

低温诱发肉鸡腹水综合征过程中肺动脉平滑肌细胞增殖的变化

王建琳, 乔健*, 赵立红, 王慧煜, 利凯, 徐彤, 田勇

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: 本试验旨在研究低温诱发肉鸡腹水综合征(AS)过程中平滑肌细胞增殖在肺血管重塑过程中的动态变化, 初步探讨肺血管重塑的机制。160只15日龄雄性AA商品代肉鸡随机分为对照组(22 \pm 1.5)和低温组(11 \pm 2)。试验持续至50日龄, 期间每周每组随机取6只, 取肺组织做石蜡切片, Weigert-间苯二酚复红染色, 观察并测定血管重塑情况; 采用免疫组织化学方法检测肺动脉增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达, 并对其半定量, 分析平滑肌细胞增殖情况。50日龄时统计整个饲养过程中AS发生率。结果显示: (1) 低温组肉鸡AS发生率(18.75%)极显著高于对照组(1.25%) ($P<0.01$); (2) 低温组肉鸡直径20~50 μ m和50~150 μ m肺动脉结构从36日龄开始较对照组发生了明显的重塑 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); (3) 低温组肉鸡直径20~50 μ m和50~150 μ m的肺动脉平滑肌细胞增殖指数分别从22日龄和36日龄开始极显著高于对照组 ($P<0.01$)。结果表明: 低温诱发肉鸡AS过程中肺动脉结构发生了明显的重塑, 肺动脉平滑肌细胞发生了明显的增殖, 并且平滑肌细胞增殖促进了肺血管重塑, 在肉鸡AS发生发展过程中起着重要的作用。

关键词: 腹水综合征; 肉鸡; 增殖细胞核抗原; 肺血管重塑; 平滑肌细胞

中图分类号: S858.316.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)03-0276-06

Proliferation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells in the Development of Ascites Syndrome Induced by Low Ambient Temperature in Broilers

WANG Jian-lin, QIAO Jian*, ZHAO Li-hong, WANG Hui-yu, LI Kai,

XU Tong, TIAN Yong

(Department of Pathophysiology, College of Veterinary Medicine, China

Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Pulmonary vascular remodeling and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) of pulmonary arteries of broilers in the development of ascites syndrome (AS) induced by low ambient temperature were dynamically analyzed to study the mechanism of pulmonary vascular remodeling. Broilers in control group (22 \pm 1.5) and low temperature group (11 \pm 2) were sampled every week from 15 to 50 days of age. Mean medial thickness (mMTPA) and the ration of vessel wall area to vessel total area (WA/TA), the indexes of pulmonary vascular remodeling, were examined by computer-image analyzing system. Proliferative indexes (PI) of VSMCs in pulmonary arteries were assessed with proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The higher incidence (18.75%) of AS was induced, and pulmonary vascular remodeling were significantly elevated in low temperature group from 36 days of age ($P<0.05$). PI in pulmonary arteries with 20-50 μ m and 50-150 μ m diameter in low temperature group were significantly higher than those in the control group from 22 and 36 days of age separately ($P<0.05$). Our study dem-

收稿日期: 2006-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(30070567; 30571398)

作者简介: 王建琳(1976-), 女, 山西人, 博士, 从事畜禽病理生理研究, 现在莱阳农学院工作

* 通讯作者: 乔健(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 从事禽类心血管系统病理生理研究

onstrated that VSMCs proliferated and pulmonary artery remodeled progressively in the development of AS, which suggest that proliferation of VSMCs facilitate pulmonary vascular remodeling and have a pivotal role in the development of AS in broilers.

Key words: ascites syndrome; broiler; proliferating cell nuclear antigen; pulmonary vascular remodeling; smooth muscle cell

肉鸡腹水综合征(Ascites Syndrome, AS)又称为肉鸡肺动脉高压综合征(Pulmonary Hypertension Syndrome, PHS),主要发生于快速生长的肉鸡,以腹腔聚集大量液体为主要特征。Julian^[1]总结前人的大量研究,认为肉鸡腹水是由于右心肥大引起的右心衰竭造成了静脉回流受阻和肝脏淤血性营养不良而形成的,在此过程中右心肥大是对肺动脉高压(Pulmonary Hypertension, PH)的反应,故认为 PH 是 AS 发生发展的中心环节。

在哺乳动物的研究表明肺血管重塑以肺动脉中膜增厚为主要特征,是促进肺动脉压升高的主要病理学特征^[2]。Aureliano 等^[3]报道高海拔 AS 肉鸡肺动脉中间肌层占直径百分比明显高于健康鸡,Peacock 等^[4]观察发现快速生长的肉鸡其肺动脉中膜层较生长缓慢的肉鸡增厚,Enkvechakul 等^[5]应用显微图像分析系统对肉鸡肺组织形态分析表明,通风不良诱发的 AS 患鸡肺小动脉中膜层比健康鸡显著增厚,说明了以中膜层增厚为主要特征的肺血管重塑也存在于 AS 肉鸡中。Tan 等^[6,7]报道低温诱发肉鸡 AS 过程中,直径达到 60 μ m 的肺动脉结构发生了明显的重塑,证明了低温诱发肉鸡 AS 发生发展过程中存在着肺血管重塑。但关于低温诱发肉鸡 AS 过程中不同段肺血管重塑的不同特征,还未见报道。

