고 얻어진 세포를 0.1 % penicillin streptomycin과 10 % FBS를 함유한 DMEM에서 분산시킨 뒤 다시 1,600 rpm으로 원심분리하여 얻어진 세포를 10 % FBS DMEM에 충분히 분산시켜 CO₂ 배양기에서

배양하였다. 계대배양은 0.05 % Trypsin-EDTA용액으로 처리하여 시행하였으며, 모든 실험에 사용된 세포는 시료를 처리하기에 앞서 10 % FBS가 포함된 DMEM, 5 % SMGS에서 24시간 동안 배양한 것으로 동일한 조건에서 각 실험이 수행되었다.

3. ETV2 과발현 아데노바이러스 제작

ETV2 과발현 아데노바이러스는 Invitrogen 사의 ViraPower™ 아데노바이러스 발현시스템을 이용하여 제작하였으며, pcDNA vector 에 ETV2 가 삽입된 vector 와 pENTR1A dual selection vector 를 이용하여, 공통 제한효소를 통해 타겟된 ETV2 를 pENTR1A dual selection vector 에 삽입을 통해 결합한다 결합 된 vector 와 아데노바이러스제작 vector 인 pAd/CMV/V5/DEST vector 를 복제시킨 뒤, LR recombination 시킨다. 제한 효소 Pac I 을 통해 소화시켜 최종적으로 ETV2 아데노바이러스 vector 를 Invitrogen 사의 Lipofectamin 2000 reagent 이용하여 293A 세포에 감염시킨다. 이후 Takara 사의 qPCR titration kit 를 이용하여 아데노바이러스 입자의 MOI (multiplicity of infection) 값을 측정한다. 혈관평활근세포에서 MOI 값은 4~14 MOI 로 감염시켜 실험을 진행하였다.

4. ETV2 저해 siRNA 도입

먼저 단일가닥의 ETV2의 특이적인 sense와 antisense RNA oligonucleotides를 합성시킨 후 RNA분자를 발생시키는 이중가닥을 제작하는데, ETV2 -siRNA sequence는 5'-GCC AAA UUA GGC UUC UGU UUC-3' 로 배열되어 있으며, 혈관평활근세포가 80 %이상 배지에 자랐을 때, 40 nM ETV2-siRNA를 처리

하여 48시간 감염시켰다.

5. ETV2 에 의한 혈관평활근세포의 이동성 분석

VSMC의 이동 분석은 2차원의 Wound healing assay와 3차원의 Boyden chamber assay를 사용하여 측정하였다. 여기서 Boyden chamber는 24well plate에 사용되는 8.0 μm pore, 6.5 mm 직경의 transwell chamber이다.

먼저 각 군의 VSMC를 10 % FBS와 5 % SMGS를 함유한 DMEM에서 24시간 동안 사전 배양하여 휴면상태로 만들고, Trypsin-EDTA를 처리하여 동일한 조건의 DMEM에서 수량을 측정한다. 2차원과 3차원을 이용하는 방법이 여기서부터 달라지며, 2차원적 방법에서는 6 well 내부에 2.5×10^5 cells/2ml의 세포 부유액을 첨가한다. 24시간 후에 adenovirus hER71을 처리하여 하루 동안 관찰 후, 기존의 배양액을 수거하고 1 % FBS와 5 % SMGS를 함유한 DMEM을 넣고 24시간이 지난 후에 정중앙에 Wound healing을 통해 세포 이동을 측정한다. 3차원적 방법은 upper chamber의 polycarbonate filter에 gelatin coating을 실행하는데, 1 % gelatin을 1시간 동안 coating하고나서 DMEM에 들어 있는 세포 수량을 측정하여, upper chamber의 insert 내부에 4×10^3 cells/100 μl 의 세포 부유액을 첨가한 다음, Low chamber에는 VSMC의 이동을 유도하는 conditioned medium으로 사용된 upper chamber의 세포 부유액과 유사한 serum 갖는 1 % FBS를 함유한 DMEM에 VSMC에 migration을 유도한다고 알려진 PDGF 1 ng을 첨가하여 각 well당 600ul씩 넣은 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 %CO₂ 배양기에서 8시간, 24시간 동안 배양하였다. 이 후에 filter의 아랫부분을 고정하고 염색한 후에 insert부분에 면봉으로 조심히 닦아 이동하지 않은

세포를 제거한 뒤 광학현미경을 이용하여 200배율로 관찰하였으며, well당 9개의 현미경 시야에 관찰된 세포 수를 정량화하였다.

6. Western blotting

각 군의 혈관평활근세포를 PBS (Phosphate buffered saline)로 세척한 후 세포를 수집하여 1mM PMSF를 함유한 RIPA buffer (1mM PMSF, protease inhibitor)을 이용하여 용해시킨 후 세포 용해액을 14,000rpm 에서 10분간 원심분리하여 상층액을 모아 Bradford protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 단백질 농도를 측정 및 총 단백질정량을 확인하였다. 같은 양의 단백질을 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 loading하여 전기영동 후, 원하는 band size에 맞게 gel을 자른 다음, PVDF (polyvinylidene difluoride) transfer membrane 과 transfer buffer (20 mM Trizma® base, 190 mM Glycine, 20% Methanol)를 사용하여 전기적으로 단백질을 이동, 고정시켰다. 전기이동된 membrane에 5% skim milk 와 TBS-T (Tris buffered saline- 0.1 % Tween 20)를 넣어 1시간 동안 반응시켜 항체의 비특이적인 결합을 차단한 뒤, 대상이 되는 단백질의 항체 ETV2, MMP2, MMP9, β -actin으로 24시간 반응시켰다. 이어서 TBS-t용액으로 5분 간격으로 5회 세척한 후 2차 항체로 1시간 30분 동안 반응시킨 뒤, ECL (Enhanced chemiluminescence reagent, BIONOT, Animal genetics ins.)를 반응시켜 X-ray film상에 나타나는 band의 크기를 통해 단백질 발현 정도를 확인하였다. Band 크기는 Image J를 이용하여 분석, 정량화하여 나타내었다.

7. Gelatin zymography

Gelatin zymography는 Conditioned cultured medium안의 MMP2 (gelatinase A)와 MMP9 (gelatinase B)의 gelatin 분해 활성을 알아보기 위한 실험으로, 세포 내 포함된 단백질분해효소 MMP가 gel 내의 gelatin을 분해하여 gelatin을 염색하였을 때 나타나는 band의 효소의 활성 정도를 정량화시킬 수 있다. VSMC에 각 실험군을 처리하여 48시간 배양한 배양액을 수집하여 상층액을 얻어 0.8%의 gelatin을 첨가한 10% SDS-polyacrylamide gel에 loading하여 4 °C에서 5시간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 2.5% Triton X-100으로 실온에서 30분간 2회에 세척 후 MMP계열들을 활성화시키기 위해 developing buffer (50Mm Tris-HCL, pH 7.5, 5Mm CaCl₂, 1uM ZnCl₂, 0.02 % sodium azide, 1 % Triton X-100)로 37 °C 배양기에서 반응시킨 후 1 % Coomassie blue로 염색하고 나서 destaining buffer로 분해된 gelatin band가 보일 때까지 세척 후 gel을 확인하였다. Band의 정량은 laser densitometry를 통하여 분석하였다.

8. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Total RNA는 TRIzol lysis reagent 방법에 의하여 분리한 후 spectrophotometer을 이용하여 260 nm에서 RNA양을 측정하였다. 그 후 total RNA는 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. qPCR 반응은 RealHelix™ qPCR kit를 사용하여 Rotor-Gene 3000™을 이용하였고 조건은 95 °C에서 15분, 95 °C 30 sec, 62 °C 20 sec, 70 °C 20 sec 로 40 cycle를 수행하였다. qPCR에 사용한 primer 서열은

table 1에 나타내었다.

