

## 기관지천식환자에서 기도의 혈관내피성장인자와 저산소증 유발인자의 표현

서울의료원 내과\*, 가톨릭대학교 의료원 호흡기학과

박재은\* · 이숙영 · 김진숙 · 권순석 · 송정섭 · 박성학

### Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Hypoxia-Inducible Factor in Airway of Asthma Patients

Jae Eun Park, M.D.\*, Suk Young Lee, M.D., Jin Suk Kim, M.D.,  
Sun Seok Kwon, M.D., Jung Sub Song, M.D., Sung Hak Park, M.D.

*Department of Internal medicine, Seoul Medical Center\**  
*Department of Respiratory Medicine, Catholic University, Medical Center, Seoul, Korea*

**Abstract :** Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent inducers of vascular formation and also increases vascular permeability, which may contribute to pathogenesis of asthma. Hypoxia-inducible factor (HIF) is enhanced by hypoxic state and induces VEGF strongly. HIF- $2\alpha$  may have strong relationship with VEGF and pathogenesis of asthma. We evaluated the relationship between VEGF and eosinophils in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and hyperresponsiveness, obstruction of airway. Also we evaluated the relationship between VEGF and HIF- $2\alpha$  in asthmatics. BAL fluid and biopsy specimens of airway was obtained from 28 glucocorticoids free asthmatics and 12 healthy control subjects. We examined VEGF levels and eosinophil count from BAL fluid, and HIF- $2\alpha$  levels and VEGF levels from biopsy specimen. The VEGF levels were significantly higher in asthmatics than in control subjects ( $P<0.01$ ), and did not correlate with metacholine-hyperresponsiveness and FEV1. The eosinophil count was correlated with VEGF levels in BAL fluid ( $r=0.501$ ,  $P<0.01$ ). The HIF- $2\alpha$  levels were significantly higher in asthmatics than control subjects ( $P<0.05$ ), correlated with VEGF levels ( $r=0.871$ ,  $P<0.01$ ). VEGF levels were increased in airway of asthmatics and correlated with degree of eosinophilic airway inflammation. HIF- $2\alpha$  levels were increased in airway of asthmatics. Furthermore, VEGF levels were significantly correlated with HIF- $2\alpha$  levels. These findings provide strong evidence that VEGF may play an important role in the pathogenesis of bronchial asthma and regulated by HIF- $2\alpha$ .

**Key Words :** Asthma, Bronchoalveolar lavage, Bronchoscopy, Hypoxia-inducible factor- $2\alpha$ , Vascular endothelial growth factor.

## 서론

기관지천식은 만성기도염증반응과 기도개형 및 가역적 기도폐쇄, 기도과민반응을 특징으로 하는 만성기관지염증질환이다. 경한 기관지천식환자에서도 기관지점막에 부종, 충혈, 염증세포의 침윤 등이 관찰되며, 기도에서는 상피세포의 탈락, 배상세포(goblet cell)의 증식, 기저막의 두께 증가, 평활근의 비후 및 증식, 신생혈관 등이 나타나 기도에 구조적인 변화가 생긴다[1,2].

혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 조직의 부종을 일으켜 vascular permeability factor라고도 불리웠다. 곧 VEGF는 가장 강력한 혈관형성인자로 주목받게 되었으며 상피세포의 증식, 내피세포의 생존을 자극하는 등 여러 가지 작용을 하는 혈관조절물질이라는 것이 알려졌다[3,4]. 기관지천식환자의 유도객담에서 VEGF 표현정도가 증가되어 있으며, 기도염증과 신생혈관형성에 직접적으로 관여한다고 알려져 있다[5-7]. VEGF 표현을 조절하는 많은 인자들이 알려져 있지만, 기관지천식에서 VEGF의 조절에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

저산소증 유발인자(hypoxia-inducible factor, HIF)는 공통으로 존재하는  $\beta$ -subunit (HIF- $\beta$ )와 산소조절부위인  $\alpha$ -subunit (HIF- $\alpha$ )로 이루어져 있으며 가장 강력한 VEGF 조절인자로 알려져 있다[8].

