

급성 천식환자에서 Vascular Endothelial Growth Factor와 Matrix Metalloproteinase-9

전북대학교 의과대학 내과학교실^a, 임상의학연구소^b, 전주예수병원^c

박강서^c, 진흥용^a, 최유진^a, 이흥범^{a, b}, 이양근^{a, b}, 이용철^{a, b}

= Abstract =

Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase-9 in Acute Asthma

Kang Seo Park, M.D., Hung Yong Jin, M.D., Eugene Choi, M.D.,

^aHeung Bum Lee, M.D., ^{a, b}Yang Keun Rhee, M.D., ^{a, b}Yong Chul Lee, M.D.

*^aDepartment of Internal Medicine, ^bResearch Institute of Clinical Medicine,
Chonbuk National University Medical School, ^cDepartment of Pediatrics,
Presbyterian Medical Center, Chonju, Korea*

Background : Bronchial asthma is an inflammatory disease of the airways that is associated with airway remodeling. The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent, multifunctional cytokine that contributes to angiogenesis and inflammation. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is a major proteolytic enzyme that induces bronchial remodeling in asthma. However, there is no data available on the possible role of the VEGF or on the potential relationship between the VEGF and MMP-9 in acute asthma. Therefore, the VEGF was studied to determine whether or not it participates in airway inflammation during acute asthma. An additional aim of this study was to determine whether or not the VEGF levels correlated with the MMP-9 levels in the sputum of acute asthma patients.

Methods : Both the VEGF and MMP-9 levels were measured by an enzyme immunoassay and zymographic analysis in the sputum of patients with either stable asthma or with acute asthma. The VEGF and MMP-9 levels were also evaluated during a spontaneous asthma attack.

*이 논문은 전북대학교 의과대학 동창회 장학재단 학술연구비 일부 지원에 의하여 연구되었음.

Address for correspondence :

Yong Chul Lee, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine, Chonbuk National University Medical School
634-18, Keumamdong, Chonju, 561-712, Korea

Phone : 063-250-1664 Fax : 063-254-1609 E-mail : leeyc@moak.chonbuk.ac.kr

Results : The VEGF levels were significantly higher in the sputum of acute asthmatic patients than in either the stable patients the control subjects. The VEGF levels in the sputum during asthma exacerbation were significantly higher than those on the remission days, and those levels decreased after asthma therapy. In acute asthmatic patients, the VEGF levels in the sputum correlated with the number of neutrophils and eosinophils. In addition, a significant correlation was established between the VEGF and MMP-9 levels in the sputum.

Conclusion : These results suggest that VEGF overproduction is associated with airway inflammation during acute asthma and is related to the MMP-9 function. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 51 : 530-539)

Key words : Asthma, Vascular endothelial growth factor, Matrix metalloproteinase-9, Remodeling, Extracellular matrix, Airway inflammation

서 론

기관지 천식은 기도 재구성을 특징으로 하는 만성 염증성 질환으로 기도 재구성은 부분적으로 기도벽내 세포외기질의 과도한 침착으로 인하며 이로 인해 표피층 아래 콜라겐 침착이 일어난다^{1,2}. 만성 염증의 조직학적 특징은 혈관생성, 증가된 결체조직 침착, 근섬유세포의 증식등이 일어나는데³, 만성 염증성 질환인 기관지 천식에서 혈관수와 크기의 증가가 일어난다⁴. Vascular endothelial growth factor(VEGF ; vascular permeability factor)는 가장 강력한 혈관생성과 밀접한 관련이 있는 사이토카인이고 혈관생성과정이나 새로운 혈관 형성을 증가하는데 중요한 역할을 하며 또한 혈관의 투과력을 증가시켜 이로 인해 혈장단백질이 혈관밖으로 빠져나가 부종과 세포외기질의 심각한 변화를 야기한다⁵. 또한 VEGF가 matrix metalloproteinase-9(MMP-9)의 분비를 증가시킨다는 보고가 있다⁶.