9. Immunohistochemistry

BI (Balloon injury)방법을 통해서 유도한 쥐를 조건부로 나누어서 BI에 의해 자극된 경동맥을 얻어 혈전을 제거 후 4 % para-formaldehyde에 하루 동안 보관하여 processing과정을 거쳐 paraffin block을 만든다. 실험에 필요한 조건에 맞춰 paraffin block을 section하여 슬라이드 판에 붙여서 하루 정도 말렸다. 슬라이드에 부착된 조직을 55~60 °C에 1~3시간동안 수분을 제거하고 Xylene에 5분간 3회씩 묻힌 조직 제외한 paraffin들을 제거하고 순차적으로 ethanol에 샘플들을 넣고 증류수로 세척하여 Ag retrieval 단계에서 샘플 슬라이드를 Ag retrieval buffer 95 °C에서 5분간 4회반복하여 1시간이상 충분히 식혀두었다. 샘플 슬라이드를 증류수로 세척한 후 3 % H₂O₂ 를 첨가한 증류수에 샘플 슬라이드를 10분 처리 후 증류수와 PBS로 3회 세척 후 blocking buffer를 1시간동안 반응시켜 조직에 항체의 비특이적인 결합을 차단한 후 대상이 되는 단백질의 항체 ER71과 α-SMA를 24시간 반응시켰다. 이어서 PBS로 3회 세척 후 2차 항체로 2시간 반응시킨 뒤, DAP처리 후 Hematopoietic 염색하여 흐르는 증류수에 10~15분 세척하고 ethanol에서 xylene으로 순차적으로 담군 후에 mounting하였다.

10. 죽상동맥경화증 동물모델 (Balloon Injured rat model)

죽상동맥경화증 유도는 BI (Balloon injury)방법을 통해서 유도하였다. 일반적인 마취 하에 7주형 Sparague-Dawley 수컷 쥐 (약 250g)의 경동맥주변의 근육

층 및 피부를 절개한 후에 1cc 주사기에 부착된 balloon injury catheter를 경동맥에 삽입하여 5~10회 위아래로 반복하여 자극을 준 후 다시 근육층과 피부층을 4-0 비단 봉합사로 묶고 사육실에서 정상적인 환경으로 키웠다.

11. 통계분석

모든 결과는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계적 유의성은 Student' t-test로 검증하였다. 모든 경우 $P < 0.05$ 일 때 유의적인 차이가 이는 것으로 판정하였다.

Table 1. Primer sequences for qPCR analysis

Gene	Primer sequence
<i>GAPDH</i>	Sence: 5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT-3'
	Antisense: 5'-TGGTAACCAGGCGTCCGATA-3'
<i>hER71</i>	Sence: 5'-CGAGTTGAACCTTCCCACAA-3'
	Antisense: 5'-AGGAGATGAGGTAGCCGATGAA-3'
<i>MMP2</i>	Sence: 5'-CATCCTGAACCCTCACATCCA-3'
	Antisense: 5'-CCGCATCCAGGTAAGTACTGAGAGTGAT-3'
<i>MMP9</i>	Sence: 5'-CAAACAGGGCAGAAGACACC-3'
	Antisense: 5'-CTCTGAGGGTGCTCCACCT-3'
<i>MMP13</i>	Sence: 5'-AGCAAGGCGGCTTCTCTTTT-3'
	Antisense: 5'-GCTGGTCTGTCTCCTTCATGT-3'
α -SMA	Sence: 5'-CACTACGAGGATGCTTGTGG-3'
	Antisense: 5'-CCTTCTTCTCATACTCTTCGT-3'
<i>vWF</i>	Sence: 5'-CAAACAGGGCAGAAGACACC-3'
	Antisense: 5'-CTCTGAGGGTGCTCCACCT-3'
<i>CD31</i>	Sence: 5'-AGCAAGGCGGCTTCTCTTTT-3'
	Antisense: 5'-GCTGGTCTGTCTCCTTCATGT-3'
<i>CD34</i>	Sence: 5'-CACTACGAGGATGCTTGTGG-3'
	Antisense: 5'-CCTTCTTCTCATACTCTTCGT-3'

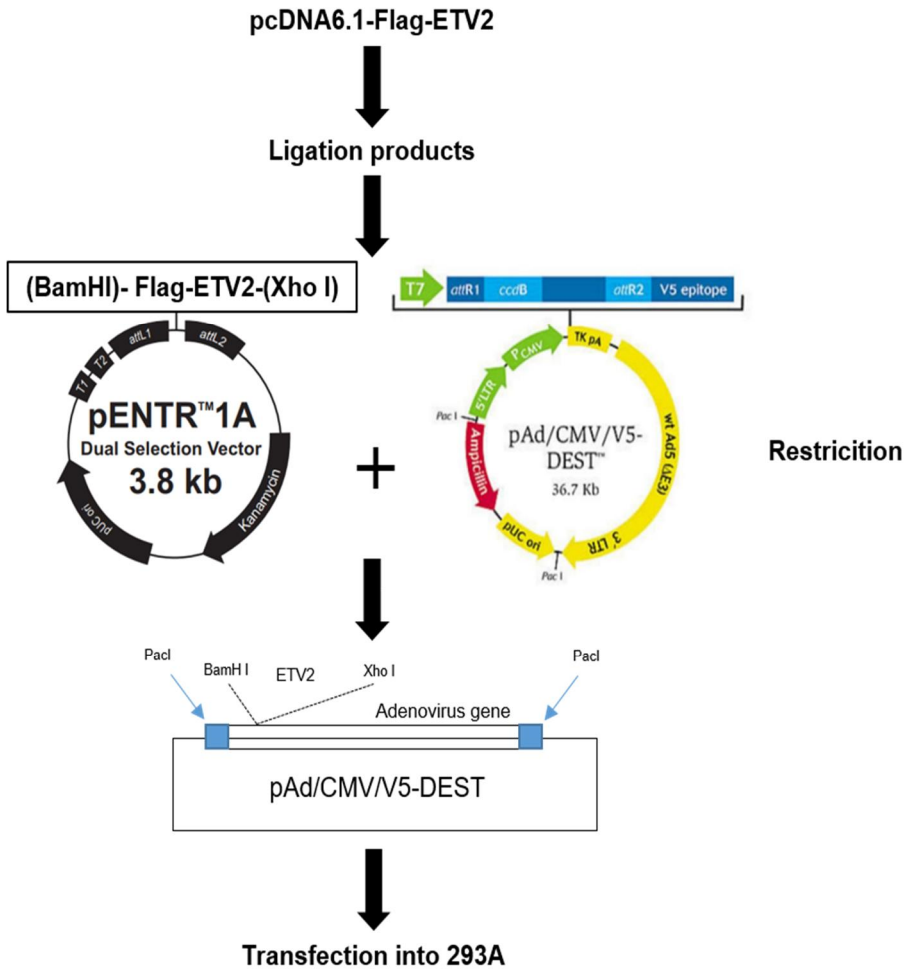
III. 연구 결과

1. Adenoviral ETV2 제작 및 ETV2-siRNA 도입

혈관평활근세포의 증식 및 이동에서 ETV2의 역할을 규명하기 위해서 Flag가 tagging된 ETV2 adenovirus를 제작하였다. Figure 1A에서 ETV2가 target된 plasmid vector에 adenovirus를 만드는 plasmid vector인 pAd/CMV/V5-DEST vector에 ETV2를 삽입을 위해 효소를 처리하여 자른 후 target 된 ETV2를 ligation 방법에 의해 삽입하여 Transformation시킨다. 그 후 Pac I 으로 digestion 시킨 후, 얻은 pellet을 293A 세포에 감염시켜, adenovirus를 제작하였다.

Figure 1B는 혈관평활근세포에서 발현되지 않는 ETV2가 adenovirus를 농도의존적으로 처리함으로써 과발현 되었음을 anti-Flag를 이용한 western blotting을 통해 확인하였다. 또한 siLentFect™ Lipid Reagent를 이용하여 ETV2를 성공적으로 silencing을 시킴을 확인하였다.