HIF- $\alpha$ 에는 HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ 의 세가지 유형이 존재하며 서로 다른 유전자에서 발현된다. HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-2 $\alpha$ 는 비슷한 구조를 가지고 있으며[9], *in vitro*에서 유사한 조절 특징을 지니고 있다[10]. HIF 중에는 대부분 HIF-1 $\alpha$ 에 대한 연구가 이루어져 왔으며, HIF-2 $\alpha$ 에 대해서는 많은 연구가 이루어져 있지 않다. 태생기 발생에서 HIF-2 $\alpha$ 는 폐에서 풍부하게 표현되지만 HIF-1 $\alpha$ 는 낮은 수준으로만 표현되고 특별한 변화가 없다. HIF-1 $\alpha$ 는 저산소 상태에서만 표현되지만, HIF-2 $\alpha$ 는 저산소 상태뿐만 아니라 정상산소분압 상태에서도 표현된다고 알려져 있다[11]. 최근의 연구들에서 HIF-1 $\alpha$ 보다도 HIF-2 $\alpha$ 가 VEGF의 promotor에 친화력이 더 강하

다는 것을 알 수 있다[10-12]. 이와 같은 결과들로 미루어보아 HIF-2 $\alpha$ 가 기관지천식의 병인에 중요한 역할을 한다고 예상할 수 있다.

이 연구는 기도의 VEGF 표현정도가 호산구와 관련된 염증 정도, 기도과민성, 기도폐쇄와 연관이 있는지 알아보고, 천식환자에서 HIF-2 $\alpha$ 의 표현이 VEGF 표현과 연관성이 있는지 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

28명의 기관지천식환자와 12명의 정상대조군을 대상으로 하였다. 대상의 임상양상은 Table 1에 표시하였다. 모든 환자를 American Thoracic Society Standards for Asthma에 따라 기관지천식으로 정의하였다. 즉 1) 기침, 천명음, 호흡곤란의 증상이 존재하고, 2) 흉부 방사선 검사상 정상 소견을 보이며, 3) 천식발작 시 FEV1의 감소를 보이면서 기관지확장제에 20%이상의 FEV1의 증가를 보이며, 4) 콜린성 약제에 기도과민성을 보이는 환자들이다.

모든 대상자에게 메타콜린유발검사를 시행하였다. 이 연구에서 모든 기관지천식 환자들은 메타콜린에 기도과민성을 보였다. 피부반응 검사에서 12가지 알레르겐에 하나 이상의 반응을 보일 때 아토피로 정의하였다. 기관지천식 치료제로  $\beta_2$ -agonist와 theophylline을 사용하거나 사용하지 않았으며, 흡입용 또는 경구용 스테로이드 제제를 사용하는 사람은 없었다. 메타콜린유발검사와 기관지경검사 12시간 전에 투약을 중단하였다. 모든 환자들은 최근에 호흡기감염의 병력이 없었으며 적어도 1달 이내에 천식발작의 병력도 없었다. 정상대조군은 건강하고 흡연력이 없고, 폐질환의 병력이 없는 지원자로 구성하였다. 모든 대상자는 연구에 관해 가톨릭대학교 윤리위원회에서 인증한 서면동의서에 승낙하였다.

### 2. 메타콜린 기관지유발검사

메타콜린 유발검사는 Chai의 방법을 변형하여 염

**Table 1.** Clinical characteristics of asthmatic and normal control subjects

	Asthmatic subjects (n=28)	Control subjects (n=12)
Age	45.4 ± 10.7	50.3 ± 9.8
Sex (M:F)	13:15	7:5
FEV1 (%)	72.4 ± 14.9	96.7 ± 10.8
PC20 methacholine(mg/mL)	6.89 ± 4.90	>25

Values are presented as mean ± standard deviation.

화메타콜린(Sigma, USA)를 0.9% 생리식염수에 녹여 0.075 mg/mL에서 25 mg/mL까지 2배씩 증가하면서 nebulizer를 이용하여 2분간 상시호흡으로 흡입한 후, 30초와 90초에 단순 폐기능측정기로 FEV1 (% , predicted)을 측정하였다. PC20는 생리식염수 흡입 후 측정된 기저 FEV1의 20%를 감소시키는 메타콜린 농도로 용량반응곡선에서 선형보간법을 계산하였다.

