

临床研究

先天性心脏病相关性肺动脉高压肺组织芳香烃受体的表达及其与肺血管重构的相关性研究

罗鹏, 庞玲品*, 吴源聪*, 陈普文, 朱秀龙, 陈强, 黄石安, 何建国

摘要

目的: 了解先天性心脏病相关性肺动脉高压(CHD-PAH)患者肺组织是否有芳香烃受体(AHR)表达, 同时探讨AHR表达量与肺血管重构是否相关。

方法: 入选超声心动图和右心导管检查确诊的择期外科修补术的CHD-PAH患者32例。术中行肺组织活检。采用组织免疫荧光检测肺组织标本AHR表达情况, 运用图像分析软件计算肺小血管的管壁面积/管总面积(WA/TA)和管壁厚/管外径(WD/TD)2个相对比值, 采用实时荧光定量多聚酶链反应(Real-Time PCR)方法检测AHR mRNA、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) mRNA、芳香烃受体核转位蛋白(ARNT) mRNA和血管内皮生长因子(VEGF) mRNA表达情况。此外, 术前采集患者外周血, 采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清AHR浓度。

结果: 32例患者肺组织中均有AHR表达。且肺组织AHR mRNA表达量与平均肺动脉压(mPAP) ($r=0.809$, $P<0.001$)、肺小血管WA/TA ($r=0.723$, $P<0.001$)和WD/TD ($r=0.746$, $P<0.001$)、HIF-1 α mRNA表达量 ($r=0.889$, $P<0.001$)、ARNT mRNA表达量 ($r=0.738$, $P<0.001$)、VEGF mRNA表达量 ($r=0.822$, $P<0.001$)呈正相关。肺组织VEGF mRNA表达量与mPAP ($r=0.739$, $P<0.001$)、WD/TD ($r=0.702$, $P<0.001$)和WA/TA ($r=0.657$, $P<0.001$)呈正相关。血清AHR浓度与mPAP ($r=0.754$, $P<0.001$)、WD/TD ($r=0.754$, $P<0.001$)和WA/TA ($r=0.739$, $P<0.001$)呈正相关。

结论: AHR可能参与CHD-PAH患者的肺血管重构。

关键词 先天性心脏病相关性肺动脉高压; 芳香烃受体

The Aryl-hydrocarbon Receptor Expression in Patients of Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Congenital Heart Disease and its Relationship to Pulmonary Vascular Remodeling

LUO Peng, PANG Ling-pin, WU Yuan-cong, CHEN Pu-wen, ZHU Xiu-long, CHEN Qiang, Huang Shi-an, HE Jian-guo.

Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang (524001), Guangdong, China

Co-corresponding Authors: Huang Shi-an, Email: huangshian1969@126.com and HE Jian-guo, Email: hejianguofw@163.com

Abstract

Objective: To study if there is an aryl-hydrocarbon receptor (AHR) expression in patients of pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease (CHD-PAH) and to explore if the amount of AHR expression related to pulmonary vascular remodeling.

Methods: A total of 32 CHD-PAH patients diagnosed by echocardiography and right heart catheterization for surgical repair were enrolled, and the lung tissue biopsy was performed during the operation. The pulmonary AHR was detected by immunofluorescence assay, the ratios of vessel wall area/total area (WA/TA) and vessel wall thickness/vessel external diameter (WD/TD) of small pulmonary arteries were calculated with the imaging software, the mRNA expression of AHR, hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were examined by RT-PCR. In addition, blood level of AHR was measured by ELISA.