(A)



(B)

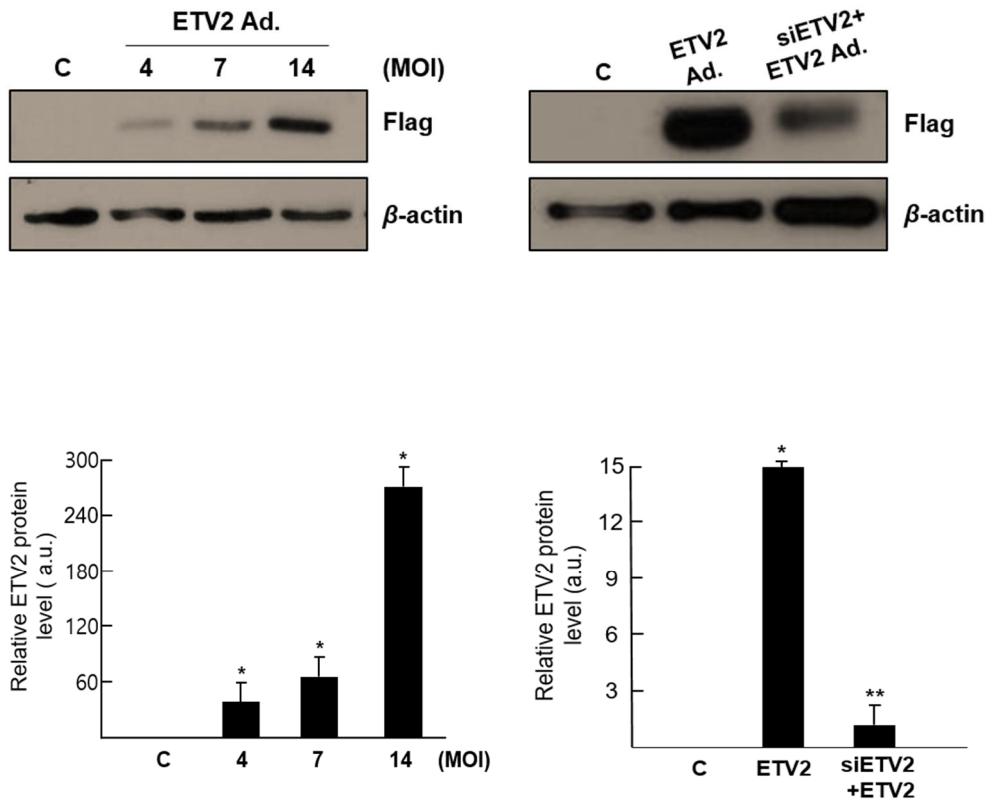


Figure 1. Construction of ETV2 adenoviral vector and ETV2 silencing using siRNA.

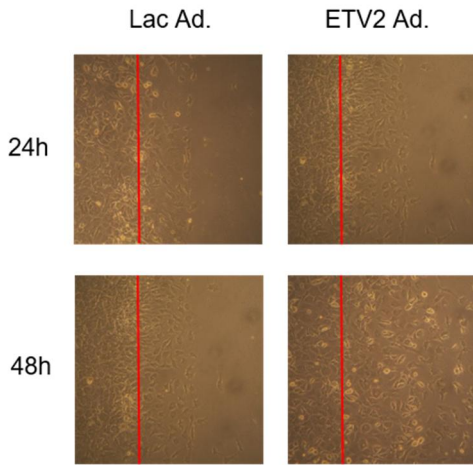
(A) The ETV2 overexpression adenovirus was generated using a ViraPower™ adenovirus expression. ETV2 in the pcDNA construct was kindly provided by Dr.Changwon Park, which was cloned in the pENTR1A dual selection vector. An adenoviral vector expressing LacZ- β -galactosidase was used as the control and was named LacZ Ad. The construction were generate an adenoviral expression clone. Then, the constructed adenoviral vector was transfected into 293A cells using Lipofectamin 2000 reagent after digesting with the

Pac I restriction enzyme. Adenoviral particles were tittered at a multiplicity of infection (MOI) using the Adeno-X™ qPCR titration kit. VSMCs were infected with adenoviruses at MOI of 4 and 14 for 48h. VSMCs viability was measured using the Western blot. (* $p < 0.05$) (B) VSMCs were treated with 40nM ETV2-siRNA at the indicated concentrations for 72h. VSMCs viability was measured using the Western blot. * $p < 0.05$ cells treated with transfected with ETV2 adenovirus. ** $p < 0.05$ cells treated with transfected with siETV2.

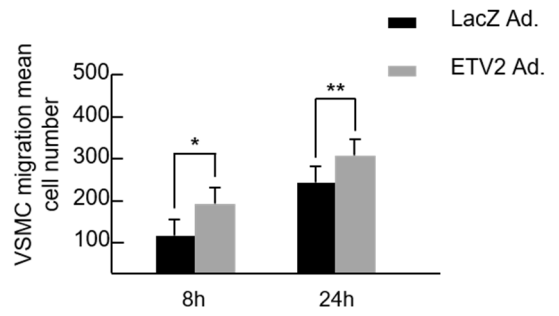
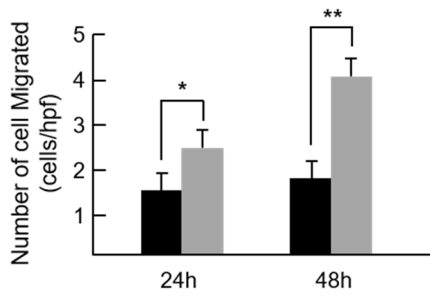
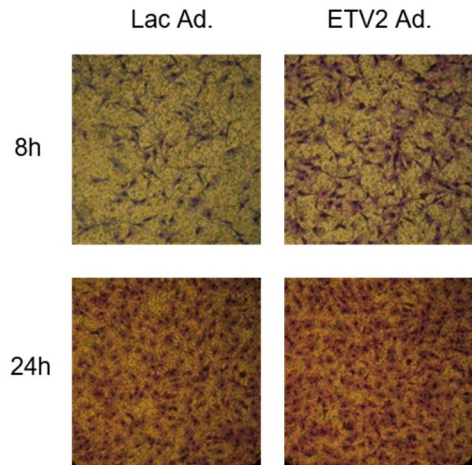
2. ETV2 과발현이 혈관평활근세포 이동에 미치는 영향

ETV2 adenovirus를 제작하여 MOI값을 정한 후 혈관평활근세포에 ETV2를 과발현시켜 Wound-healing assay (2-D), Boyden chamber assay (3-D) 및 BrdU assay를 통해 혈관평활근세포의 이동 및 증식성을 확인하였다. Figure 2A는 혈관평활근세포에 ETV2 과발현시켜 24시간 뒤에 세포 영향 확인을 위해, wound healing 시킨 후 24~48시간 경과를 관찰한 사진으로 대조군에 비해 ETV2 adenovirus 처리한 부분에서 이동 증가에 대한 유의적인 효과를 나타냈으며, Figure 2B는 대조군과 ETV2 과발현된 혈관평활근세포에서 boyden chamber를 이용하여 8, 24시간 간격으로 혈관평활근세포의 이동을 분석한 결과, Figure 2A와 유사하게 ETV2 과발현된 부분에 현저한 이동성증가를 확인하였다. Figure 2C는 BrdU assay를 이용하여 대조군 과 LacZ, ETV2 adenovirus를 처리한 혈관평활근세포를 24,48,72시간 관찰한 결과 ETV2가 혈관평활근세포 증식에서 유의적인 변화를 확인할 수 없었으며, 이는 ETV2 과발현이 혈관평활근세포 이동성을 특이적으로 조절한다는 것을 보여주는 결과이다.

(A)



(B)



(C)