### 3. 기관지경검사 및 기관지폐포세척

기관지경 시술 30분 전에 아트로핀 정맥주사와 국소마취를 시행한 후 정맥으로 midazolam 2-3 mg을 투여한 후 굴곡성 기관지경 (Olympus, Tokyo, Japan)으로 검사를 시행하였다. 기관지폐포세척술은 기관지경을 우중엽에 고정시킨 후 생리식염수 30 mL를 주입하고 흡입하는데 5회 반복하여 시행하고 두 겹의 거즈를 통과시켜 모았다. 그리고 반대편 상엽과 하엽이 갈라지는 부위에서 기관지점막조직을 생검하였다. 기관지폐포세척액은 4℃, 400 x g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 -70℃에 보관하였다. 총 세포수는 혈구계산기로 계산하였다. 약  $1 \times 10^6$  cells/mL 농도가 되도록 PBS(phosphate-buffered saline) 용액을 섞었다. 70  $\mu$ L를 취하여 5분동안 5,000 rpm으로 원심분리 (Cytospin 2, Shandon, UK) 하여 슬라이드를 만들고 Diff-Quick solution(Lab Aids, Sydney, Australia)으로 염색하여 감별세포 계산을 하였다. 두 명의 연구관이 대상자의 임상양상을 모르는 상황에서 슬라이드 당 400

개 이상의 염증세포를 세어 평균을 취하였다.

### 4. ELISA

기관지폐포세척액의 VEGF의 측정은 Quantikine human VEGF immunoassay kit (R&D System, Minneapolis, USA)를 이용하였고, 실험절차는 제작자의 지침에 따라서 진행하였다.

### 5. 면역염색

기관지 생검조직을 파라핀으로 처리하여 6  $\mu$ m 두께로 잘라 질렌으로 파라핀을 제거하고 에탄올 처리하였다. 생검조직을 HIF-2 $\alpha$ 에 대한 일차 단일클론항체 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 사용하여 4℃에서 밤사이 숙성하였다. 이차항체를 사용하고 과산화효소와 DAB(3,3'-diaminobenzidine)를 처리하여 기관지 조직절편에서 면역활동성을 측정하였다. VEGF protein은 anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)를 사용하여 같은 방법으로 측정하였다. VEGF는 AEC chromogen(3-amoni-9-ethylcarbazole chromogen, Vector, Burlingame, USA)를 사용하여 발색하였다.

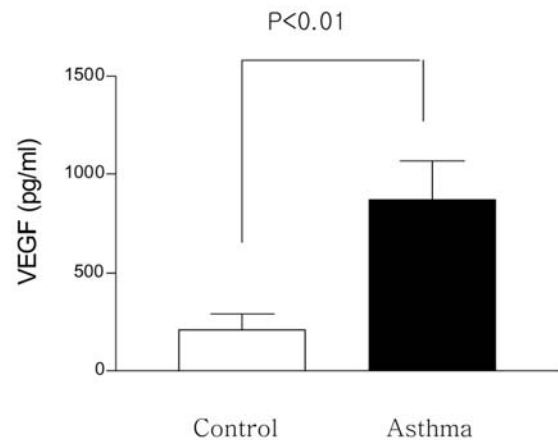
### 6. 정 량

현미경을 사용하여 200배 배율에서, 대상의 임상양상에 대한 정보 없이 슬라이드를 관찰하였다.

