

论著·实验研究

布地奈德对慢性支气管哮喘小鼠肺组织 HIF-1 α 和VEGF表达及气道重塑的影响

孙妍¹ 王金荣¹ 韩秀珍¹ 李化兵² 孙立锋¹ 陈星¹ 冯益真¹

(1. 山东大学附属省立医院儿科, 山东 济南 250021; 2. 山东省诸城市人民医院儿科, 山东 诸城 262200)

[摘要] 目的 研究布地奈德对慢性哮喘小鼠缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、血管内皮生长因子(VEGF)表达的调控和对血管生成、气道重塑的影响。方法 30只雌性BALB/c小鼠随机分为对照组、模型组和治疗组,每组10只。卵清蛋白(OVA)激发试验建立哮喘小鼠模型,治疗组从第28天开始每日在OVA激发前1h雾化吸入布地奈德100 μ g/kg,对照组以PBS代替OVA。苏木精-伊红染色分析气管管壁厚度变化,Masson染色分析肺组织胶原沉积,免疫组织化学染色法检测肺组织血管生成情况,免疫组织化学染色法和Western blot检测HIF-1 α 、VEGF表达水平。分析气管管壁厚度、血管面积百分比与VEGF、HIF-1 α 表达的相关性。结果 模型组较对照组气道管壁增厚,肺组织胶原沉积、血管面积、HIF-1 α 和VEGF表达显著增加;治疗组较模型组气道管壁厚度、肺组织胶原沉积及血管面积减少,HIF-1 α 和VEGF表达显著下降。气道管壁厚度、血管面积分别与HIF-1 α 及VEGF表达呈正相关,HIF-1 α 与VEGF表达亦呈正相关。结论 布地奈德通过抑制HIF-1 α 、VEGF表达,明显减轻哮喘小鼠肺组织血管生成和气道重塑。

[中国当代儿科杂志,2012,14(8):622-627]

[关键词] 哮喘;布地奈德;缺氧诱导因子-1 α ;血管内皮生长因子;气道重塑;小鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)08-0622-06

Effects of budesonide on HIF-1 α and VEGF expression and airway remodeling in an asthmatic mouse model

SUN Yan, WANG Jin-Rong, HAN Xiu-Zhen, LI Hua-Bing, SUN Li-Feng, CHEN Xing, FENG Yi-Zhen. Department of Pediatrics, Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China (Han X-Z, Email: hanxz1119@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effects of budesonide on hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression, angiogenesis and airway remodeling in the chronic asthmatic mouse model. **Methods** Thirty female BALB/c mice were randomly divided into normal control, asthma model and treatment groups (10 in each group). The asthmatic mouse model was established via OVA challenge test. Mice in the treatment group were administered with aerosol budesonide(100 μ g/kg) an hour before the OVA challenge test from the 28th day. Mice in the control group were treated with PBS instead of OVA. Hematoxylin and eosin staining was performed to observe thickness of the airway wall. Masson staining was used for examining collagen deposition of lung tissues. Angiogenesis and HIF-1 α and VEGF expression were measured using immunohistochemistry and Western blot. The relationship of airway wall thickness and vessel area to HIF-1 α and VEGF expression was investigated. **Results** Vessel area, collagen deposition of lung tissues and airway wall thickness increased in the asthma model group. Levels of HIF-1 α and VEGF were also elevated. Administration of budesonide significantly reduced angiogenesis, collagen deposition of lung tissues and airway wall thickening, as well as expression of HIF-1 α and VEGF. The vessel area and airway wall thickness were positively correlated with expression of HIF-1 α and VEGF. A positive correlation was also found between the expression of HIF-1 α and VEGF. **Conclusions** Budesonide can decrease angiogenesis and airway remodeling by inhibiting HIF-1 α and VEGF expression in asthmatic mice.