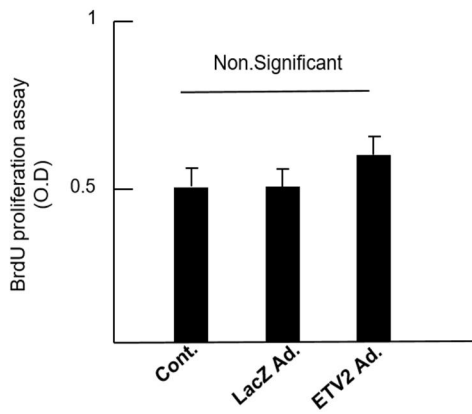


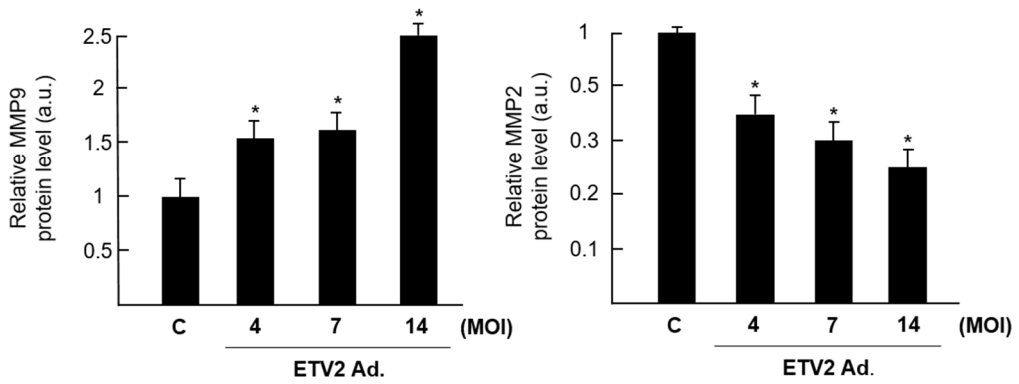
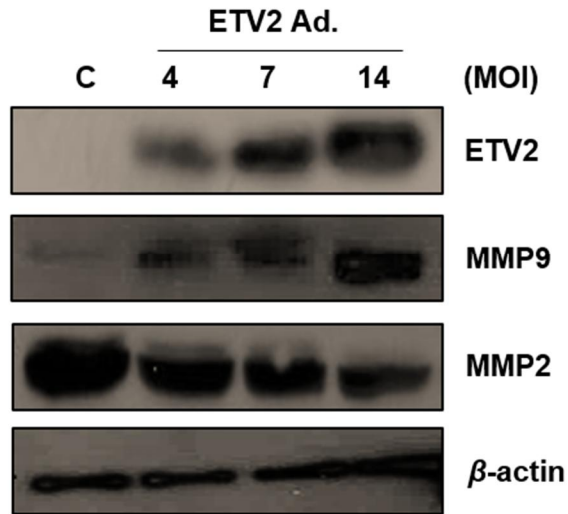
Figure 2. Effects of ETV2 overexpression on VSMCs.

(A) Two-dimensional assays were performed 24h or 48h later in LacZ Ad. or ETV2 Ad. treated to 24h wound healing. The cells migrating to the surface of membrane were examined original magnification X200. Two different areas of migrated cells were counted for each data point. The asterisk indicates a significant difference ($*p<0.05$). (B) Three-dimensional assay were performed 24h later VSMCs in LacZ and ETV2 adenovirus, after chemotaxis chamber for 24h with polycarbonate membrane coated with DMEM (containing 1% FBS ,1% SMGS) and designated concentrations of conditioned medium in the lower well. The cells migrating to the lower surface of the membrane were examined original magnification X200. Two different areas of migrated cells were counted for each data point. The asterisk indicates a significant difference ($*p<0.05$). (C) The VSMCs were treated LacZ and ETV2 adenovirus for 24h later proliferation assay was performed.

3. ETV2 과발현에 의한 MMPs 단백질 발현 변화

기존 논문에서 MMP계열은 혈관평활근세포의 이동 및 증식을 담당하는 단백질분해효소로 알려졌으며,[5] MMP2, MMP9의 활성 조절에 의해 이동성이 변화되는 것이 밝혀졌다. 또한 Figure 2A, 2B에서 Wound healing assay (2D) 및 Boyden chamber assay (3D)를 통해서 ETV2가 혈관평활근세포의 이동을 관여하는 것을 확인한 바, ETV2 조절에 의한 혈관평활근세포 이동을 유도하는 타겟 유전자 중 대표적인 MMP2, MMP9의 단백질 발현변화를 확인하고자, Western blotting 과 zymography를 시행하였다. Figure 3A에서 보는 바와 같이, 혈관평활근세포에 ETV2 adenovirus를 농도의존적으로 처리하여 anti-MMP2, anti-MMP9를 이용하여 Western blotting 실험을 진행한 결과, Figure 3A에서 MMP9에서는 농도 의존적으로 현저한 단백질 발현 증가를 확인하였으며, MMP2에서는 증가된 MMP9와 상반되는 결과가 나타났다. Figure 3B에서는 Conditioned cultured medium안의 MMP2 (gelatinase A)와 MMP9 (gelatinase B)의 gelatin 분해 활성을 알아보기 위한 실험으로 대조군과 ETV2 과발현시킨 cultured medium을 통해 MMP2와 MMP9의 활성을 비교하고자 진행한 결과이며, 보는 바와 같이 MMP9에서는 대조군 보다 ETV2 과발현된 medium에서 현저한 증가를 보였으나, MMP2와 비교시 유의적인 변화를 볼 수 없었다. 이러한 결과를 통해서, ETV2과발현에 의한 혈관평활근세포 이동 증가가 MMP9 특이적이라는 것을 보여주는 것이다.

(A)



(B)

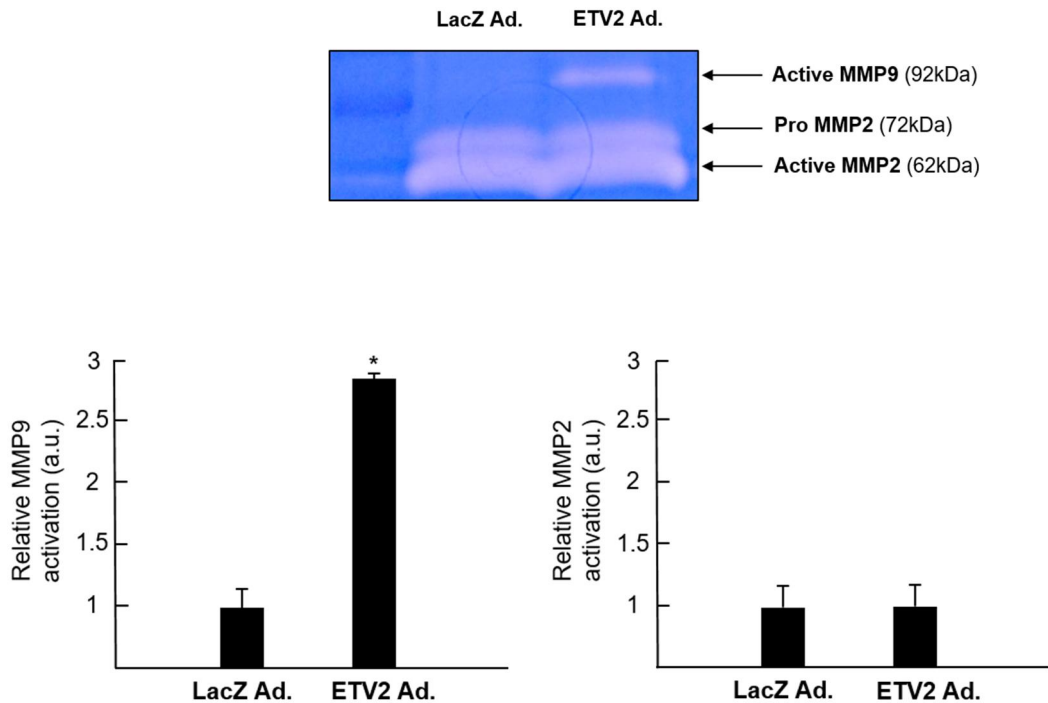


Figure 3. Altered protein levels of MMPs by ETV2 overexpression.