MMPs는 아연 및 칼슘 의존형 endopeptidase로 세포외 기질의 대부분 성분들을 분해할 수 있으며 세포외기질의 교체, 조직 분해 및 복구, 세포 이동, 염증반응 등의 생리적 병리적 과정에 중요한 역할을 한다. MMPs중 MMP-9은 기관지 천식에서 기도 재구성을 유도하는 주요 단백질 분해물질이다⁷. 뿐만아니라, MMP-9은 호산구와 호중구가 기저막을 통해 이동할 수 있도록 유도한다^{8,9}. 최근, MMPs들이 천식의 백

서 모델에서 난황 유도 기도 염증세포들의 침착에 중요한 역할을 한다는 보고가 있다¹⁰. Mautino 등¹¹은 치료받지 않은 천식환자의 기관지 폐포세척액내 MMP-9이 정상 대조군보다 증가하고 천식악화후 MMP-9의 과잉생산이 기도조직의 재구성에 중요하게 기여한다고 보고하였다. 그러나, 급성천식에서 VEGF의 역할 및 VEGF와 MMP-9의 관계에 대한 보고는 거의 없다. 본 연구에서 저자들은 VEGF가 급성천식시 기도염증반응에 관여하는지를 조사하였고 또한 급성천식시 객담내 VEGF 정도와 MMP-9 정도간에 상관관계가 있는지를 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

전북대학교병원에 내원한 증상이 없는 38세에서 75세(평균 47.8세) 연령인 12명의 안정상태인 천식환자로 남자 6명과 여자 6명, 그리고 36세에서 72세(평균 48.6세) 연령의 급성천식환자인 남자 6명과 여자 6명을 대상으로 하였다(Table 1).

천식은 미국 흉부학회의 진단 기준에 의해 진단하였다¹². 24명의 환자들중에서 임상병력과 흔하게 이용되는 공기알레르겐을 이용한 피부 단자반응검사상 비아토피성이 8명이었다. 28세에서 72세(평균 47.4세) 연령의 남자 6명과 여자 6명의 건강한 대조군을 선택

하였다. 이들은 모두 흡연 기왕력이 없었다. FEV₁은 computerized pulmonary function laboratory (Model 2200 : Sensor Medics Co. USA)를 이용해 기록하였다.

12명의 증상이 없는 안정상태인 천식환자들에서 안정천식은 적어도 6개월간 FEV₁<80%로 감소가 없는 상태로 4주동안 기도천명, 흉부 압박 및 호흡곤란의 증상이 없는 상태라고 정의하였다. 이들은 이전 6개월동안 코티코스테로이드나 다른 항염증약제들을 복용하지 않았고 흡입기 형태로도 사용하지 않았다. 12명의 급성 천식환자들은 중증 또는 중등도의 천식 악화때문에 7일이상 병원에 입원하였고 미국흉부학회 권고사항에 맞게 치료하였다¹³. 치료는 methylprednisolone(1-2mg/kg/d)정주, salbutamol 흡입(5-20ug/kg/d), 지속적인 theophylline drip infusion (400-600mg/d)이 포함된 약물을 이용하였다.

2. 객담 채취와 처리 과정

급성 천식이 발생했을 때 자연스럽게 분리되는 객담을 모았고 객담배출이 용이하지 않을때는 가슴화된 고장의 식염수를 통해 유발시켰다. 급성 천식이 발생한 환자에서 객담은 치료전(1일전)과 치료후(7일과 28일)에 모았고 객담 유발과 처리는 Fahy등¹⁴의 실험에서 사용했던 방법을 약간 변형하여 실시하였다¹⁵. 환자들은 아침 일찍 공복시에 3% NaCl 용액 에어로졸을 20분간 흡입하였다. 대상군들은 흡입되는 동안 기침을 하도록 하였고, 50 ml의 무균관에 객담을 배출시키기 위해 규칙적으로 흡입을 중단하였다. 객담을 배출하기 전 식염수로 구강내를 씻어내도록 하였다. 에어로졸은 입자크기가 평균직경 4.5 μ m이며 분출을 1ml/min할 수 있는 초음파 가슴기(NE-U12, Omron, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 유도 객담량을 정한 후 식염수로 희석되어 0.1% 농도인 동량의 dithiothreitol(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)을 첨가했다. 그 후 vortex mixer로 조심스럽게 혼합하였다. 균질해진 표본 객담을 10분간 800배로

원심 분리하였다.