[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(8):622-627]

Key words: Asthma; Budesonide; Hypoxia inducible factor-1 α ; Vascular endothelial growth factor; Airway remodeling; Mice

[收稿日期]2012-02-07; [修回日期]2012-04-15
[基金项目]山东省自然科学基金资助项目(No. Y2005C39)。
[作者简介]孙妍,女,博士研究生,主治医师。
[通信作者]韩秀珍,主任医师。

哮喘是一种由多种炎症细胞参与的气道慢性炎症性疾病,许多细胞因子参与致病,发病机制不明。哮喘虽可以控制,但慢性炎症持续存在,从而导致在多种细胞因子共同作用下,最终发生不可逆性气道重塑,加重气流阻塞和气道高反应性。另外血管生成也参与气道重塑,降低气道顺应性。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)具有促进内皮细胞增殖、增加微血管通透性、促进血管生成和成熟的功能^[1],且 VEGF 参与哮喘气道重塑中平滑肌细胞增殖^[2]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)是近年发现的普遍存在于哺乳动物细胞内的缺氧应答调控因子,可调控 VEGF 等基因表达,在哮喘信号转导中有重要作用^[3-4]。本实验旨在通过研究布地奈德吸入对慢性哮喘小鼠血管生成、气道重塑的影响及 HIF-1 α 、VEGF 表达的调控,探讨布地奈德对于哮喘气道重塑的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

雌性 BALB/c 小鼠 30 只,体重 20 ± 2 g 左右,由山东大学医学院实验动物中心提供。卵清蛋白(OVA)购于美国 Sigma 公司;小鼠抗 HIF-1 α 、VEGF 抗体及 β -actin 多克隆抗体均购于美国 Santa Cruz 公司;兔抗小鼠 von Willebrand factor(vWF)抗体购自 Gene Tech 公司;免疫组化检测试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;HRP 标记羊抗小鼠二抗购自 Dako Cytomation 公司;超声雾化器由 Bestnebulizer 公司提供。

1.2 动物分组及模型建立

采用随机数字表法将 30 只小鼠随机分为对照组、模型组和治疗组,每组 10 只。模型组小鼠第 1 天和第 14 天腹腔注射含 $100 \mu\text{g}$ OVA 与 1 mg 氢氧化铝的磷酸盐缓冲 PBS 溶液 0.2 mL 各 1 次;第 21 天开始每天雾化吸入含 2% OVA 的 PBS 溶液 1 次,每次激发 30 min。OVA 激发后,小鼠出现烦躁不安、呛咳、呼吸加快及四肢瘫软等症状,视为激发成功,并持续雾化吸入。治疗组小鼠在按模型组方案处理同时,第 28 天开始每日雾化吸入布地奈德 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$,之后 1 h 给予雾化吸入含 2% OVA 的 PBS 溶液 30 min。对照组同时时间点给予 PBS 腹腔注射及雾化刺激。

1.3 标本采集

末次激发后 24 h,采用 1% 戊巴比妥钠 $30 \text{ mg}/\text{kg}$ 腹腔注射麻醉后处死动物。取部分肺组织置于 10%

中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋, $5 \mu\text{m}$ 连续切片,病理切片用于免疫组化和苏木精-伊红(HE)染色、Masson 染色。光镜下观察肺组织病理变化。部分肺组织置于液氮保存。

1.4 染色分析

1.4.1 HE 染色 HE 染色按常规方法进行。每个标本选取 4 个直径在 $100 \sim 200 \mu\text{m}$ 范围内的不含软骨的完整气管横断面行光镜下形态学观察,采用 Image-proplus 6.0 图像分析软件进行测量,测定参数包括支气管管壁内周长(Pi)、支气管管壁外周面积(WAt₁)、支气管管壁内周面积(WAt₂),计算管壁总面积(WAt) = WAt₁ - WAt₂,以 WAt / Pi ($\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}$)表示支气管管壁厚度^[5],并以此衡量气道重塑程度。

1.4.2 Masson 染色 Masson 染色后,胶原纤维呈绿色,肌纤维和红细胞呈红色,胞核呈蓝色。胶原纤维沉积程度依据支气管及血管周围胶原沉积量分为 4 级:0 级为无胶原或仅有少量细丝状胶原;1 级为胶原纤维轻度增多,呈细束状;2 级为胶原纤维中度增多,融合成细带状;3 级为胶原纤维明显增多,融合成宽带状或小片状。每个标本选取 5 个高倍视野,分别计算各组胶原沉积指数。