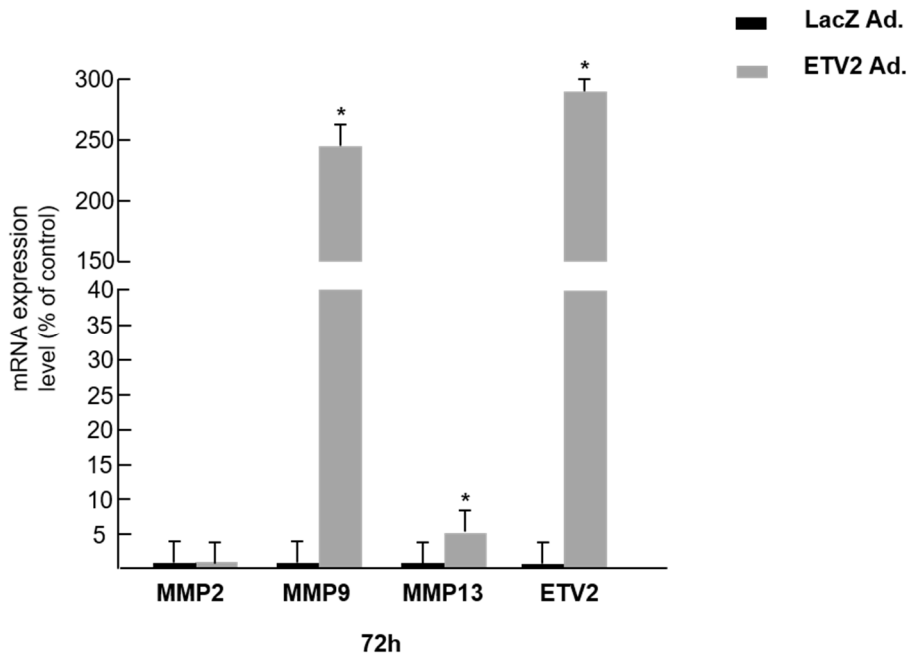
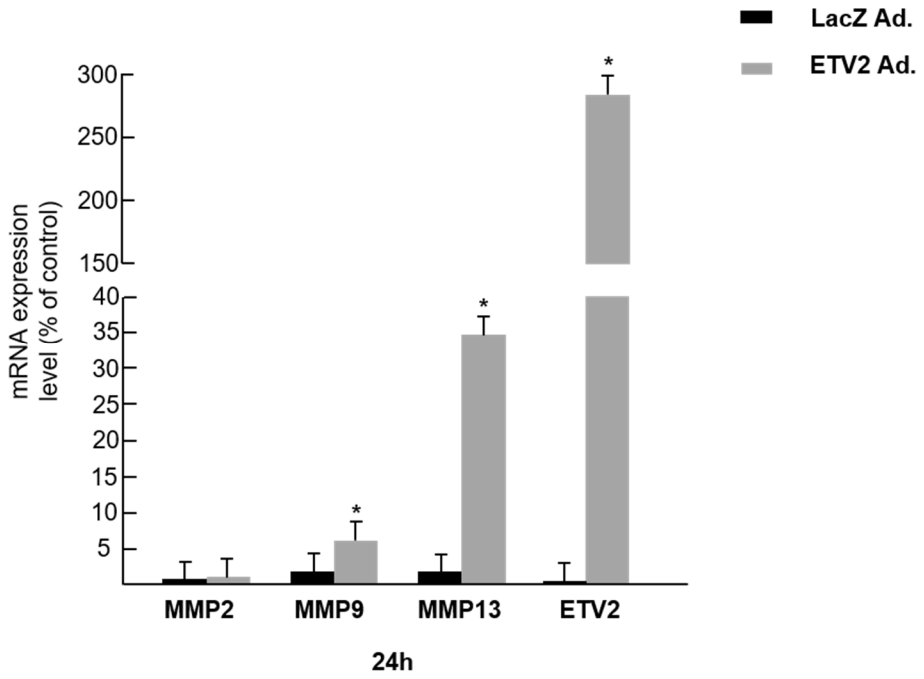
(A) The overexpression ETV2 of MMP2 and MMP9 activity were measured using the Western blot. The band density was normalized with β -actin (internal controls). The total protein loaded per lane was 50 μ g: detection of ETV2 and loaded per lane was 50 μ g: detection MMP2 and loaded per lane was 60 μ g: detection MMP9 and loaded per lane was 5 μ g: detection β -actin. Histogram showing average data for MMP2, MMP9 protein in the control, positive control and the treated each sample (ETV2) in dose-dependent. Densitometry analysis of three independent western blot shows quantitation of MMP2, MMP9 levels (n=4.7, 14MOI) * p <0.05 versus the control. (B) The LacZ or overexpression ETV2 media were

prepared and used for gelatin zymography. Histogram showing average data for MMP2, MMP9 activity in the control, the treated each sample (LacZ, ETV2) in dose (n=4 MOI). Densitometry analysis of three independent zymography shows quantitation of MMP2, MMP9 level. * $p < 0.05$ versus the control.

4. ETV2 과발현에 의한 MMPs mRNA 발현 변화

더 나아가, ETV2 과발현에 의한 MMP9의 transcription level에서 조절되는 지 확인하기 위해 mRNA level과 promoter activity를 조사하였다. Figure 4A에서 나타낸 바와 같이 혈관평활근세포에서 LacZ와 ETV2를 처리한 세포에서 mRNA level을 확인한 결과로 24시간과 72시간을 비교하였을 때 세포내 ETV2과발현 시 24시간 후에 MMP9, 13의 mRNA level이 현저히 증가하였으며, MMP2는 유의적인 변화를 볼 수 없었다. 특히 MMP9은 24시간에 비해 72시간에서 크게 증가되었으며, 48시간에서는 24시간에서의 결과와 유사함을 확인하였다. (data not shown) Figure 4B는 혈관평활근세포에 LacZ와 ETV2 adenovirus를 처리한 뒤, 각각의 human MMP9, rat MMP9 promoter vector를 감염시켜 luciferase assay kit를 이용하여 확인한 결과, ETV2과발현 시 12시간과 24시간 후에 hMMP9, rMMP9 promoter의 activity가 현저히 증가됨을 확인하였다. 이는 ETV2 과발현에 의한 signal이 MMP9의 transcription level에서 조절된다는 것을 보여주는 것이다.

(A)



(B)

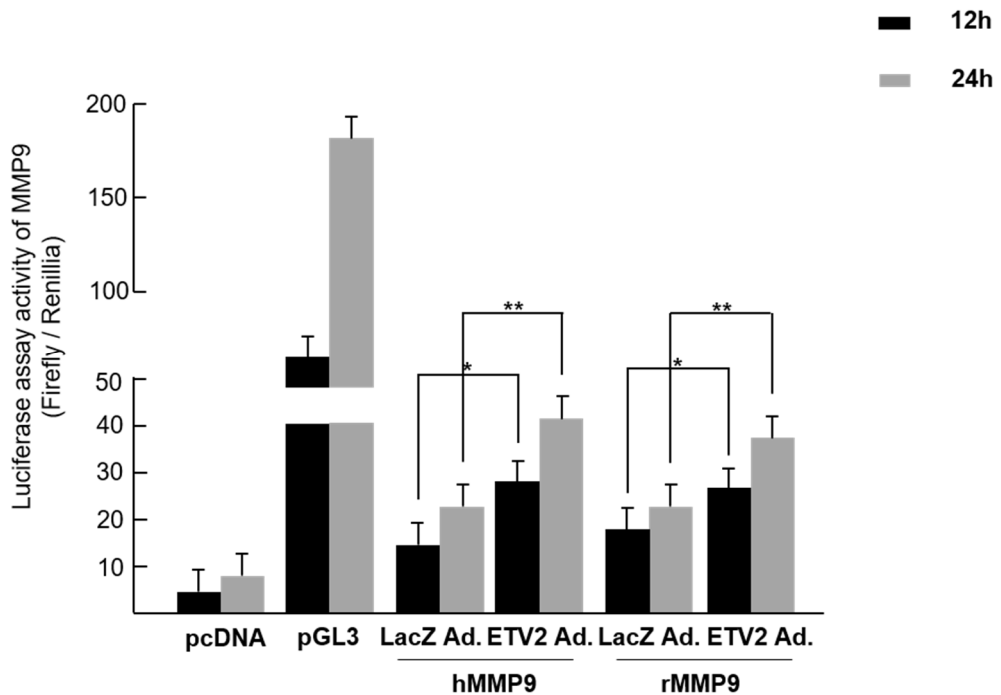


Figure 4. Altered mRNA levels of MMPs by ETV2 overexpression.

(A) MMP2, MMP9, MMP13 mRNA levels were measured by quantitative real time PCR. Rat VSMCs were treated for 24, 72h with ETV2. The mRNA levels were normalized to GAPDH. The mRNA levels of MMP9, MMP13 were increased in VSMCs treated ETV2. Values are presented as mean \pm S.D. * p <0.05 versus the control. (B) Analysis of human MMP9, rat MMP9 promoter activity using the dual luciferase assay. Values are presented as mean \pm S.D. * p <0.05 versus the control.

5. ETV2 silencing 에 의한 MMP9 단백질 발현 변화

Figure 3,4의 결과에서, ETV2과발현을 통해서 특정 타겟 유전자인 MMP9의 발현이 증가된 결과를 얻은바, 반대로 ETV2발현을 저해시켰을 경우, MMP2, MMP9의 유전자 발현의 변화를 확인하고자 하였다. Figure 5에서 보는 바와 같이, 대조군과 siRNA-ETV2 처리한 다음 날 ETV2 과발현 시킨 후 48시간 뒤에 Western blotting을 통해 MMP2와 MMP9의 발현 변화를 확인하였다. 그 결과, silencing시킨 ETV2에서 MMP2와 MMP9의 발현량이 현저히 감소된 결과를 통해 ETV2가 MMP9이 서로 관련성을 보여주므로 인해 혈관평활근세포의 이동에 유의적 변화를 확인하였다.