전체 세포수와 세포 생존정도를 각각 standard hemocytometer와 trypan blue exclusion을 이용해 분석하였다. 또한 각각 구성 세포수(differential count)를 알기 위해 세포들을 cytocentrifuge(cytospin 2;Shandon Instruments, Runcorn, UK)하고 Diff-Quik staining(International Reagents, UK)으로 염색하였다. 이중 맹검법을 통해 서로 다른 연구원들이 현미경을 이용해 세포수를 세었다. 약 400개의 세포들이 각각 다른 4곳의 위치에서 있었다. 편평상피세포의 수는 총세포수에서 제외되었고 구성세포수는 교정된 확률로 표현되었다. 상층액을 추출하여 VEGF와 MMP-9 분석을 위해 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

3. 객담내 VEGF와 MMP-9의 측정

VEGF의 농도는 human VEGF enzyme immunoassay kit(R & D Systems, Inc. Minneapolis, MN, USA)에 의해 측정하였고 MMP-9의 농도는 manufacturer's protocol(Fuji Chemical Industries, Toyama, Japan)에 따른 효소면역분석법에 의해 정량하였다. MMP-9의 가수력은 gelatin-zymography를 통해 측정하였고 zymography는 아래에서 설명한 것처럼 시행하였다¹⁶. 동량의 단백질이 포함된 표본들을 5배 buffer(0.4 M Tris-HCL, pH 6.8, 5% SDS, 20 % glycerol, 0.1% bromophenol blue)와 혼합하였고 0.1% gelatin을 함유하는 10% SDS-PAGE에 적용하였다. 처리후 gel들은 2.5% Triton X-100에 1시간동안 배양하였고 enzyme buffer(0.05 M Tris-HCL, pH 7.5, 0.02 M NaCl₂ and 0.02 % Brij-35)에서 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 그 후 gel들은 0.5% Coomassie brilliant blue-250 용액으로 염색하였고 30% methanol과 10% acetic acid로 탈염색하였다. 젤라틴용해력이 파란바탕에 비해 명확한 띠모양으로 검출되었다. 띠의 강도는 densitometry(LAS-1000, Fuji Film, Tokyo, Japan)를 이용해 측정하였다.

Table 1. Subject characteristics

	Control	Stable asthma	Acute asthma
No of subjects	12	12	12
Age(y)*	49.5 ± 15	47.8 ± 17	48.6 ± 18
Range	(37~73)	(38~75)	(36~72)
Sex, M/F	6/6	6/6	6/6
Initial FEV ₁ (% pred)*	99.7 ± 9.9	90.5 ± 8.3	33.4 ± 8.6 [†]

Mean ± SD

[†] <0.01 vs control and stable asthma.

Table 2. Cell analysis of sputum samples

	Control subjects	Stable asthma	Acute asthma		
			Day 1	Day 7	Day 28
Squamous cell(%)	25.1 ± 5.6	22.3 ± 6.7	22.6 ± 6.7	20.1 ± 3.3	21.1 ± 3.7
Total cell count, (10 ⁶ /ml)	1.5 ± 0.9	1.7 ± 0.8	2.7 ± 0.1 [†] ◊	2.2 ± 1.3	1.8 ± 0.5
Corrected cell counts, (10 ⁶ /ml)	1.1 ± 0.8	1.3 ± 0.7	2.2 ± 0.3 [†] ◊	1.7 ± 0.9	1.4 ± 0.6
Differential cell count(%)					
Macrophages	86.3 ± 1.5	81.2 ± 2.9	53.9 ± 13.2 [†] ◊	72.5 ± 6.5	81.5 ± 3.6
Neutrophils	11.2 ± 5.9	11.5 ± 3.7	32.8 ± 8.1 [†] ◊	19.0 ± 3.6	12.8 ± 1.5
Lymphocytes	0.6 ± 0.3	1.5 ± 1.3*	2.2 ± 0.8 [†]	1.2 ± 0.9	1.0 ± 0.7
Eosinophils	0	4.1 ± 1.0*	10.3 ± 4.2 [†] ◊	6.5 ± 1.6	3.8 ± 1.1
Epithelial cells	1.9 ± 2.3	1.7 ± 1.1	0.8 ± 0.9	0.8 ± 0.7	0.9 ± 0.8

*: p < 0.01, control vs stable asthma

[†] p < 0.01, control vs acute asthma (day 1)

◊ p < 0.01, stable asthma vs acute asthma (day 1)

4. 통계적 분석

모든 결과들은 평균 ± SD로 나타냈다. 유용한 집단내 차이의 검증을 위해 Kruskal-Wallis analysis of variance를 사용하였고 유의가 있을시 Mann-Whitney U test를 집단간 비교를 위해 사용하였다. 결과간의 상관관계를 평가하기 위해 Spearman's rank correlation을 사용하였다. 객담내 MMP-9의 시간 경과에 따른 비교는 ANOVA 와 Scheffes's test를 이용하였다. 의미있는 차이는 p값이 0.05이하 일 때로 하였다.