Results: There was AHR expression in pulmonary tissue in all 32 patients. And AHR mRNA expressions were positively related to mPAP ($r=0.809$, $P<0.001$), WA/TA ($r=0.723$, $P<0.001$), WD/TD ($r=0.746$, $P<0.001$); and positively related to mRNA

基金项目: 国家自然科学基金(81170155)

作者单位: 524001 广东省湛江市, 广东医学院附属医院 心血管内科(罗鹏、庞玲品、吴源聪、陈普文、陈强、黄石安);

高州市人民医院 心血管内科(朱秀龙); 阜外医院 肺血管病诊治中心(何建国)

作者简介: 罗鹏 住院医师 硕士 主要从事心血管病研究 Email: luopengde@163.com 通讯作者: 黄石安 Email: huangshian1969@126.com

何建国 Email: hejianguofw@163.com *共同第一作者

中图分类号: R54 文献标识码: A 文章编号: 1000-3614 (2015) 10-0971-05 doi:10.3969/j.issn.1000-3614.2015.10.011

expressions of HIF-1 α ($r=0.889, P<0.001$), ARNT ($r=0.738, P<0.001$), VEGF ($r=0.822, P<0.001$). Pulmonary tissue VEGF mRNA expressions were positively related to mPAP ($r=0.739, P<0.001$), WD/TD ($r=0.702, P<0.001$) and WA/TA ($r=0.657, P<0.001$). Blood levels of AHR were positively related to mPAP ($r=0.754, P<0.001$), WD/TD ($r=0.754, P<0.001$) and WA/TA ($r=0.739, P<0.001$).

Conclusion: AHR might be involved in pulmonary vascular remodeling in CHD-PAH patients.

Key words Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease; Aryl-hydrocarbon receptor

(Chinese Circulation Journal, 2015,30:971.)

先天性心脏病相关性肺动脉高压 (CHD-PAH) 是国内肺动脉高压的主要类型^[1]。肺动脉高压是这类患者主要死亡原因。最开始, 肺动脉压力的升高是由于左向右分流, 使肺血流量增加。但是随着肺血流量增加, 血管收缩、内膜增生、原位血栓、细胞凋亡受阻、血管重构、炎症反应接踵而来。最终导致不可逆肺动脉压力升高, 右心室后负荷增加, 右心室重构, 右心衰竭^[2]。到目前为止, 肺血管的重构的机制仍然不清楚。因此研究肺血管重构的机制, 从而为治疗肺动脉高压寻找新的靶点, 显得尤为重要。芳香烃受体 (AHR) 是一种配体激活转录因子, 由 805 个氨基酸组成。AHR 属于碱性螺旋-环-螺旋超家族中的一个亚家族: PAS 家族。外界环境中, 有两大类化合物可激活 AHR 信号: 卤代芳烃 [如 2, 3, 7, 8-四氯化二苯并二噁英 (TCDD)] 和多环芳烃 (如苯并 a 芘)。在细胞质中, 未与配体结合的 AHR 与两个分子量 90 kD 的热休克蛋白、一个 X 相关蛋白、一个 p23 分子伴侣蛋白形成化合物。当 AHR 与外源配体结合后, AHR 转位到细胞核, 与上述伴侣分子脱离, 并与芳香烃受体核转位蛋白形成二聚体, 与外源性化合物反应元件结合, 引起一系列靶基因的表达, 包括 I 相和 II 相代谢酶, 如细胞色素 P450 家族 (CYP1A1、CYP1B1 和 CYP1A2), 使机体对外来毒物的氧化代谢作用增强, 对外来毒物起到调节作用。随着生物的进化, AHR 对外界环境的调节作用也用来调节重要的生理过程^[3]。最近 10 年, 越来越多的证据显示 AHR 在血管疾病的发病过程中起重要作用。AHR 基因敲除的小鼠可出现心室肥厚和高血压等现象^[4-6], TCDD 诱导胚胎血管重构^[7, 8], 另外我们实验室最新研究发现 AHR 与冠心病发生风险密切相关^[9]。因此, 我们推论在 CHD-PAH 患者肺组织中 AHR 有异常表达, 且可能参与肺血管重构。