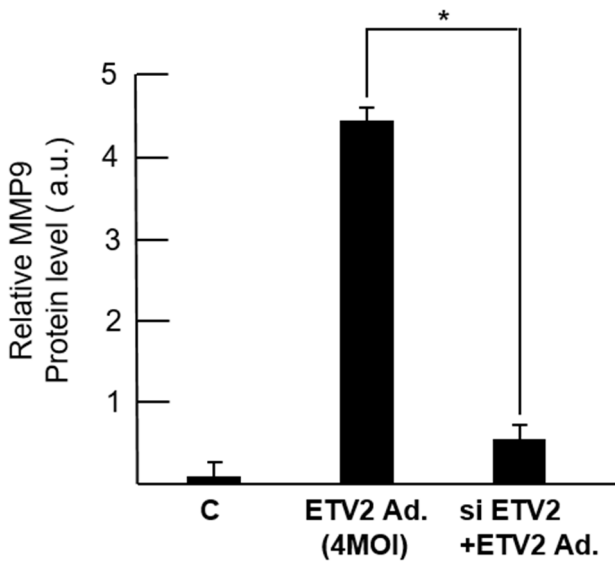
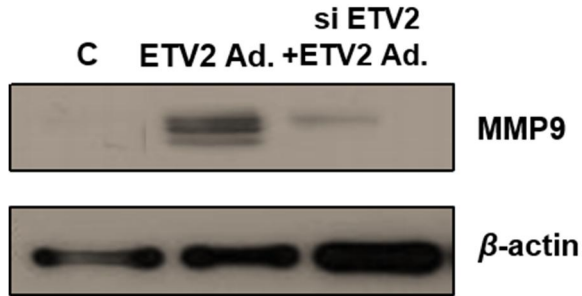


Figure 5. Altered protein levels of MMP9 by ETV2 silencing.

Silencing ETV2 after overexpression ETV2 of MMP2 and MMP9 activity were measured by western blot. The band density was normalized with β -actin (internal controls). The total protein loaded per lane was 50 μ g: detection of ETV2 and loaded per lane was 50 μ g: detection MMP2 and loaded per lane was 60 μ g: detection MMP9 and loaded per lane was 5 μ g: detection β -actin. Histogram showing average data for MMP9 protein in the control, positive control and the treated each sample (ETV2, silencing ETV2) in dose. Densitometry analysis of three independent western blot shows quantitation of MMP9 level (n=4.7,14MOI) * p <0.05 versus the control. The protein levels of MMP9 were decreased in VSMCs treated silencing ETV2 with ETV2 overexpression.

6. ETV2 과발현에 의한 혈관평활근세포 표현형 변화

중간 표현형을 혈관평활근세포의 스펙트럼의 양 끝을 나타내는 수축 및 합성 혈관평활근세포는 분명히 다른 형태를 가지고 있으며, 혈관평활근세포의 표현형 정의를 위한 목적으로 마커 단백질을 사용하였다. [27] 혈관평활근세포의 합성 및 수축형은 서로 다른 증식 및 이동 특성을 나타내며, 일반적으로 합성형 혈관평활근세포는 수축형 혈관평활근세포보다 높은 성장률과 이동성을 갖는다고 알려졌다.[28] 그러므로 LacZ 와 ETV2 adenovirus를 처리한 혈관평활근세포에서의 표현형 표지자 마커의 발현률을 확인하고자 q-PCR을 진행하였다. Figure 6에서 수축형인 α -SMA, Myocardin의 mRNA level은 ETV2를 처리한 세포가 LacZ를 처리한 세포에 비해 mRNA level이 감소된 결과를 보였으며, 반대로 합성형인 PDGF-A, KLF4는 미미하게 mRNA level이 증가되었으며, 특히 Connexin43에서 현저히 증가된 mRNA level을 확인하였다. 이로써 ETV2 조절에 의한 혈관평활근세포의 표현형 조절의 영향을 확인하였다.

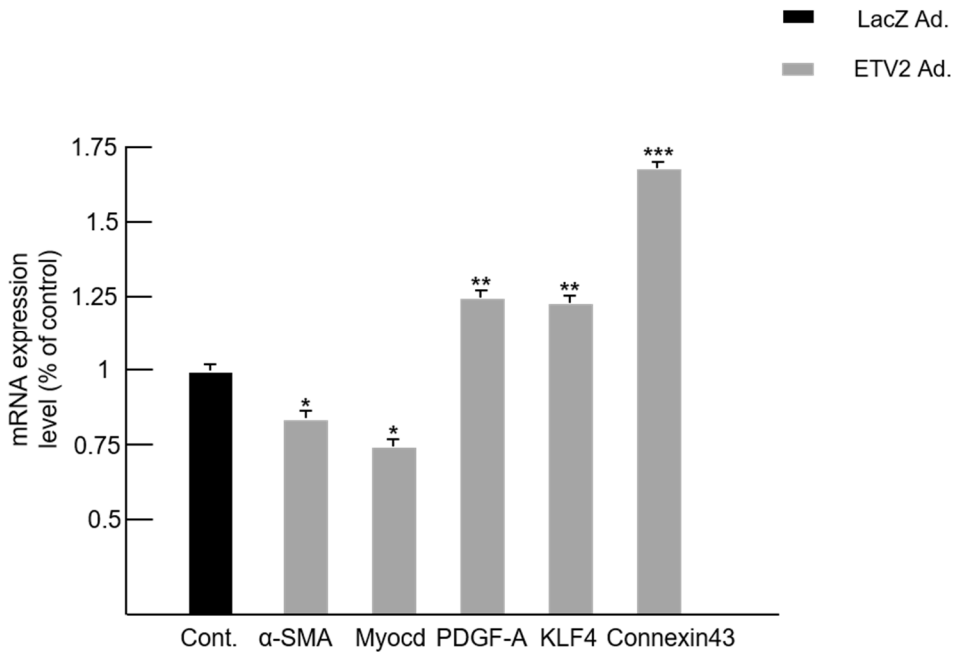


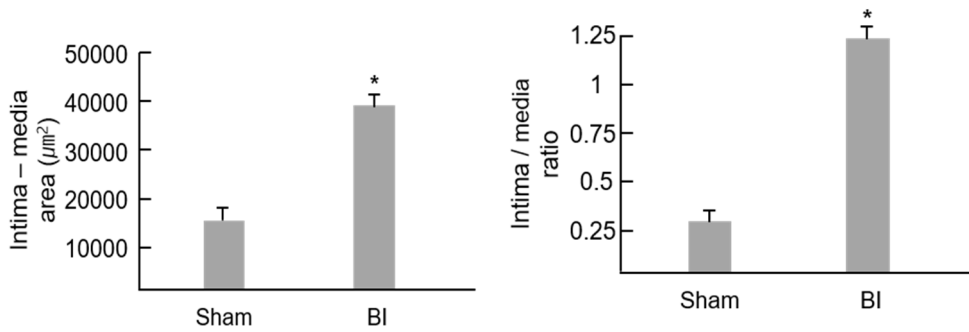
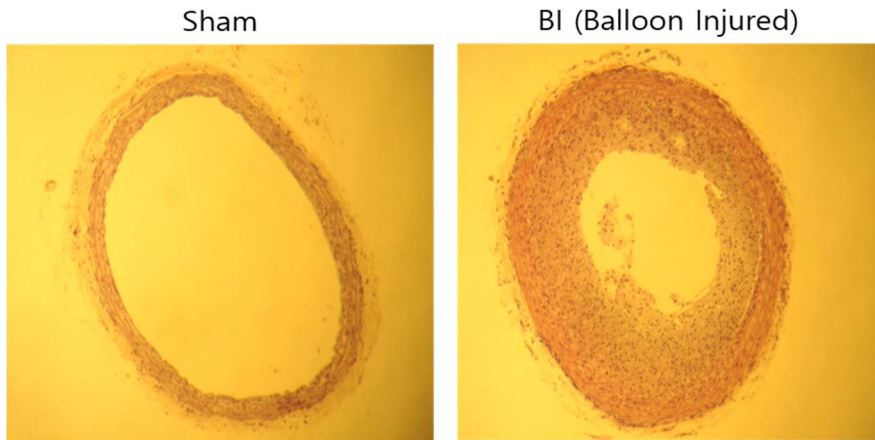
Figure 6. Alteration of phenotypic makers in ETV2-overexpressed VSMCs.