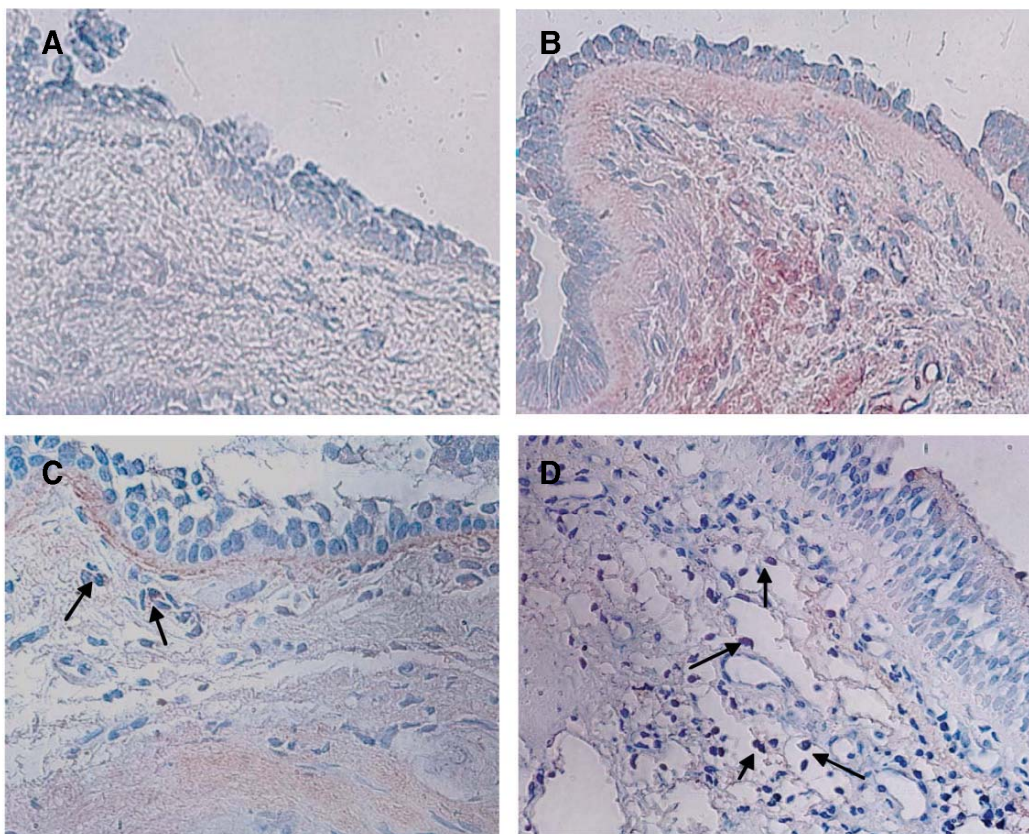
VEGF와 HIF-2 $\alpha$ 의 면역염색 정도를 측정하기 위해 computerized colorimetric image analyzer (BX50, Olympus, Tokyo, Japan)를 사용하였다. VEGF의 표현정도는 점막하 면적당 면역염색된 넓이로 결과를 표시하였다. 점막하에 염색된 세포수를 세었으며 점막 분비선과 평활근을 제외하였다. HIF-2 $\alpha$ 의 표현정도는 점막하 mm<sup>2</sup>당 염색된 세포수로 결과를 표시하였다.

## 7. 통계처리

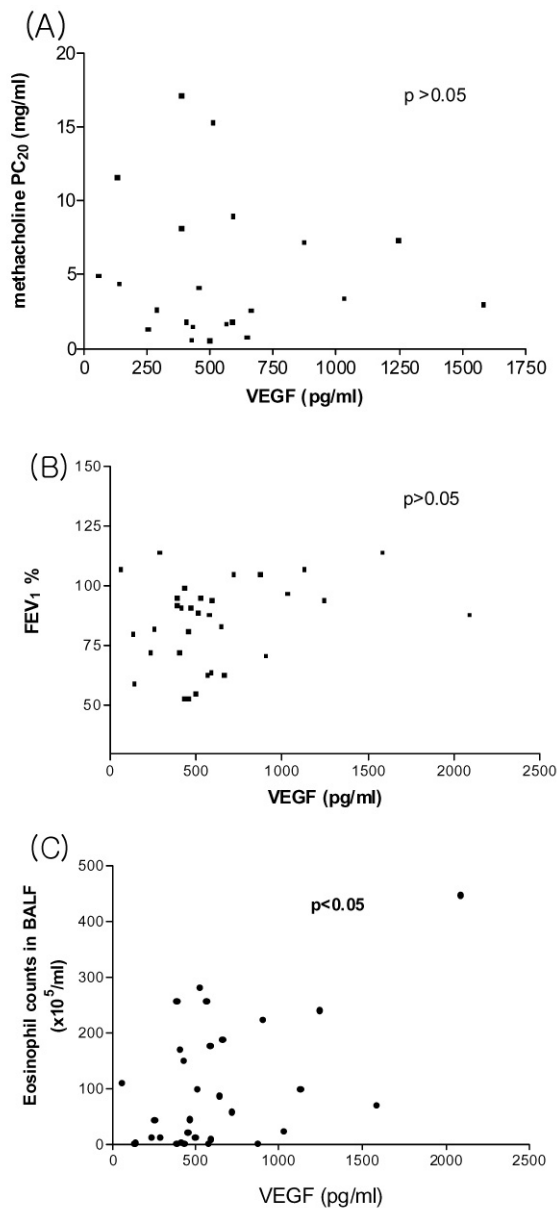
각 군의 결과는 nonparametric Kruskal-Wallis test를 이용한 ANOVA를 사용하여 비교하였으며 Dunn's multiple comparison of means로 검증하였



**Fig. 1.** Comparison of VEGF level in bronchoalveolar lavage fluid. The VEGF levels in asthmatics were significantly higher than control subjects.