1.5 免疫组织化学染色及肺组织血管面积百分比计算

石蜡切片脱蜡,枸橼酸钠缓冲液加热沸腾进行抗原修复,室温 3% H₂O₂ 孵育 15 min,去除内源性过氧化物酶的活性。分别加 HIF-1 α 、VEGF 及 vWF 一抗(1:200)4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒过夜,加入生物素化二抗和 SAB 试剂,DAB 显色,PBS 终止反应,苏木素复染、透明、封片。细胞核或细胞浆光镜下出现棕黄色产物者为阳性反应。PBS 代替一抗作阴性对照。用 Leica Owin 软件分析血管生成情况,每个标本观察 5 张切片,每张切片在显微镜下随机选取 10 个视野,计算 vWF-阳性反应的血管面积占视野的百分比,即肺组织血管面积百分比。

1.6 Western blot 检测

每只小鼠取 100 mg 肺组织,剪碎后加入蛋白酶抑制剂和细胞裂解液,超声粉碎,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min ($15000 \text{ r}/\text{min}$),上清用 BCA 法测蛋白质浓度。等量蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,含 5% BSA 的 TBS 室温封闭 1 h,然后加入 HIF-1 α 、VEGF 抗体(1:200)及 β -actin 多克隆抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜。HRP 标记二抗杂交,洗膜后化学发光并曝光成像,利用图像分析系统扫描。 β -actin 为内参照,靶蛋白/ β -actin 相对吸光度值代表蛋白表达。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA 检验和 Mann-Whitney 检验。相关性分析采用 Spearman 相关检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织气管管壁厚度比较

对照组小鼠肺组织气道黏膜结构完整, 上皮细

胞无增殖, 未见管壁水肿及明显炎性细胞浸润。模型组肺组织气管黏膜上皮部分脱落, 小气道上皮复层化, 管壁出现以淋巴细胞、巨噬细胞为主的炎性细胞浸润, 平滑肌增厚, 支气管黏膜皱襞显著增多, 部分突入管腔, 气管壁厚度较对照组显著增加 ($17.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$ vs $11.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $P < 0.01$)。治疗组炎性细胞浸润和气道黏膜结构损伤程度较模型组明显减轻, 气管管壁厚度较模型组降低 ($14.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ vs $17.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$, $P < 0.01$), 但仍较对照组增加 ($14.0 \pm 0.3 \mu\text{m}$ vs $11.1 \pm 0.4 \mu\text{m}$, $P < 0.01$)。见图 1 ~ 2。

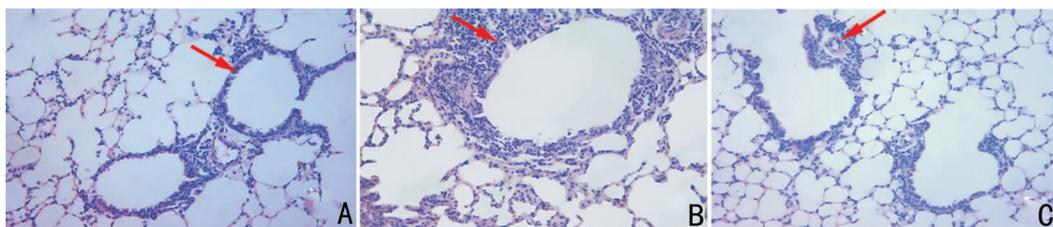


图1 各组小鼠肺组织苏木精-伊红染色(×200) A:对照组,肺组织气管黏膜结构完整,无明显炎性细胞浸润;B:模型组,肺组织气管黏膜结构损伤、炎性细胞浸润;C:治疗组,肺组织气管黏膜结构损伤和炎性细胞浸润较模型组减轻。箭头所指为肺组织气管炎性细胞浸润。