α-SMA, Myocardin, PDGF-A, Connexin43, KLF4 mRNA levels were measured by quantitative real time PCR. Rat VSMCs were treated for 12h with ETV2. The mRNA levels were normalized to GAPDH. The mRNA levels of PDGF-A, Connexin43, KLF4 were increased in VSMCs treated ETV2. * $p < 0.05$ versus the control

7. 풍선확장술을 시행한 동맥경화모델에서의 ETV2 발현

지금까지 실험에서 ETV2가 발현시킨 혈관평활근세포에서 q-PCR 실험 및 Western blotting, luciferase assay를 통해 ETV2가 혈관평활근세포의 이동에 관여한다는 결과를 얻었으며, 이러한 결과들은 세포실험에 의해서 얻은 결과물이다. 그러므로 세포실험이 아닌 동물실험에서도 ETV2가 혈관평활근세포의 이동에 영향을 미치는지 확인하고자, 경동맥에 풍선확장술을 통해 죽상동맥경화가 발생하는 모델에서 ETV2가 발현되어, 혈관평활근세포의 이동에 관여하는지 확인하고자 실험하였다. Figure 8A는 정상적인 동물모델의 경동맥과 풍선확장술을 통해 동맥경화를 일으킨 경동맥의 사진으로, Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색법을 이용하여 형태를 확인하였으며, hematoxylin은 핵을 염색 시키고 Eosin은 세포질을 염색시킨다. Sham model에 비해 Balloon injury에서 세포질 염색이 유의적으로 발현되었다. Figure 8B는 Immunohistochemistry (IHC) 염색법으로 Figure 8A와 방법은 유사하며, 정상적인 동물모델에 비해 풍선확장술을 한 동물모델에서 ETV2가 유의적인 발현효과를 보였으며, 결과를 종합하였을때, 혈관평활근세포가 내막에서 이동 및 증식과정에서 ETV2가 발현되었음을 알 수 있다.

(A)



(B)

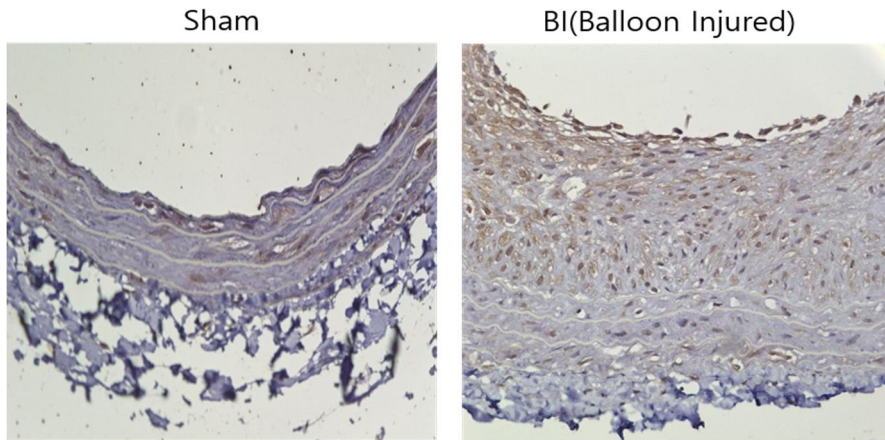


Figure 7. Expression levels of ETV2 in balloon-injured rat carotid artery.

(A) Relative comparison of the rat aorta. Left: sham Right: balloon injury model, Carotid artery tissues. Hematoxylin and eosin stain. Intima thickness sham 17 μm , balloon injury model 54 μm (B) Immunohistochemistry staining of ETV2 expression in Carotid artery tissues. VSMCs were exposed to control and Balloon injury model.

IV. 결론 및 고찰

혈관평활근세포의 이동은 완전한 혈관이 형성되기 위해 필요한 현상으로, 혈압의 조절 및 혈관손상으로 인한 혈관 재형성에 중요한 작용을 한다.[29] 하지만, 물리적인 외압, 화학물질 등의 다양한 요인으로 인해 혈관에 스트레스가 가해짐에 따라 항상성이 무너지면서 혈관평활근세포의 이동과 증식에 의한 세포의 비정상적인 성장이 일어나며, 혈관 내막세포 및 림프구, 단핵구를 포함하는 다른 세포들의 복합적인 작용이 이루어지면서 죽상동맥경화증이 일어난다.[27]

ETV2는 ETS 전사인자 계열 중 하나로 ETS계열들은 조혈 및 내피세포 생성에 크게 관여한다고 알려졌다.[30, 31] ETV2는 배아 발생 과정에서 주로 발현되며, ETV2발현은 배아발생과정에서 혈액 및 혈관을 생성하는데 필수적인 역할을 하고, 배아발생과정이 끝난 후, ETV2 발현이 사라진다고 알려졌다.[8-10] 성인과정에서는 ETV2발현이 나타나지 않는다고 알려져 있었으나, 최근에 손상된 혈관 및 심근경색에서 혈관신생의 기능을 한다는 것이 밝혀졌다.[17] 죽상동맥경화증이 일어나는 원인은 혈관평활근세포의 과다한 이동 및 증식으로 인한 발생으로[32], ETV2발현이 죽상동맥경화증에 관련성된 연구는 보고된 바가 없었다. 이에 본 연구에서는 혈관평활근세포를 Rat 모델에서 분리 배양하여 ETV2를 과발현시켜 혈관평활근세포의 이동 및 증식에 영향을 확인하고자 진행하였다. Wound healing assay, Boyden chamber assay, BrdU assay를 통해 ETV2과발현시킨 혈관평활근세포의 영향분석 결과에서 Figure 2와 같이 기존 혈관평활근세포 보다 ETV2를 과발현시킨 혈관평활근세포에서 이동이 현저히 증가되었으며, 증식에서는 유의적인 차이가 없

었다. 이는 ETV2가 혈관평활근세포의 이동에 크게 영향을 준다는 결과를 보여주는 것이다. 기존의 논문에서 MMP계열들은 혈관평활근세포의 이동 및 증식에 관여하며, 특히 혈관평활근세포의 이동 및 증식에 MMP2, MMP9의 활성화가 증가하며 이것이 죽상동맥경화의 원인 중 하나라고 보고되었다.[6] 그래서 우리는 ETV2가 MMP2와 MMP9을 활성화시켜 혈관평활근세포의 이동에 영향을 준다는 가설을 세우고 ETV2를 과발현시켰을 때 MMP2, MMP9에 어떠한 영향을 보여지는지 확인하고자 하였다. Figure 3에서 보는바와 같이, Western blotting, Gelatin zymography를 통해 MMP2와 MMP9 단백질의 발현량을 확인한 결과 MMP2는 대조군에 비해 ETV2과발현시킨 혈관평활근세포가 감소된 것처럼 보였으나 Gelatin zymography에서는 유의적인 차이가 없었고, MMP9은 오히려 대조군에 비해 현저히 증가되는 결과를 도출하였다. 또한 Figure 4에서, ETV2를 과발현시킨 혈관평활근세포에서 MMP 계열의 mRNA level 및 promoter activity 통해 ETV2가 MMP9을 활성화를 시켜 혈관평활근세포의 이동에 관여한다는 결과를 부가적으로 확인하였으며 더 나아가, Figure 5에서 보는 바와 같이 혈관평활근세포를 과발현 시킨 ETV2에 silencing ETV2를 감염시킨 후 MMP계열에 미치는 영향을 확인한 결과, silencing ETV2 처리한 혈관평활근세포에서 MMP2, MMP9에서 유의적인 감소 효과를 나타냈으며, 이 결과로 ETV2가 MMP계열의 영향에 관련된다는 결론을 도출 할 수 있었다. 이러한 결과들을 바탕으로, 본 연구에서 MMP2의 경우는 ETV2조절에 의한 active-MMP2의 발현은 실험마다 일치하는 결과가 나오지 않으나, MMP9의 경우에는 ETV2조절에 의한 일관된 결과들을 얻어, 이를 통해 ETV2과발현에 의한 혈관평활근세포의 이동 증가가 MMP9 특이적이라는 것을 재차 확인할 수 있었다. 일반적인 혈관평활