결 과

1. 대상군의 특징과 객담내 세포수

안정상태인 천식환자군, 급성 천식환자군, 그리고 건강대조군의 평균 연령은 유사하였다. 급성 천식환자군의 FEV₁(mean ± SD, 33.4 ± 8.6% of predicted value)은 안정상태인 천식환자군과 건강대조군(mean ± SD, 90.5 ± 8.3 and 99.7 ± 9.9% of predicted values, respectively)보다 유의있게 낮았다 (Table 1). 각각의 대상집단에서 검출된 객담내 편평

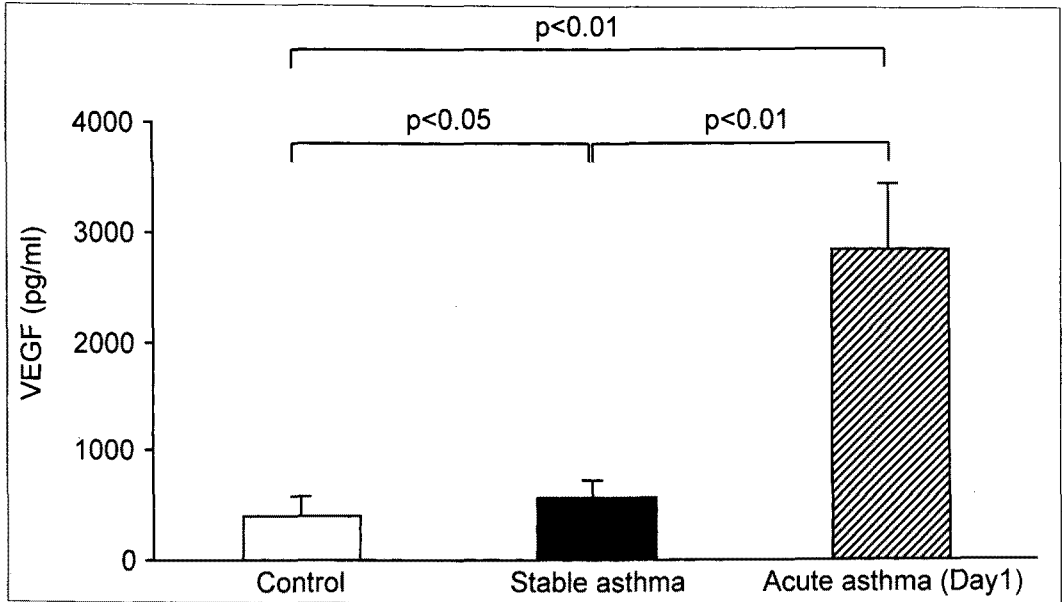


Fig. 1. VEGF concentrations in the sputum obtained from the control, stable asthmatic, and acute asthmatic subjects. The enzyme activities were measured as detailed in the methods section and are reported as a mean \pm SD.

세포들의 분율은 유의있는 변화를 보이지 않았다 (Table 2). 급성 천식환자군 (Day 1)에서 총세포수는 대조군이나 안정상태 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively)의 천식환자군에서 보다 유의있게 높았다. 호산구와 림프구들은 안정시 천식환자군에서 대조군보다 높았다 ($p < 0.01$). 중성구와 호산구들은 급성 천식환자군 (Day 1)에서 안정상태인 천식환자군보다 높았다 ($p < 0.01$).

2. 객담내 VEGF 농도

VEGF 농도는 대조군과 비교했을 때 안정상태 천식환자군에서 유의있게 증가되어 있었고, 급성 천식환자군에서 훨씬 더 높은 증가를 보였다 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). VEGF 농도는 급성 천식환자군에서 안정상태 환자군보다 유의있게 높았다 ($p < 0.01$) (Fig. 1).

발병 첫날 증가되었던 VEGF 농도는 치료 후 7일째

에 치료전에 비해 유의있게 감소하였고, 치료 후 28일째에는 더욱 많이 감소하였다 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively) (Fig. 2). 급성 천식환자에서 객담내 VEGF 농도는 호중구 및 호산구수와 유의있는 상관관계를 보였다 ($r = 0.797$; $p < 0.01$, and $r = 0.817$; $p < 0.01$, respectively) (Fig. 3).