**Fig. 2.** Immunohistochemical stains of VEGF (A&B) and HIF-2 $\alpha$  (C&D). VEGF levels are expressed as the area of immunohistochemical staining per submucosal area (A&B). HIF-2 $\alpha$  levels are expressed as the number of positive cells per square millimeter of submucosa (C&D). (A) and (C) specimens are from control subjects. (B) and (D) specimens are from asthmatics. Arrows indicate the cells with HIF-2 $\alpha$  expression



**Fig. 3.** Correlation of VEGF level in bronchoalveolar lavage fluid with clinical characteristics. (A) The VEGF levels were not correlated with metacholine-hyperresponsive of airway. (B) The VEGF levels were not correlated with FEV<sub>1</sub>, neither. (C) There is significant correlation between eosinophil count and the VEGF levels in bronchoalveolar lavage fluid.

다. 상관관계의 정도는 Spearman's rank correlation coefficients로 측정하였다. 통계처리에

는 Graph Pad Prism (San Diego, USA) 소프트웨어를 사용하였으며  $p < 0.05$ 인 경우 통계학적으로 의미가 있는 것으로 간주하였고, 모든 결과는 평균과 표준편차로 표시하였다.

## 성적

### 1. VEGF

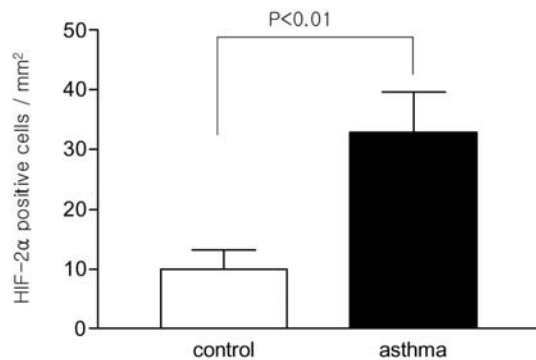
기관지폐포세척액에서 측정된 VEGF 표현 정도는 정상대조군보다 기관지천식군에서 유의하게 높은 것으로 나타났다 ( $211.4 \pm 77.8$  pg/mL vs.  $868.1 \pm 199.7$  pg/mL,  $P < 0.01$ ; Fig. 1). 기관지조직절편에서 anti-VEGF 염색양상은 Fig. 2A와 2B에 표시하였다. 아토피군 ( $564.0 \pm 79.4$  pg/mL) 과 아토피가 없는 환자군 ( $712.8 \pm 144.4$  pg/mL) 사이에 VEGF 표현 정도는 유의한 차이가 없었다. 기관지천식군에서 메타콜린에 대한 기도과민성 (Fig. 3A) 과 FEV<sub>1</sub> (Fig. 3B)은 VEGF 농도와 관련성을 찾을 수 없었다. 기관지폐포세척액 속의 호산구 수는 정상대조군에 비해 기관지천식군에서 유의하게 높았으며 ( $P < 0.01$ ), VEGF 표현 정도도 호산구 수와 관련이 있는 것으로 나타났다 ( $r = 0.501$ ,  $P < 0.01$ ; Fig. 3C).

### 2. HIF-2 $\alpha$ 의 면역염색

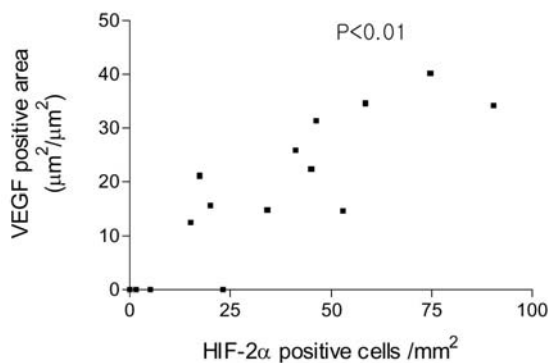
기관지천식군과 정상대조군의 HIF-2 $\alpha$ 의 표현 정도를 비교 측정하기 위해 기관지 생검조직을 면역염색하였다 (Fig. 2C & 2D). 점막하 면적당 면역염색된 세포수를 측정하여 얻은 기관지천식군의 HIF-2 $\alpha$ 의 면역염색 정도는 정상대조군에 비해 유의하게 높았다 ( $32.8 \pm 6.8$  cells/mm<sup>2</sup> vs.  $10.0 \pm 3.2$  cells/mm<sup>2</sup>,  $P < 0.01$ ; Fig. 4).