1 资料与方法

入选 2012-03 至 2013-01 我院及高州市人民医

院经超声心动图及右心导管诊断的预行外科修补术的 CHD-PAH 患者 32 例, 男性 13 例, 女性 19 例, 年龄 19~63 岁。其中动脉导管未闭患者 8 例, 房间隔缺损患者 14 例, 室间隔缺损患者 10 例, 双向分流 4 例, 左向右分流 28 例。术前采集外周血, 术中行肺组织活检。所有患者均签署知情同意书。超声心动图评价先天性心脏病的解剖畸形, 心内分流情况。

右心导管检查: 患者平卧, 局部麻醉。术者穿刺股静脉, 送入 6~8 F 导管, 经股静脉, 下腔静脉, 进入右心房, 右心室, 肺动脉。分别测定相应部位的的压力和血氧饱和度。根据患者年龄、性别和体表面积估算患者氧耗量。另抽取股动脉血测定体动脉血氧饱和度。如果患者体动脉饱和度 >95% 时, 肺静脉血饱和度以 100% 计算; 如果体动脉血饱和度 <95% 时, 肺静脉血饱和度以 95% 为准。最后用 FICK 法计算出体循环血流量、肺循环血流量、肺循环血流量与体循环血流量比值 (QP/QS 值)、肺血管阻力。

肺组织活检取材: 原则上取右肺中叶组织, 取材时避开肺纤维化和肺不张的区域, 肺舌叶不取。取材大小约 2.5 cm \times 1.5 cm \times 1.5 cm, 深入肺内 1 cm 以上。取下的肺组织分为两份: 一份保存于液氮中: 立即置入 2 ml 冻存管, 做好标记, 存放于液氮罐内。另一份 4% 中性甲醛固定, 石蜡包埋。

肺组织 AHR 免疫荧光检查: 蜡切片厚度 4 μ m, 用防脱片剂处理过的载玻片捞片, 置烤箱 58~60 $^{\circ}$ C, 2~3 h; 将吹烤充分的切片迅速置入二甲苯中, 浸泡 15 min; 取出, 置入第二缸二甲苯中, 浸泡 15 min。从二甲苯中取出切片置入无水乙醇中, 浸泡 15 min; 取出, 置入第二缸无水乙醇中, 浸泡 15 min; 再依次置入 90%、80%、70% 酒精中梯度水化, 各浸泡 10~15 min; 用蒸馏水润洗切片表面的酒精 2~3 次, 尽量不残留酒精; 将切片置入柠檬酸盐缓冲液 (北京中衫金桥生物技术有限公司) 中进行抗原修复, 于沸水中温浴 10 min, 停火 5 min 后取出自然冷却; 用磷酸盐缓冲液 (北京中衫金桥生物技术有限公司) 浸泡组织 3 次, 每次 5 min; 将切片从玻片架

上取出,用手甩去玻片上的磷酸盐缓冲液,并用吸水纸吸取组织外围的缓冲液,将切片置于湿盒上,滴加封闭用正常山羊血清工作液(中衫金桥,北京),室温孵育 20 min;用手甩去玻片上的磷酸盐缓冲液,并用吸水纸吸取组织外围的缓冲液;每组织滴加兔抗人 AHR 多克隆抗体(博奥森,北京。稀释比例为 1:50) 50~60 μ l, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育 18 h;从冰箱中取出湿盒复温 30 min;用磷酸盐缓冲液浸泡组织 3 次,每次 5 min;将切片置于湿盒上,每组织滴加异硫氰酸荧光素(FITC)偶联的猴抗兔 IgG 抗体(武汉三鹰公司,武汉) 50~60 μ l, 避光室温孵育 20 min。将切片从玻片架上取出,用手甩去玻片上的 PBS 缓冲液,并用吸水纸吸取组织外围的缓冲液,将切片置于湿盒上,滴加 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)溶液(浓度为 10 μ g/ml)染细胞核(Sigma 公司,美国),避光室温孵育 10 min;将切片置于玻片架上,用磷酸盐缓冲液浸泡组织 3 次,每次 5 min;抗荧光淬灭封片液(上海碧云天生物技术有限公司)进行封片,封片后避光保存^[10];荧光共聚焦显微镜(莱卡,德国)下观察并拍照,其中 FITC 最大激发光波长为 490 nm,最大发射光波长为 525 nm,荧光激发下呈现黄绿色荧光。DAPI 的激发光波长为 358 nm,发射光波长为 461 nm,荧光激发下呈现蓝色荧光。