3. 객담내 MMP-9의 농도

zymography 분석을 통해 92-kDa proMMP-9을 확인하였다 (Fig. 4A). proMMP-9의 활성은 대조군과 비교시 안정상태의 천식환자군에서 증가되어 있었고, 급성 천식환자군에서 더욱 증가 되었다. Zymography 분석으로 부터 얻은 결과와 일치하게 MMP-9 농도는 대조군과 비교시 안정 상태 천식환자군에서 유의있게 증가되었고 급성 천식환자군에서 더욱 증가하였다 ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively). MMP-9의 농도는 급성천식환자군에서 안정상태환자군보다

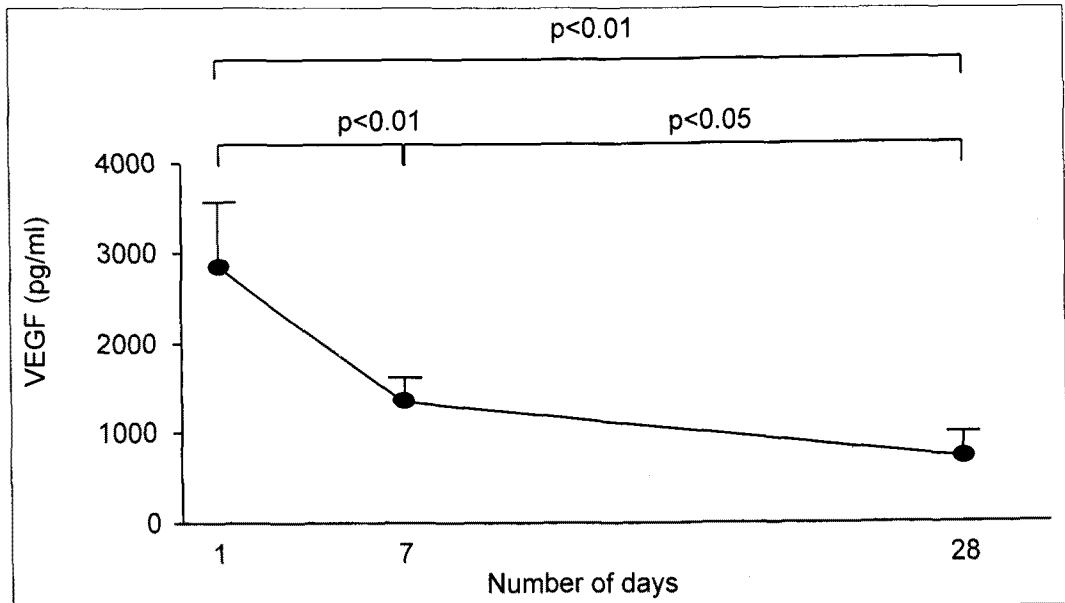


Fig. 2. Time course of the VEGF levels in sputum obtained from acute asthmatic subjects. The samples were obtained at day 1 of exacerbation, from day 7, and from day 28. The data was obtained and is reported as described for Fig. 1.

유의있게 증가하였다($p < 0.01$)(Fig. 4B). 급성 천식 환자군에서 MMP-9농도의 시간에 따른 경과를 치료 전에 비해 치료후 7일째 유의있게 감소하였고 치료후 28일째 더욱 감소하였다($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively)(Fig. 4C).

4. 급성천식에서 객담내 VEGF와 MMP-9의 상관관계

급성 천식환자군에서 객담내 MMP-9은 객담내 VEGF의 농도와 유의있는 상관관계를 보였다($r = 0.778$; $p < 0.01$)(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서 저자들은 객담내 VEGF농도가 급성 천식 환자군에서 안정상태환자군이나 건강 대조군에 비해 유의있게 증가되었음을 밝혔다. 기관지 천식은 세포 외 기질의 재구성과 콜라젠 침착이 나타날 수 있는

염증성 질환이다¹. 염증의 조직학적 특징 중 하나는 혈관생성인데 기관지 천식에서 혈관생성의 역할에 대한 유용한 자료들이 적으나, Li 등⁴은 기관지 천식환자의 기도에서 정상 대조군보다 더 많은 혈관들이 나타난다고 보고하였다. VEGF는 혈관생성에 중요한 역할을 보이는 내피세포 특이 mitogen이며 VEGF의 발현 형태는 생리학적 그리고 병리학적 조건에서 시간적으로나 공간적으로 혈관성장과 같이 일어난다.