### 3. VEGF와 HIF-2 $\alpha$ 의 연관성

VEGF와 HIF-2 $\alpha$ 의 연관성을 보기 위해 기관지천식군의 기관지 생검조직을 면역염색하였다 Fig. 2B & 2D. 점막하 면적당 VEGF가 면역염색된 점막



**Fig. 4.** Comparison of HIF-2 $\alpha$  expression in bronchial mucosa. Levels of HIF-2 $\alpha$  were expressed as the number of immunohistochemistry positive cells per square millimeter of submucosa. There was significant difference between HIF-2 $\alpha$  levels in asthmatics and in control subjects.



**Fig. 5.** Correlation of HIF-2 $\alpha$  positive cells with VEGF expression in bronchial. The HIF-2 $\alpha$  positive cells per submucosa area were significant correlated with the VEGF positive area per submucosa area in asthmatics.

하 넓이와 점막하 면적당 HIF-2 $\alpha$ 가 면역염색된 세포수를 비교하였다. 통계학적으로 VEGF와 HIF-2 $\alpha$ 의 면역염색 정도는 유의한 연관성이 있는 것으로 나타났다( $r=0.871$ ,  $P<0.01$ ; Fig. 5).

## 고 찰

이 연구에서 VEGF와 HIF-2 $\alpha$ 가 정상대조군에

비해 기관지천식군에서 유의하게 높게 나타났으며 VEGF 표현정도와 HIF-2 $\alpha$ 의 표현정도 사이에 연관성이 있다는 결과를 나타내었다. 더불어 VEGF 표현정도가 천식환자에서 기도염증반응과도 관련성이 있다는 결과를 나타내었다. 기관지천식환자에서 HIF-2 $\alpha$  표현정도를 측정하고 HIF-2 $\alpha$ 와 VEGF 연관성을 측정한 것은 이 연구가 첫 번째이다. 경한 천식환자에서도 기도점막에 부종이 생기고 충혈이 발생한다고 알려져 있다. 앞선 연구들에서 미세혈관투과성과 혈관확장이 기관지천식의 병인에 기여한다는 것을 알 수 있다[5-7]. 최근 연구에서는 기관지천식환자의 기관지조직에서 정상대조군보다 혈관의 수와 발달정도가 높게 나타났다는 연구결과가 있다[13,14]. VEGF의 작용, 즉 혈관의 증식, 충혈, 기도점막의 두께 증가 등이 기도폐쇄를 일으키는 데 중요하다고 여겨지고 있다. 이 연구에서 정상대조군보다 기관지천식군에서 VEGF 표현정도가 유의하게 높았다. Yong과 Hern[15]은 안정된 상태의 천식환자의 가래에서 VEGF 표현정도가 유의하게 높게 나타났으며 천식 발작시에는 더 높게 나타났다고 보고하였다. *In vitro*와 *in vivo* 실험에서 VEGF가 내피세포의 투과성을 증가시킨다는 연구결과가 있다[16,17]. 기도의 VEGF는 점막과 점막하 모세혈관에서 누출을 일으키고 기도벽의 두께를 증가시킨다. 또한 내피세포의 이동 등에 관여하여 기관지천식의 병인에 관여한다고 알려져 있다. 앞선 연구에서 VEGF가 *flt-1*, *KDR/flk-1*과 같은 주로 내피세포에서 표현되는 수용체에 강한 친화력이 있는 것으로 나타났다[18,19]. 천식환자의 기도에서도 같은 결과가 나타났으며[20], VEGF가 신생혈관 형성에 중요한 역할을 하고 기관지천식의 기도개형을 일으킨다고 유추할 수 있다. 나아가 VEGF는 미세혈관의 투과성을 증가시키는 능력이 히스타민보다 5,000배나 강하며 혈관을 확장시킨다. VEGF는 태생기와 성장기 혈관형성에 관여하는 중요한 인자이며, 병리적 혈관형성에도 중요한 역할을 한다. VEGF는 폐와 같은 혈관이 잘 발달된 기관에서 주로 표현된다[21]. 여러 연구들에서 천식환자의 기도에서 VEGF의 표현정도가 증가되어 있으며 혈관의 수적 증가와 연관이 있다는 결과를 나타내었다.