肺小血管管壁厚度及面积的测量:每例患者的肺组织切片随机选直径为 50~100 μ m,断面较圆整的肺小动脉 3 个,并拍照,采用 Image J 图像分析系统计算管壁面积/管总面积(WA/TA)及管壁厚/管外径(WD/TD)的相对比值。每位患者 3 个肺小血管 WA/TA、WD/TD 的平均值为该患者 WA/TA、WD/TD 值。其中 $WD/TD = (\text{管外径} - \text{管内径}) / \text{管外径}$ 。

实时荧光定量多聚酶链反应(Real-Time PCR)检查:引物系列均由 Invitrogen 公司合成,引物系列见表 1。使用 trizol(Invitrogen,美国)提取肺组织 RNA, takara 逆转录酶(Takara,大连)进行 RNA 逆转录, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂盒(Takara,大连)进行逆转录多聚酶链反应(RT-PCR), RT-PCR 仪为 LightCycler[®] 480 System Real Time PCR 仪。实验结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量方法进行数据分析: $\Delta Ct(\text{对照组}) = Ct(\text{对照组目标基因}) - Ct(\text{对照组内参})$; $\Delta Ct(\text{实验组}) = Ct(\text{实验组目标基因}) - Ct(\text{实验组内参基因})$; $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ 。以 $Folds = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示实验组与对照组目的基因表达的倍比关系^[11]。重复 3 次实验,计算平均值。

表 1 引物系列

基因	引物
AHR	Forward 5' -ATTGTGCCGAGTCCCATATC-3'
	Reverse 5' -AAGCAGGCGTGCATTAGACT-3'
ARNT	Forward 5' -TGTGGACCCAGTTTCTGTGA-3'
	Reverse 5' -GACCACCACGAAGTGAGGTT-3'
HIF-1 α	Forward 5' -GCAAGACTTTCCTCAGTCGACACA-3'
	Reverse 5' -GCATCCTGTACTGTCTGTGGTGA-3'
VEGF	Forward 5' -AGAAACCCAAATGAAGTGGTG-3'
	Reverse 5' -ACTCCAGGGCTTCATCATTG-3'
β -actin	Forward 5' -GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'
	Reverse 5' -ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

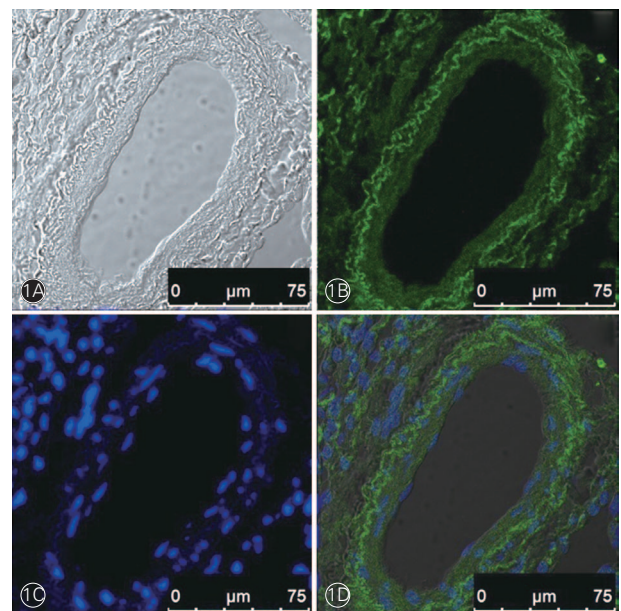
注:AHR:芳香烃受体;ARNT:芳香烃受体核转位蛋白;HIF-1 α :缺氧诱导因子-1 α ;VEGF:血管内皮生长因子; β -actin: β -肌动蛋白