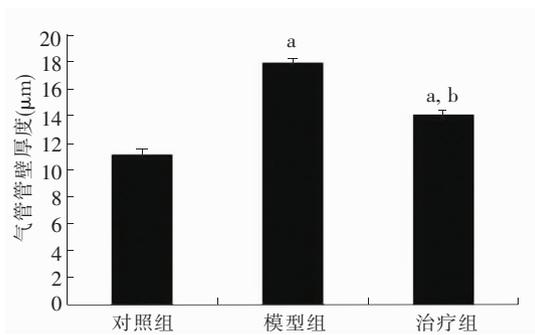


图2 各组小鼠肺组织气管管壁厚度比较(n=10) a: 与对照组比较, P < 0.01; b: 与模型组比较, P < 0.01。

2.2 各组肺组织胶原沉积指数比较

对照组气道壁薄, 黏膜结构完整, 平滑肌无增殖, 胶原染色着色浅, 染色面积少, 胶原主要分布于支气管及血管周围。模型组气道壁明显增厚, 平滑肌增生肥厚, 胶原染色着色重, 染色面积大, 支气管黏膜下、血管壁及周围、肺泡壁、肺间质均有胶原大量沉积, 胶原沉积指数较对照组显著增加 (2.70 ± 0.24 vs 0.60 ± 0.26 , $P < 0.01$)。治疗组气管管壁增生较模型组减轻, 且胶原沉积也较模型组明显减少 (2.10 ± 0.29 vs 2.70 ± 0.24 , $P < 0.05$), 但仍较对照组增加 (2.10 ± 0.29 vs 0.60 ± 0.26 , $P < 0.01$)。见图 3 ~ 4。

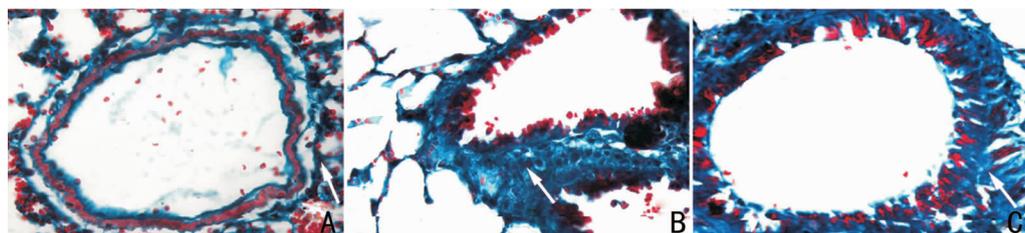


图3 各组小鼠肺组织 Masson 染色(×400) A:对照组,肺组织有少量胶原沉积在肺间质;B:模型组,支气管黏膜下、肺间质均有胶原大量沉积;C:治疗组,肺组织胶原沉积较模型组显著减少。箭头所指为绿色胶原沉积。

2.3 各组血管生成变化

对照组小鼠血管管腔规则, 血管面积百分比少。模型组小鼠肺组织血管明显增多, 多靠近气道上皮表面, 甚至完全位于上皮细胞内, 血管结构异常, 管腔不规则, 血管面积百分比比较对照组显著增加 ($2.83\% \pm$

0.90% vs $0.42\% \pm 0.10\%$, $P < 0.01$)。治疗组小鼠肺组织血管增生减少, 血管面积百分比比较模型组明显减少 ($0.78\% \pm 0.14\%$ vs $2.83\% \pm 0.90\%$, $P < 0.01$), 但仍较对照组增加 ($0.78\% \pm 0.14\%$ vs $0.42\% \pm 0.10\%$, $P < 0.05$)。见图 5 ~ 6。