이 연구에서 VEGF가 기도염증과 유의한 연관성이 있다는 결과가 도출되었으며, 이것은 천식환자의 가래에서 호산구 수와 VEGF가 유의한 연관성이 있다는 앞 선 연구와도 일맥상통한다[6]. VEGF는 혈관, 평활근 [22], 종양세포 [23], 케라티노사이트 [24], 섬유아세포, 외피세포 [25], mesangial cell 등에서 생성된다. 또한 VEGF는 대식세포, 중성구, 호산구에서 표현된다[5]. 기도에서 VEGF를 분비하는 세포에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. Hoshino 등 [5]은 천식환자의 기도점막의 호산구에서 VEGF가 표현된다고 하였다. 이 연구에서도 기관지폐포세척액에서 VEGF와 호산구 수 사이에는 관련성이 있었다. 이러한 결과들로 미루어보아 VEGF가 단순 기도염증이 아니라 호산구성 기도염증과 관련이 있다고 추측해볼 수 있다. 다른 보고들과는 달리 메타콜린에 대한 기도과민성과 FEV1과의 연관성은 관찰되지 않았다[6]. 이전 보고는 대개 경한 천식환자인 반면 이 연구에서는 중증도, 중증 천식환자를 포함하였으며 기관지폐포세척액에서 VEGF를 측정했다는 것이 차이의 원인일 지도 모른다. 또한 치료를 받고 있던 환자들을 대상으로 하였다는 점에서 차이가 발생하였을 것이다.

HIF-2 $\alpha$  단백질은 내피세포와 혈관이 잘 발달된 기관에서 발견되어 endothelial PAS domain protein-1 (EPAS-1)이라고도 불린다[26]. 후에 HIF-2 $\alpha$ 는 여러 다른 세포와 조직에서도 발견된다는 것이 밝혀졌다[27]. 산소가 존재하는 상황에서는 HIF- $\alpha$  단백질의 특정한 프롤린 부분과 아스파라긴 부분에 수산화이 이루어진다. 프롤린 수산화가 이루어지면 von Hippel Lindau protein-dependent E3 ubiquitin ligase에 의해 HIF- $\alpha$ 가 단백질 분해되며 [28], 아스파라긴 수산화가 이루어지면 p300에 의해 분해된다[29]. 산소가 없는 상황에서는 이러한 변화가 이루어지지 않는다. 따라서 저산소 상태에서 HIF- $\alpha$ 의 반감기는 급격히 증가한다. HIF-2 $\alpha$  단백질의 농도와 HIF-2 $\alpha$  mRNA의 표현정도가 반드시 일치하지 않는다는 연구결과를 함께 고려해 볼 때 [27], 이러한 작용에 의해 HIF- $\alpha$ 가 음의 피드백(negative feed-back)으로 조절된다고 생각된다. HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-2 $\alpha$ 는 비슷한 화학구조를 가지고 있

지만, 두 HIF의 mRNA는 다른 표현양상을 보인다. 정상산소분압 상태에서 HIF-2 $\alpha$ 의 mRNA는 쥐의 폐에서 주로 표현되고, 그 다음 심장, 간에서 표현되며 VEGF와 연관이 있지만, HIF-1 $\alpha$ 는 훨씬 낮은 농도로 표현된다[11]. 이것은 HIF-2 $\alpha$ 가 다른 세포의 신호에 의해서도 조절된다는 것을 시사한다. 기관지천식에서 저산소상태 이외의 다른 요인에 의해 HIF-2 $\alpha$ 가 활성화되어 VEGF 생성을 자극할 것으로 생각된다. HIF-1 $\alpha$ 와 달리 HIF-2 $\alpha$ 의 DNA 결합은 redox mechanism에 의해 조절된다는 연구결과가 있다[30]. 이러한 차이 등에 의해 HIF-1 $\alpha$ 와 HIF-2 $\alpha$  단백질 사이의 표현정도가 다르며 작용도 다르다고 생각된다.