血清 AHR ELISA 检测:采集患者静脉血进行 ELISA 检测。室温血液自然凝固 10~20 min,离心 20 min 左右(相对离心力为 1000 \times g)。仔细收集上清^[12]。其余标准曲线绘制、加样、加酶、显色等步骤详见 AHR 酶联免疫分析试剂盒(R&D 公司,美国)操作说明书。

统计学方法:使用 GraphPad Prism 5 软件包完成数据处理。计量资料以均值 \pm 标准差表示。多组样本均数的比较用单因素方差分析,样本之间的两两比较用 LSD 法。相关分析用 Pearson 直线相关,相关系数的假设检验采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

32 例患者肺小血管壁中均有 AHR 表达(图 1)。



注:1A:普通光下肺小血管形态;1B:绿色荧光标记的芳香烃受体;1C:蓝色荧光标记的细胞核。1D:为 1A、1B、1C 的融合图。

图 1 肺小血管壁芳香烃受体免疫荧光检查结果

32 例患者的平均肺动脉压 (mPAP) 为 (36.5 ± 10.13) mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 血氧饱和度 (SaO_2) 为 (97.28 ± 1.20) %, 血清 AHR 浓度为 (100.31 ± 13.03) ng/ml, 肺组织 AHR mRNA 表达量为 (1.40 ± 0.31)、HIF-1 α mRNA 表达量为 (1.21 ± 0.30)、ARNT mRNA 表达量为 (1.20 ± 0.19)、VEGF mRNA 表达量为 (1.25 ± 0.12)、肺小血管 WD/TD 为 (0.3159 ± 0.1387) 和 WA/TA 为 (0.5412 ± 0.1310)。

Pearson 相关分析显示: 肺组织 AHR mRNA 表达量与 mPAP ($r=0.809$, $P<0.001$)、肺小血管 WD/TD ($r=0.746$, $P<0.001$) 和 WA/TA ($r=0.723$, $P<0.001$)、肺组织 HIF-1 α mRNA 表达量 ($r=0.889$, $P<0.001$)、ARNT mRNA 表达量 ($r=0.738$, $P<0.001$)、VEGF mRNA 表达量 ($r=0.822$, $P<0.001$) 呈正相关。肺组织 VEGF mRNA 表达量与 mPAP ($r=0.739$, $P<0.001$)、肺小血管 WD/TD ($r=0.702$, $P<0.001$) 和 WA/TA ($r=0.657$, $P<0.001$) 呈正相关。血清 AHR 浓度与 mPAP ($r=0.754$, $P<0.001$)、肺小血管 WD/TD ($r=0.754$, $P<0.001$) 和 WA/TA ($r=0.739$, $P<0.001$) 呈正相关。

3 讨论

先天性心脏病相关性肺动脉高压分 4 类:(1) 艾森曼格综合征;(2) 体肺分流相关性肺动脉高压;(3) 小缺损合并肺动脉高压;(4) 心脏修补术后肺动脉高压^[13]。第一类患者已经发展为右向左分流的患者不能进行手术, 而第二类患者能否进行手术的判断标准仍然没有定论, 第三、四类患者的治疗类似于特发性肺动脉高压。在本研究中, 我们根据静息 mPAP ≥ 25 mmHg 及 Lopes 和 O' Leary 提出的手术标准^[14], 从 50 例先天性体肺分流心脏病患者中挑选出 32 例肺动脉平均压升高, 可行心脏修补术且同意行手术治疗的患者 (即可行手术治疗的第二类患者) 入选本研究。