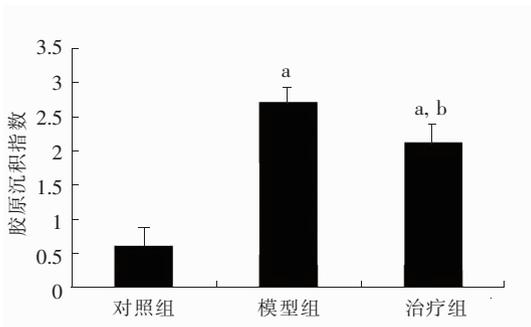


图4 各组小鼠肺组织胶原沉积指数比较(n=10) a: 与对照组比较, P<0.01; b: 与模型组比较, P<0.01。

2.4 各组 HIF-1 α 蛋白表达变化

对照组小鼠 HIF-1 α 呈少量表达。模型组小鼠 HIF-1 α 表达增加,主要位于肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞。治疗组小鼠 HIF-1 α 蛋白表达较模型组明显减少(图7)。Western blot 结果也证实, HIF-1 α 蛋白表达量在模型组小鼠较对照组显著增加(0.97 \pm 0.47 vs 0.32 \pm 0.12, P<0.01), 治疗组表达量较模型组明显减少(0.88 \pm 0.41 vs 0.97 \pm 0.47, P<0.05), 但仍较对照组增加(0.88 \pm 0.41 vs 0.32 \pm 0.12, P<0.05), 见图8。

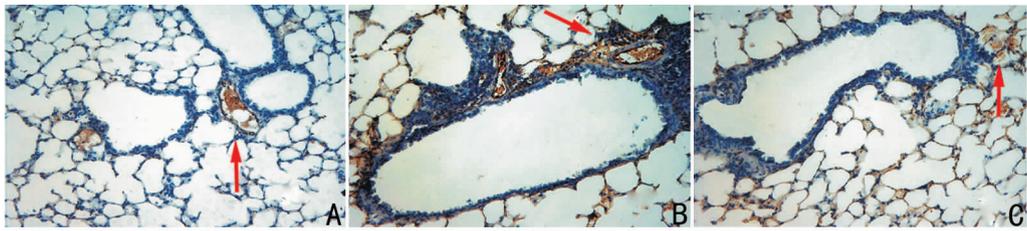


图5 各组小鼠肺组织血管免疫组织化学染色(DAB显色, $\times 200$) A: 对照组, 肺组织血管少量分布; B: 模型组, 肺组织血管明显增多, 多靠近气道上皮表面; C: 治疗组, 肺组织血管增生较模型组减轻。箭头所指为 vWF 阳性血管表达。

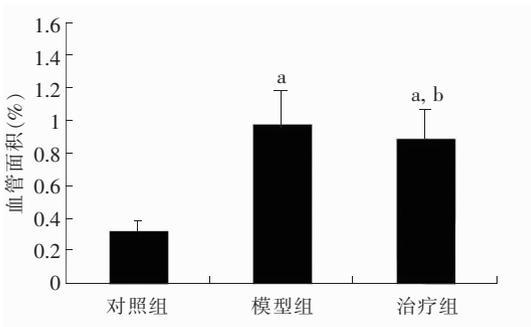


图6 各组小鼠肺组织血管面积比较(n=10) a: 与对照组比较, P<0.01; b: 与模型组比较, P<0.01。

2.5 各组 VEGF 蛋白表达变化

对照组小鼠肺组织 VEGF 少量表达。模型组表达明显增多,主要位于气道上皮细胞、肺泡上皮细胞和血管内皮细胞。治疗组小鼠雾化吸入布地奈德后, VEGF 表达量较模型组明显降低(图9)。Western blot 结果也证实 VEGF 蛋白表达在模型组小鼠较对照组显著增加(2.08 \pm 0.30 vs 0.96 \pm 0.30, P<0.01), 治疗组表达量较模型组明显减少(1.12 \pm 0.22 vs 2.08 \pm 0.30, P<0.01), 但仍较对照组增加(1.12 \pm 0.22 vs 0.96 \pm 0.30, P<0.01)。见图8。