기관지 천식시 기도점막의 염증반응은 증가된 혈관 투과성 및 혈장 삼투현상과 동반되는데 VEGF는 소포성-공포성(vesicular-vacuolar)의 세포기관들의 기능적인 활성을 증가시켜 미세혈관 투과성을 증가시키고 이에 따라 혈장단백들이 혈관밖의 공간으로 빠져나와 부종과 세포밖 기질의 심한 변화를 초래한다⁵. 기도에서 혈장 삼출액은 염증이 생긴 점막을 쉽게 통과할 수 있고 세기 쉽게 구멍이 생긴 상피를 통해 기도강 안으로 도달한다. 혈장 단백질의 누출은 두꺼워지고 충혈이 되며 부종이 생긴 기도 벽을 만들며, 천식

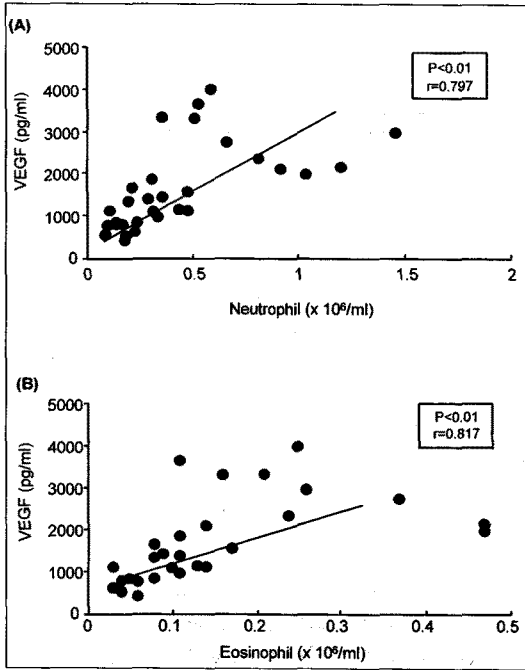


Fig. 3. Correlation between the VEGF concentrations and the number of neutrophils (A) and eosinophils (B) in the sputum of acute asthmatic patients.

발작시 보이는 좁아진 기도내강을 유도해낸다. 부가해서 혈장은 또한 상피를 통과하여 기도내강에 모인다. 혈장 삼투현상은 상피의 항상성을 손상시킬 수 있고 기도내강에의 삼투액이 섬모기능을 떨어뜨려 점액 배출이 감소하게 된다^{17,18}. 또한, 혈장단백은 점액과 염증세포, 상피세포로 혼합된 삼투액의 점착성이 강한 내강내 plug 형성을 촉진한다. 따라서, VEGF는 급성 천식환자들의 병인에 있어 중요한 역할을 한다.

본 연구에서 천식발작시 객담내 VEGF농도는 안정상태와 비교시 유의있게 높았고 스테로이드를 포함한 천식치료후에는 감소하였다. 스테로이드가 이러한 효과를 나타내는 기전은 면역반응의 억제 조절과 미세혈관의 안정화이다. 이는 혈장 삼출현상의 감소와 점막 비후의 감소를 통해 기도 협소와 염증반응을 호전시킬 수 있기 때문이다¹⁹. 스테로이드의 부종방지 효과는 폐 질환과 다른 다양한 병리학적 상태에서 또한 나타난