先天性心脏病发展到最后都出现肺血管重构。在我们的研究中, 32 例患者肺组织中肺动脉内皮层、中膜层均可见 AHR 阳性表达, 且 AHR mRNA 的表达与肺动脉平均压力及肺血管重构参数 (肺小血管管壁厚度百分比和面积百分比) 显著正相关, 所以我们认为 AHR 可能参与先天性心脏病相关性肺动脉高压患者的肺血管重构。另外 VEGF 在先天性心脏

病肺动脉高压发生发展中起重要的作用, 是导致先天性心脏病肺动脉重构的主要细胞因子之一^[15], 本研究也证实先天性分流性心脏病患者 VEGF mRNA 表达与 mPAP 和肺血管重构参数之间显著正相关。

AHR 是一种配体激活转录因子, AHR 与配体结合后进入细胞核内, 与核内的 ARNT 结合, 进而发生构象改变, 暴露出与下游基因启动子区域的外源性化合物反应元件相结合的部位, 从而诱导许多 I 相和 II 相外源性化合物代谢酶基因的表达, 但这些基因表达产物中并不包括 VEGF。HIF-1 α 也属于碱性螺旋-环-螺旋 PAS 家族成员, 也能与 ARNT 相结合。在氧浓度正常的条件下 (氧浓度为 21%), 脯氨酰羟化酶 (PHDs) 使 HIF-1 α 的脯氨酸羟基化, 接着被 VHL 泛素化, 最终在蛋白酶体里降解。低氧 (氧浓度 $<6\%$), 能减弱 PHDs 功能, 使 HIF-1 α 保持稳定。未羟基化的 HIF-1 α 转位到细胞核, 与 ARNT 形成二聚体, HIF-1 α ·ARNT 复合物与缺氧反应元件结合, 诱导一系列基因表达^[16], 包括 VEGF、促红细胞生成素、蛋白激酶 G, 对缺氧起到调节作用^[17]。ARNT 是 HIF-1 α 信号通路和 AHR 信号通路的结点, 所以很多学者认为 HIF-1 α 和 AHR 与 ARNT 结合存在竞争, 一种信号通路激活势必抑制另外一条信号通路^[16, 18-20]。但近年来, 有实验表明, TCDD 可以诱导 VEGF 产生。Takeuchi 等^[21]的研究显示腹腔注射 TCDD 的小鼠视网膜以及 TCDD 培养的人视网膜色素上皮细胞 VEGF 表达增加。Wu 等^[7]的研究显示口服 TCDD 的妊娠 SD 大鼠胎盘中 HIF-1 α mRNA 表达增加, 同时 VEGF mRNA 表达也增加; 口服大剂量 ITE (一种内源性 AHR 配体) 也发现上述现象。但 AHR 配体如何引起 HIF-1 α 表达增加, 及接下来的 VEGF 表达增加的机制还不清楚。最近 Liao 等^[22]研究显示 TCDD 与 AHR 结合通过 PI3K/Akt 途径增加 HIF-1 α 稳定性, 防止被 PHDs 降解。我们研究也发现无缺氧症状的肺组织 (每位患者的血氧饱和度正常) AHR mRNA 与 HIF-1 α mRNA、ARNT mRNA 及 VEGF mRNA 显著正相关, 因此我们推测先心病患者某种内源性配体与 AHR 结合, 使 HIF-1 α 稳定性增加, 从而激活 HIF-1 α 信号通路使 VEGF 表达增加, 启动先天性分流性心脏病患者肺血管重构。

另外在临床实际工作中, 对第二类 CHD-PAH 患者需常规术前肺组织活检或右心导管检查来判断患者是否能行心脏修补术。找到一种既方便又能较准确地反映肺动脉高压程度的无创伤或微创损伤检