이 연구에서는 정상대조군보다 기관지천식군에서 VEGF와 HIF-2 $\alpha$ 가 높게 발현된다는 결과를 보였으며, 기관지천식 환자에서 VEGF와 HIF-2 $\alpha$  사이에 유의한 연관성이 있다는 것을 밝혔다. HIF-2 $\alpha$ 는 VEGF 유전자의 전사를 조절하는 강력한 인자로 알려져 있다[9-12]. 이러한 결과들로 미루어보아 기관지천식에서 HIF-2 $\alpha$ 가 VEGF 생성을 자극한다고 유추해 볼 수 있다.

결론적으로, 이 연구에서 기관지천식환자에서 기도내에 VEGF가 증가되어 있고, 호산구성 기도염증의 정도와 관련이 있었으며, 또한 VEGF 표현이 HIF-2 $\alpha$ 와 유의한 상관관계가 있었다. 이러한 결과들은 기관지천식에서 VEGF가 중요한 역할을 하며, VEGF가 HIF-2 $\alpha$ 에 의해 조절된다는 것을 강하게 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. Hogg JC. Pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;**92**:1-5.
2. Beasley R, Page C, Lichtenstein L. Airway remodelling in asthma. *Clin Exp All Rev* 2002;**2**:109-16.
3. Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995;**333**:1757-63.
4. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular

- endothelial growth factor. *Endocrine Rev* 1997;**18**:1-22.
5. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**107**:295-301.
  6. Asai K, Kanazawa H, Kamoi H, Shiraishi S, Hirata K, Yoshikawa J. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy* 2003;**33**:595.
  7. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;**146**:1029-39.
  8. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996;**16**:4604-13.
  9. Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and developmentally expressed in blood vessels. *Mechan Dev* 1997;**63**:51-60.
  10. Wisener MS, Turley H, Allen WE, Willam c, Eckardt KU, Talks KL, *et al.* Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia : characterization and comparison with hypoxia -inducible factor-1 $\alpha$ . *Blood* 1998;**92**:2260-8.
  11. Masatsugu E, Shinichiro T, Noboru Y, Kazuhiro S. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;**94**:4273-8.
  12. Akeno N, Czyzyk-Krzeska MF, Gross TS, Clemens TL. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ . *Endocrinology* 2001;**142**:959-62.
  13. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;**156**:229-33.
  14. Salvato G. Quantitative and morphological analysis of the vascular bed in bronchial biopsy specimens from asthmatic and non-asthmatic subject. *Thorax* 2001;**56**:902-6.
  15. Yong CL, Hern KL. Vascular endothelial growth factor in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**107**:1106-7.
  16. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, *et al.* Vascular endothelial growth factor induced endothelial fenestrations *in vivo*. *J Cell Biol* 1998;**140**:947-59.
  17. Roberts WG, Palade GE. Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 1997;**57**:765-72.
  18. Devries C, Escobeda JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. The *fms*-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1991;**255**:989-91.
  19. Millauer B, Wizigmann-Vass S, Schnurch H, Martinez R, Moller NPH, Rksau W, *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993;**72**:835-46.
  20. Hoshino M, Nakamura Y, Qutayba A, Hamid. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptor and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001;**107**:1034-8.
  21. Maniscalco WM, Watkins RH, D'Angio CT, Ryan RM. Hyperoxic injury decreases alveolar epithelial cell expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in neonatal rabbit lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;**16**:557-67.
  22. Ferrara N, Winer J, Burton T. Aortic smooth muscle cells express and secrete vascular endothelial growth factor. *Growth factors* 1991;**5**:141-8.



23. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, *et al.* Tumor vascular permeability factor stimulate endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989;**84**:1470-8.
24. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, *et al.* Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992;**176**:1375-9.
25. Christous H, Yoshida A, Arthur V, Morita T, Kourembanas S. Increased vascular endothelial growth factor production in the lung of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;**18**:768-76.
26. Tian H, McKnight S. L, Russel DW. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev* 1997;**11**:72-82.
27. Wisener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Cholz C, Horstrup JH. Widespread, hypoxia-inducible expresseion of HIF-2 $\alpha$  in distinct cell populations of different organs. *FASEB Journal* 2002;**10**:1096-106.
28. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, *et al.* Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;**292**:468-72.
29. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 2002;**295**:858-61.
30. Lando D, Pongratz I, Poellinger L, Whitelaw ML. A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1 $\alpha$  and the HIF-like factor. *J Biol Chem* 2000;**275**:4618-27.