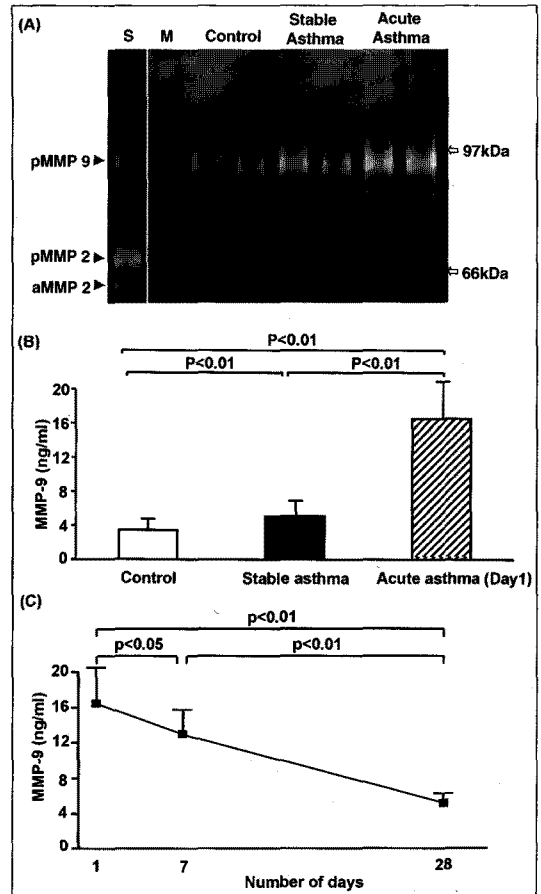


Fig. 4. Analysis of the sputum by gelatin zymography (A). A representative zymographic analysis of sputum supernatant samples obtained from two controls (lanes 3, 4), two stable asthma patients (lanes 5, 6), and two acute asthma patients (lanes 7, 8). Gelatin zymography revealed only a major band at 92 kD in all groups. Lane S contains the standards (lane 1): the proform of MMP-9 (pMMP 9), the proform of MMP-2 (pMMP 2), and the active form of MMP-2 (aMMP 2). The molecular weight markers (lane 2) were used to estimate the molecular masses. The MMP-9 concentrations in the sputum were obtained from control, stable asthmatic, and acute asthmatic subjects (B). Time course of MMP-9 in the sputum obtained from acute asthmatic subjects (C). The samples were obtained at day 1 of exacerbation, from day 7, and from day 28. The enzyme activities were measured as detailed in the methods section and are reported as a mean \pm SD.

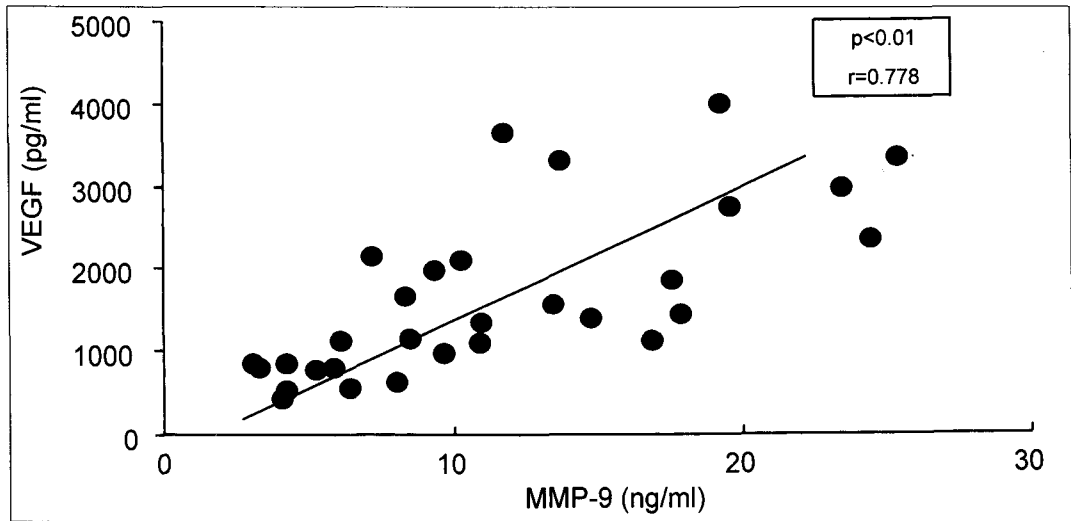


Fig. 5. Correlation between the VEGF and MMP-9 concentrations in the sputum of acute asthmatic patients.

다^{20,21}. 본 연구의 결과는 스테로이드를 포함한 천식치료는 VEGF의 과잉생산을 억제할 수 있을 수 있음을 암시한다.

저자들은 급성 천식환자들에서 객담내 VEGF와 기도내 호중구 및 호산구의 농도사이에 유의있는 상관관계가 있음을 밝혔다. 여러 연구에서 호중구와 호산구로부터의 VEGF 분비를 입증하였다^{22,23}. 저자들의 결과는 천식발작후 기도염증반응은 VEGF의 과잉생성과 관련 있음을 보여 주고있다.

본 연구에서 천식환자들에서 Pro-MMP-9 활성과 MMP-9의 농도는 대조군들보다 증가되어 있었다. 급성 천식환자에서 proMMP-9의 활성은 안정상태 환자군보다 높게 나타났고 증가된 MMP-9의 활성은 치료 7일과 28일째는 의의있게 감소되어 있고, 객담내 VEGF 양과 MMP-9 사이에 유의있는 상관관계가 있음을 알 수 있었다. Wang⁶ 등은 인간 평활근 세포에서 VEGF가 MMP-9의 분비를 촉진시킨다고 보고하였고, MMPs중 MMP-9은 특히 천식과 밀접한 관련이 있다²⁴. MMP-9은 천식에서 기관지 재구성을 야기하고 기저막을 통과해 호산구들과 호중구들의 이동을 유도하는 주요 단백 분해 효소이다²⁵. 이러한

근거들로 급성 천식 환자들에서 객담내 VEGF가 객담내 MMP-9과 관련이 있고 이를 통해 기도 재구성과 염증세포들의 이동을 초래함을 알 수 있다.