근세포에 대한 참고 논문에서 혈관평활근세포의 표현형에 따라 이동 및 증식에 다른 특성을 나타낸다는 것이 알려져 있으며, 형태는 수축형과 합성형으로 나타내고, 일반적으로 수축형에 비해 합성형이 혈관평활근세포의 이동 및 증식에 유의적 효과를 나타낸다고 알려져 있다.[27] Figure 6에서 ETV2과발현 시 혈관평활근세포의 표현형에 있어 수축 및 합성 중 어떤 형태를 보여주는 지 확인하고자, q-PCR을 통해 수축 및 합성형 마커의 mRNA level을 비교하였으며, 결과적으로 ETV2는 합성형 상태에서 높은 mRNA level 보임에 따라, ETV2 조절에 의한 혈관평활근세포의 표현형 조절의 영향을 확인한 바, 추후에 이에 관한 자세한 연구가 필요한 것으로 보인다. 또한 Figure 7에서 풍선확장술을 이용하여 rat의 경동맥에 동맥경화를 유도하였을 때, ETV2 발현을 보고자, H&E 염색법 과 면역조직화학염색법으로 확인한 결과, 정상적인 경동맥에 비해 동맥경화를 유도한 경동맥에서 ETV2의 유의적인 발현 증가를 확인하였다. 본 연구를 통해 ETV2가 혈관평활근세포의 이동에 관여하며, 특히 혈관평활근세포의 이동에 영향을 주는 MMP계열 중에서 MMP9 활성화시키는 것과 더 나아가 풍선확장술을 시행된 동물모델에서 ETV2의 유의적 발현 효과를 통해, 동맥경화의 유발에 관여함을 확인 할 수 있었다. 이에 ETV2가 혈관평활근세포에서의 역할 및 기능에 대한 세분화 된 연구를 통하여 보다 명확하게 규명할 필요가 있을 것이다.

V. 참고문헌

1. Weissberg PL, Bennett MR: **Atherosclerosis--an inflammatory disease.** *N Engl J Med* 1999, **340**(24):1928-1929.
2. Glass CK, Witztum JL: **Atherosclerosis. the road ahead.** *Cell* 2001, **104**(4):503-516.
3. Lusis AJ: **Atherosclerosis.** *Nature* 2000, **407**(6801):233-241.
4. Taleb S: **Inflammation in atherosclerosis.** *Arch Cardiovasc Dis* 2016, **109**(12):708-715.
5. Newby AC: **Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates.** *Cardiovasc Res* 2006, **69**(3):614-624.
6. Johnson JL, Dwivedi A, Somerville M, George SJ, Newby AC: **Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011, **31**(9):e35-44.
7. Bauvois B: **New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression.** *Biochim Biophys Acta* 2012, **1825**(1):29-36.
8. Kataoka H, Hayashi M, Nakagawa R, Tanaka Y, Izumi N, Nishikawa S, Jakt ML, Tarui H, Nishikawa S: **Etv2/ER71 induces vascular mesoderm from Flk1+PDGFRalpha+ primitive mesoderm.** *Blood* 2011, **118**(26):6975-6986.
9. Ferdous A, Caprioli A, Iacovino M, Martin CM, Morris J, Richardson JA, Latif S, Hammer RE, Harvey RP, Olson EN *et al*: **Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial fate in the developing embryo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(3):814-819.
10. Lee D, Park C, Lee H, Lugus JJ, Kim SH, Arentson E, Chung YS, Gomez G, Kyba M, Lin S *et al*: **ER71 acts downstream of BMP, Notch, and Wnt signaling in blood and vessel progenitor specification.** *Cell Stem Cell* 2008, **2**(5):497-507.
11. Neuhaus H, Muller F, Hollemann T: **Xenopus er71 is involved in vascular development.** *Dev Dyn* 2010, **239**(12):3436-3445.
12. Sumanas S, Lin S: **Ets1-related protein is a key regulator of vasculogenesis in zebrafish.** *PLoS Biol* 2006, **4**(1):e10.
13. Dejana E, Taddei A, Randi AM: **Foxs and Ets in the transcriptional regulation of endothelial cell differentiation and angiogenesis.** *Biochim Biophys Acta* 2007, **1775**(2):298-312.
14. Liu F, Li D, Yu YY, Kang I, Cha MJ, Kim JY, Park C, Watson DK, Wang T, Choi K: **Induction of hematopoietic and endothelial cell program orchestrated by ETS transcription factor ER71/ETV2.** *EMBO Rep* 2015, **16**(5):654-669.

15. Park C, Lee TJ, Bhang SH, Liu F, Nakamura R, Oladipupo SS, Pitha-Rowe I, Capoccia B, Choi HS, Kim TM *et al*: **Injury-Mediated Vascular Regeneration Requires Endothelial ER71/ETV2**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016, **36**(1):86-96.
16. Lee S, Lee DH, Park BW, Kim R, Hoang AD, Woo SK, Xiong W, Lee YJ, Ban K, Park HJ: **In vivo transduction of ETV2 improves cardiac function and induces vascular regeneration following myocardial infarction**. *Exp Mol Med* 2019, **51**(2):13.
17. Liu F, Kang I, Park C, Chang LW, Wang W, Lee D, Lim DS, Vittet D, Nerbonne JM, Choi K: **ER71 specifies Flk-1+ hemangiogenic mesoderm by inhibiting cardiac mesoderm and Wnt signaling**. *Blood* 2012, **119**(14):3295-3305.
18. Kabir AU, Lee TJ, Pan H, Berry JC, Krchma K, Wu J, Liu F, Kang HK, Hinman K, Yang L *et al*: **Requisite endothelial reactivation and effective siRNA nanoparticle targeting of Etv2/Er71 in tumor angiogenesis**. *JCI Insight* 2018, **3**(8).
19. Cohen DE, Melton D: **Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine**. *Nat Rev Genet* 2011, **12**(4):243-252.
20. Yamanaka S: **A fresh look at iPS cells**. *Cell* 2009, **137**(1):13-17.
21. Lee S, Park C, Han JW, Kim JY, Cho K, Kim EJ, Kim S, Lee SJ, Oh SY, Tanaka Y *et al*: **Direct Reprogramming of Human Dermal Fibroblasts Into Endothelial Cells Using ER71/ETV2**. *Circ Res* 2017, **120**(5):848-861.
22. Yamamizu K, Sharov AA, Piao Y, Amano M, Yu H, Nishiyama A, Dudekula DB, Schlessinger D, Ko MS: **Generation and gene expression profiling of 48 transcription-factor-inducible mouse embryonic stem cell lines**. *Sci Rep* 2016, **6**:25667.
23. Rasmussen TL, Shi X, Wallis A, Kweon J, Zirbes KM, Koyano-Nakagawa N, Garry DJ: **VEGF/Flk1 signaling cascade transactivates Etv2 gene expression**. *PLoS One* 2012, **7**(11):e50103.
24. Rasmussen TL, Martin CM, Walter CA, Shi X, Perlingeiro R, Koyano-Nakagawa N, Garry DJ: **Etv2 rescues Flk1 mutant embryoid bodies**. *Genesis* 2013, **51**(7):471-480.
25. Koyano-Nakagawa N, Kweon J, Iacovino M, Shi X, Rasmussen TL, Borges L, Zirbes KM, Li T, Perlingeiro RC, Kyba M *et al*: **Etv2 is expressed in the yolk sac hematopoietic and endothelial progenitors and regulates Lmo2 gene expression**. *Stem Cells* 2012, **30**(8):1611-1623.
26. Jin X, Ge X, Zhu DL, Yan C, Chu YF, Chen WD, Liu J, Gao PJ: **Expression and function of vascular endothelial growth factor receptors (Flt-1 and Flk-1) in vascular adventitial fibroblasts**. *J Mol Cell Cardiol* 2007, **43**(3):292-300.
27. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ: **Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity**. *Neth Heart J* 2007, **15**(3):100-108.
28. Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Gabbiani F, Gabbiani G: **Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the**

- development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996, **16**(6):815–820.
29. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR: **Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.** *Physiol Rev* 2004, **84**(3):767–801.
30. Pham VN, Lawson ND, Mugford JW, Dye L, Castranova D, Lo B, Weinstein BM: **Combinatorial function of ETS transcription factors in the developing vasculature.** *Dev Biol* 2007, **303**(2):772–783.
31. Meadows SM, Myers CT, Krieg PA: **Regulation of endothelial cell development by ETS transcription factors.** *Semin Cell Dev Biol* 2011, **22**(9):976–984.
32. Raines EW, Ross R: **Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis.** *Br Heart J* 1993, **69**(1 Suppl):S30–37.