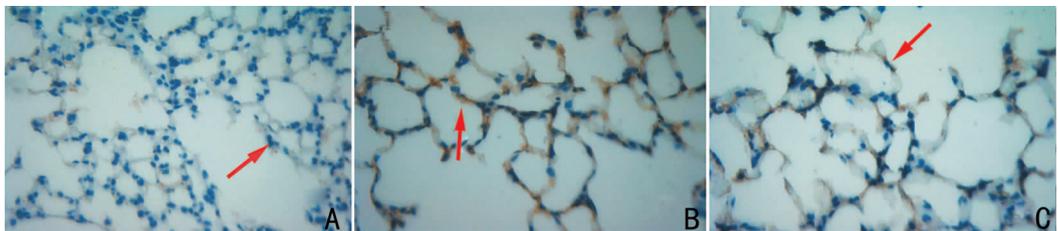


图7 各组小鼠肺组织免疫组织化学染色检测 HIF-1 α 表达水平(DAB显色, $\times 400$) A: 对照组, 肺组织肺泡上皮细胞 HIF-1 α 呈轻度表达; B: 模型组, 肺组织肺泡上皮细胞 HIF-1 α 表达量明显高于对照组; C: 治疗组, 肺组织肺泡上皮细胞 HIF-1 α 表达量低于模型组。箭头所指为 HIF-1 α 阳性表达。

2.6 气管管壁厚度、血管面积百分比与 VEGF、HIF-1 α 表达的相关性分析

模型组和治疗组气管管壁厚度与 HIF-1 α 和 VEGF 表达均呈正相关(r 分别为 0.749 和 0.779, 均

P<0.01); 血管面积百分比与 HIF-1 α 和 VEGF 表达也呈现正相关(r 分别为 0.785 和 0.693, 均 P<0.01)。且 HIF-1 α 与 VEGF 蛋白表达亦呈显著正相关(r=0.641, P<0.05)。

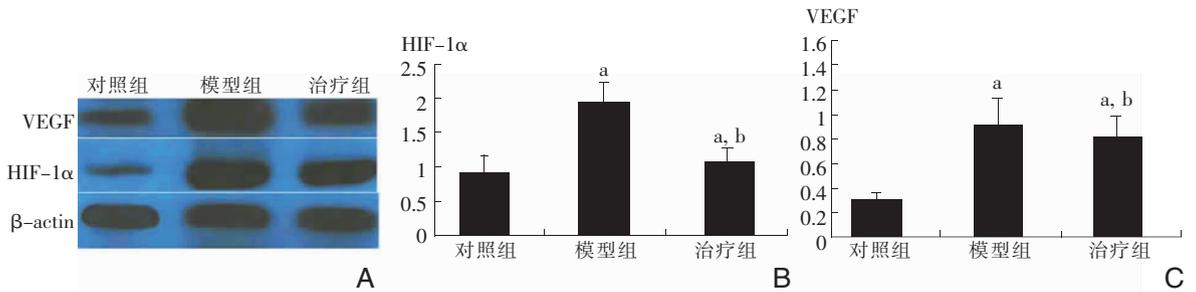


图8 Western blot 检测各组肺组织 VEGF 和 HIF-1 α 表达水平 ($n=10$) A: 各组小鼠肺组织 VEGF 和 HIF-1 α 表达的 Western blot 结果; B: 各组小鼠肺组织 HIF-1 α 表达的相对吸光度值比较; C: 各组小鼠肺组织 VEGF 表达的相对吸光度值比较。a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

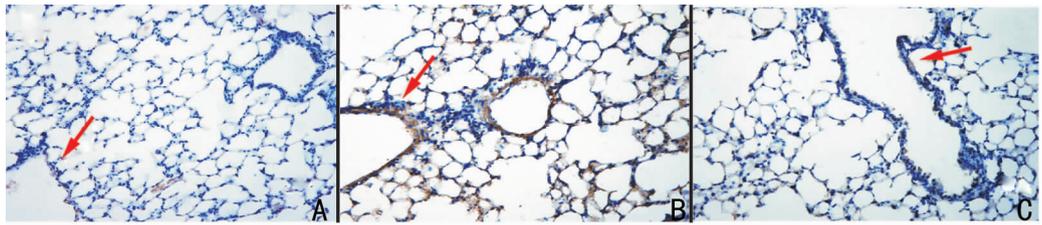


图9 各组小鼠肺组织免疫组织化学染色检测 VEGF 表达水平 (DAB 显色, $\times 200$) A: 对照组, 肺组织气道上皮细胞 VEGF 呈轻度表达; B: 模型组, 肺组织气道上皮细胞 VEGF 表达水平高于对照组; C: 治疗组, 肺组织气道上皮细胞 VEGF 表达水平低于模型组。箭头所指为 VEGF 阳性表达。