查指标,一直是广大临床医生所关注的一个热点问题。在本研究中,患者血清 AHR 浓度与 mPAP、肺小血管 WD/TD 和 WA/TA 呈正相关。使得血清 AHR 浓度有可能成为一种评判能否手术治疗的指标。

参考文献

- [1] 陈果,何建国,柳志红,等.不同类型肺动脉高压患者临床特征和血流动力学的比较分析.中国循环杂志,2013,28:300-303.
- [2] Durmowicz AG, Stenmark KR. Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatr Res*, 1999, 20: e91-e102.
- [3] Zhang N. The role of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling in cardiovascular physiology. *J Cardiovasc Dis Res*, 2011, 2: 91-95.
- [4] Lund AK, Agbor LN, Zhang N, et al. Loss of the aryl hydrocarbon receptor induces hypoxemia, endothelin-1, and systemic hypertension at modest altitude. *Hypertension*, 2008, 51: 803-809.
- [5] Lund AK, Goens MB, Kanagy NL, et al. Cardiac hypertrophy in aryl hydrocarbon receptor null mice is correlated with elevated angiotensin II, endothelin-1, and mean arterial blood pressure. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003, 193: 177-187.
- [6] Thackaberry EA, Gabaldon DM, Walker MK, et al. Aryl hydrocarbon receptor null mice develop cardiac hypertrophy and increased hypoxia-inducible factor-1alpha in the absence of cardiac hypoxia. *Cardiovasc Toxicol*, 2002, 2: 263-274.
- [7] Wu Y, Chen X, Zhou Q, et al. ITE and TCDD differentially regulate the vascular remodeling of rat placenta via the activation of AhR. *PLoS One*, 2014, 9: e86549.
- [8] Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, et al. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77: 660-669.
- [9] Huang S, Shui X, He Y, et al. AhR expression and polymorphisms are associated with risk of coronary arterial disease in Chinese population. *Sci Rep*, 2015, 5: 8022.
- [10] Wang H, Matise MP. Immunofluorescence staining with frozen mouse or chick embryonic tissue sections. *Methods Mol Biol*, 2013, 1018: 175-188.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [12] Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971, 8: 871-874.
- [13] 杨涛,何建国.对肺动脉高压患者的管理应有一套完整的策略——2009年欧洲肺动脉高压诊断和治疗指南解读.中国循环杂志,2012,27:81-86.
- [14] Lopes AA, O'Leary PW. Measurement, interpretation and use of haemodynamic parameters in pulmonary hypertension associated with congenital cardiac disease. *Cardiol Young*, 2009, 19: 431-435.
- [15] Geiger R, Berger RM, Hess J, et al. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *J Pathol*, 2000, 191: 202-207.
- [16] Vorrink SU, Domann FE. Regulatory crosstalk and interference between the xenobiotic and hypoxia sensing pathways at the AhR-ARNT-HIF1alpha signaling node. *Chem Biol Interact*, 2014, 218: 82-88.
- [17] Chan WK, Yao G, Gu YZ, et al. Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem*, 1999, 274: 12115-12123.
- [18] Jacob A, Potin S, Saubamea B, et al. Hypoxia interferes with aryl hydrocarbon receptor pathway in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells. *J Neurochem*, 2015, 132: 373-383.
- [19] Wolff M, Jelkmann W, Dunst J, et al. The Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT/HIF-1beta) is influenced by hypoxia and hypoxia-mimetics. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32: 849-858.
- [20] Michaud SE, Menard C, Guy LG, et al. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *FASEB J*, 2003, 17: 1150-1152.
- [21] Takeuchi A, Takeuchi M, Oikawa K, et al. Effects of dioxin on vascular endothelial growth factor (VEGF) production in the retina associated with choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 3410-3416.
- [22] Liao TL, Chen SC, Tzeng CR, et al. TCDD induces the hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha regulatory pathway in human trophoblastic JAR cells. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 17733-17750.

(收稿日期:2015-03-09)

(编辑:王宝茹)