요 약

연구배경 :

기관지 천식은 기도의 재구성과 관련된 기도의 염증성 질환이다. Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 혈관생성과 염증반응에 관여하는 강력하고 다양한 기능의 사이토카인이며 Matrix metalloproteinase-9(MMP-9)은 기관지 천식에서 기도의 재구성을 일으키는 주요 단백질 분해 효소이다. 그러나, 아직 급성 기관지 천식에서 VEGF의 역할 및 VEGF와 MMP-9의 관련성등에 관한 보고는 거의 없다. 저자들은 급성 기관지 천식에서 VEGF가 기관지 염증반응에 관여하는지를 조사하였고 또한 객담내 VEGF 발현 정도와 MMP-9의 관련성도 같이 알아보려고 하였다.

방 법 :

저자들은 안정상태 및 급성천식상태 환자에서 객담내

VEGF와 MMP-9의 양을 효소 면역측정과 zymography 분석으로 측정하였고 또한 기관지 천식의 자발 발작시에도 측정하였다.

결 과 :

저자들은 급성 기관지 천식 환자군에서 안정상태의 천식환자군이나 건강 대조군보다 객담내 VEGF 양이 유의있게 높음을 알 수 있었고 또한 천식 발작시에는 안정시보다 더 유의있게 높았으며 천식치료후 점차 감소하였다. 급성 천식 환자들에서 객담내 VEGF농도는 호중구및 호산구들 수와 유의있게 관련이 있었고 또한 객담내 VEGF와 MMP-9의 농도사이에 유의있는 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

결 론 :

급성 기관지 천식 환자에서 VEGF의 과도발현은 기도 염증반응과 관련이 있으며 또한 MMP-9과도 밀접한 연관성이 관련성이 있는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma : from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45.
2. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1989;1:520-4.
3. Cotran R, Kumor V, Robin S. Inflammation and repair. In : Cotran R, Kumor V, Robin S, editors. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Philadelphia : W.B. Saunders;1989. p.39-87.
4. Li X, Wilson JW. Increased vascularity of the bronchial mucosa in mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:229-33.
5. 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.
6. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1998;83:832-40
7. Mautino G, Oliver N, Chanez P, Bousquet J, Capony F. Increased release of matrix metalloproteinase-9 in bronchoalveolar lavage fluid and by alveolar macrophages of asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:583-91.
8. Okada S, Kita H, George TJ, Gleich GJ, Leiferman KM. Migration of eosinophils through basement membrane component in vitro : role of matrix metalloproteinase-9. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:519-28.
9. Delclaux C, Delacourt C, DOrtho MP, Boyer V, Lafuma C, Harf A. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;14:288-95.
10. Kumagai K, Ohno I, Okada S, Ohkawara Y, Suzuki K, Shinya T, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *J Immunol* 1999;162:4212-9.
11. Mautino G, Henriquet C, Jaffuel D, Bousquet J, Capony F. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels in bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:324-30.
12. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225-44.
13. Corbridge TC, Hall JB. The assessment and management of adults with status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1296-316.

14. Fahy JV, Steiger DJ, Liu J, Basbaum CB, Finkbeiner WE, Boushey HA. Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:1132-7.
15. Vignola AM, Bonanno A, Mirabella A, Riccobono L, Mirabella F, Profita M, et al. Increased levels of elastase and alpha1-antitrypsin in sputum of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:505-11.
16. Vignola AM, Riccobono L, Mirabella A, Profita M, Chanez P, Bellia V, et al. Sputum metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 ratio correlates with airway obstruction in asthma and chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1945-50.
17. Persson CG. Epithelial cells: barrier functions and shedding restitution mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:9S-10S.
18. Foster WM, Langenback EG, Bergofsky EH. Lung mucociliary function in man: interdependence of bronchial and tracheal mucus transport velocities with lung clearance in bronchial asthma and healthy subjects. *Ann Occup Hyg* 1982;26:227-44.
19. Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N Engl J Med* 1995;332:868-75.
20. Criscuolo GR. The genesis of peritumoral vasogenic brain edema and tumor cysts; a hypothetical role for tumor-derived vascular permeability factor. *Yale J Biol Med* 1993;66:277-314.
21. Ktajiima Y. Glucocorticoids for dermatology disorders. *Nippon Rinsho*. 1994;52:754-9.
22. Taichman NS, Young S, Cruchley AT, Taylor P, Paleolog E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* 1997;62:397-400.
23. Horiuchi T, Weller PF. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:70-7.
24. Kim CW, Kim HJ, Park JW, Hong CS. Matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in induced sputum of bronchial asthmatics. *J Asthma Allergy Clin Immunol* 2000;20:916-26.