3 讨论

气道重塑是慢性哮喘的重要病理特征。哮喘小鼠支气管黏膜下、肺泡壁、肺间质胶原大量沉积, 气道壁明显增厚, 气道阻力增加, 从而肺纤维化进程加剧, 最终导致肺功能降低。另外也有哮喘者肺组织血管生成增加的报道^[6]。慢性哮喘肺组织血管生成增加能够促进气道平滑肌细胞、成纤维细胞增生、肥大及分泌功能, 导致炎症细胞浸润增加, 加重气道壁增厚, 在哮喘气道重塑中具有重要意义。本研究肺组织病理分析显示, 模型组较对照组小鼠气道上皮细胞明显增生, 平滑肌增厚, 胶原沉积增加, 血管生成增加, 气管管壁明显增厚; 布地奈德吸入治疗后, 小鼠肺组织气管管壁厚度、血管生成显著减轻, 胶原沉积明显减少, 并由此减轻气流阻塞和持续性气道高反应性, 从而有效抑制气道重塑。

VEGF 是血管生成最主要的调节因子之一^[7], 能够增加血管通透性, 促进血管形成^[8-9]和肺血管增殖^[10]。本研究中模型组较对照组小鼠 VEGF 表达明显增加, 且 VEGF 表达与血管面积百分比呈正相关。

哮喘发作时, 肺组织缺氧严重, VEGF 基因转录和 mRNA 稳定性都显著增加, 不仅促进血管生成, 同时作为促血管渗漏因子, 通过增加哮喘气道血管

的渗透性, 也促进各种炎症细胞、血浆成分渗出, 加重局部气道的炎症反应, 引起血管外基质的结构改变和间质水肿^[11]。亦有 VEGF 参与哮喘气道重塑平滑肌增殖的报道^[12]。本研究显示 VEGF 表达与气管管壁厚度呈正相关, 有促进气道重塑的作用。布地奈德吸入后, 胶原沉积和血管生成均受到抑制, 气管管壁厚度减少, VEGF 表达显著降低, 可见 VEGF 是布地奈德抑制哮喘气道重塑的重要作用因子。

HIF-1 是低氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内的转录因子, HIF-1 α 决定 HIF-1 的活性^[13]。哮喘发作期肺组织缺氧, 缺氧状态促使 HIF-1 α 转录增加、降解减少, 气道痉挛使支气管壁平滑肌细胞机械张力增加, HIF-1 α 蛋白表达上调^[14-15]。作为低氧诱导基因转录信息传递的最主要途径, HIF-1 α 调控下游众多基因如 VEGF 的转录和表达^[16]。VEGF 5' 端增强子内存在 HIF-1 α 的结合位点 HRE, 低氧条件下, HIF-1 α 与 VEGF 5' 端增强子结合后, VEGF 转录和表达增强, 血管生成增加, 使血液到达缺氧部位。注射 HIF-1 α 活性成分能诱导非缺血组织的血管生成^[17], 证实 HIF-1 α 具有促血管生成作用。本研究结果显示, HIF-1 α 表达不仅与 VEGF 表达呈正相关, 且与血管面积百分比、气管管壁厚度亦呈正相关。模型组小鼠 HIF-1 α 蛋白表达增加, 促进靶因子 VEGF 转录, 血管生成增加, 气管管壁增厚, 从而加

重气道重塑。布地奈德吸入后, HIF-1 α 表达降低, VEGF 转录下调, 血管生成和气管管壁增生减轻, 明显抑制气道重塑的进展。由此证明 HIF-1 α 、VEGF 途径是布地奈德抑制哮喘气道重塑的调控机制。

糖皮质激素是目前治疗哮喘的强有效药物^[18], 本研究中其对于气道重塑的抑制作用得到证实, 作用机制也进一步明确。吸入布地奈德, 通过降低 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达, 减轻气道炎性细胞浸润、气管管壁增厚, 减少胶原沉积、血管生成, 从而抑制哮喘气道重塑, 为糖皮质激素治疗哮喘气道重塑提供了理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Lee SY, Kwon S, Kim KH, Moon HS, Song JS, Park SH, et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients[J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2006, 97(6): 794-799.

[2] 邹晖, 徐永健, 张珍祥. 血管内皮生长因子及其受体 2 与哮喘模型大鼠气道平滑肌细胞增殖关系的研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2010, 19(4): 321-326.

[3] Yu P, Kodadek T. Dynamics of the hypoxia-inducible factor-1-vascular endothelial growth factor promoter complex [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (48): 35035-35045.

[4] Kim SR, Lee KS, Park SJ, Min KH, Choe YH, Moon H, et al. Involvement of sirtuin 1 in airway inflammation and hyperresponsiveness of allergic airway disease[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(2): 449-460.

[5] Yamaguchi M, Niimi A, Matsumoto H, Ueda T, Takemura M, Matsuoka H, et al. Sputum levels of transforming growth factor-beta1 in asthma; relation to clinical and computed tomography findings[J]. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2008, 18(3): 202-206.

[6] Hoshino M, Aoike N, Takahashi M, Nakamura Y, Nakagawa T. Increased immunoreactivity of stromal cell-derived factor-1 and angiogenesis in asthma[J]. *Eur Respir J*, 2003, 21(5): 804-809.

[7] Baluk P, Lee CG, Link H, Ator E, Haskell A, Elias JA, et al. Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways[J]. *Am J Pathol*, 2004, 165 (4): 1071-1085.

[8] Yuksel H, Kose C, Yilmaz O, Ozbilgin K, Degirmenci PB, Pinar E, et al. Increased expression of tissue vascular endothelial growth factor and foetal liver kinase-1 receptor in seasonal allergic rhinitis and relevance to asthma component[J]. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37(8): 1183-1188.

[9] Detoraki A, Granata F, Staibano S, Rossi FW, Marone G, Genovese A. Angiogenesis and lymphangiogenesis in bronchial asthma[J]. *Allergy*, 2010, 65(8): 946-958.

[10] 侯伟, 刘海燕, 李丹, 周骞平, 陈玺. 新生大鼠高氧肺损伤血管内皮生长因子蛋白及其 mRNA 表达变化研究[J]. *中国当代儿科杂志*, 2008, 10(2): 207-210.

[11] Chetta A, Zanini A, Foresi A, D'Ippolito R, Tipa A, Castagnaro A, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulation and bronchial wall remodelling in asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2005, 35(11): 1437-1442.

[12] Kazi AS, Lotfi S, Goncharova EA, Tliba O, Amrani Y, Krymskaya VP, Lazaar AL. Vascular endothelial growth factor-induced secretion of fibronectin is ERK dependent[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(3): L539-L545.

[13] Kaelin WG Jr. How oxygen makes its presence felt[J]. *Genes Dev*, 2002, 16 (12): 1441-1445.

[14] Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzgen E, Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2005, 25(6): 297-310.

[15] Hasaneen NA, Zucker S, Cao J, Chiarelli C, Panettieri RA, Foda HD. Cyclic mechanical strain-induced proliferation and migration of human airway smooth muscle cells: role of EMMPRIN and MMPs[J]. *FASEB J*, 2005, 19(11): 1507-1509.

[16] Liu LZ, Jing Y, Jiang LL, Jiang XE, Jiang Y, Rojanasakul Y, et al. Acacetin inhibits VEGF expression, tumor angiogenesis and growth through AKT/HIF-1 α pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 413(2): 299-305.

[17] Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, Oshima Y, Cai Z, Berg-Dixon S, et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Circ Res*, 2003, 93(11): 1074-1081.

[18] Korideck H, Peterson JD. Noninvasive quantitative tomography of the therapeutic response to dexamethasone in ovalbumin-induced murine asthma[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(3): 882-889.

(本文编辑:万静)