在正常情况下,肺动脉中膜的厚度由平滑肌细胞增殖和凋亡保持平衡来维持,一旦这一平衡遭到破坏,倾向平滑肌细胞增殖,肺动脉中膜将增厚,从而增加肺血管阻力,明显促进 PH 升高^[8]。已有研究表明缺氧促进了人和哺乳动物肺动脉平滑肌细胞的增殖^[9,10]。但在肉鸡 AS 发生发展过程中,是否平滑肌细胞的增殖也促进了血管重塑,还未见报道。本研究动态测定了低温诱发肉鸡 AS 过程中肺血管重塑和平滑肌细胞增殖情况,并分析了二者的关系,为肉鸡 AS 发生机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

160 只 1 日龄 AA 商品代肉仔鸡(购于北京华

都肉鸡场)常规育雏和免疫,15 日龄时随机分为 2 组,常温对照组 80 只,(22 \pm 1.5) 环境饲养;低温试验组 80 只,(11 \pm 2) 环境饲养,自由采食和饮水。每天观察并记录 AS 发生情况,最后统计 AS 发生率。其中以肉鸡腹腔积液大于 20 mL 为腹水发生的判定标准之一;肉鸡处死后按 Julian^[11]的方法,计算右心室占全心室的质量比(RV TV),RV TV > 0.250 作为腹水发生的判定的另一标准。二者同时具备作为肉鸡 AS 最后判定标准。

1.2 肺血管重塑的测定

从 15 到 50 日龄,每周从各组随机选取 6 只,翅静脉注射过量的戊巴比妥钠处死,打开胸腔,取右侧肺叶下 1/3 以 4%多聚甲醛缓冲液固定,酒精脱水,二甲苯透明后石蜡包埋,切片。采用 Weigert + VG 染色法进行弹力纤维染色。在光学显微镜(日本 BX51, Olympus)下观察并选取与呼吸性细支气管伴行的肺动脉,应用 Image-Pro Discovery 4.5 图像处理与分析系统计算肺动脉(直径 20~50 μ m 和 50~150 μ m)的中膜厚度占外径百分比 mMTPA(%) 和管壁面积占管总面积百分比 WA/TA(%)作为肺血管重塑指标。

1.3 肺动脉血管壁平滑肌细胞增殖的检测

采用 SP 试剂盒进行免疫组织化学常规操作,用于所有脊椎动物的小鼠抗大鼠增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体(Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA)稀释度为 1:200,应用 DAB 显色。肺动脉平滑肌细胞中 PCNA 蛋白表达的阳性产物定位于细胞核内,胞核出现明显的棕褐色颗粒为蛋白表达阳性,核浅黄色的忽略不计,核蓝色为蛋白表达阴性,光学显微镜观察,半定量分析肺动脉中 PCNA 蛋白表达,以增殖指数(Proliferative index, PI)表示,PI=肺动脉平滑肌细胞增殖阳性数与平滑肌细胞总数比值的百分数^[12],计算不同段肺动脉平滑肌细胞 PI。

1.4 数据的统计分析

试验结果以平均数 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,应用 SPSS11.5 软件(SPSS Inc, Chicago,

USA)进行数据分析。用 ONE WAY-ANVONA 方法分析组间差异显著性。

2 结 果

2.1 各组肉鸡 AS 发生率

整个试验饲养阶段,对照组 AS 发生率为 1.25%,低温组 AS 发生率为 18.75%,差异极显著($P<0.01$),见表 1。低温处理后,肉鸡 AS 主要发生于 30~50 日龄,其中 37~43 日龄为高峰期,占整个饲养过程中 AS 发生率的 66.7%。

表 1 各组肉鸡 AS 发生率(n = 80)
Table 1 The incidence of AS in different groups (n = 80)

组别 Groups	日龄/d Age						总数 Total	发病率/ % Incidence
	15	22	29	36	43	50		
对照组 C	0	0	0	0	0	1	1	1.25
低温组 L	0	0	0	4	10	1	15	18.75 **

*低温组与对照组相比差异显著 ($P<0.05$), * *差异极显著 ($P<0.01$),下表同
* $P<0.05$; * * $P<0.01$ vs control group, the same as below

2.2 各组肉鸡 RV TV的变化

低温组肉鸡 RV TV 从 22 日龄开始升高,29

~50 日龄较对照组显著升高 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),见表 2。

表 2 各组肉鸡 RV TV的动态变化(n = 6)
Table 2 RV TV of broilers in different groups(n = 6)

组别 Groups	日龄/d Age					
	15	22	29	36	43	50
对照组 C	0.200 ±0.020	0.214 ±0.031	0.208 ±0.013	0.198 ±0.013	0.208 ±0.019	0.216 ±0.018
低温组 L	0.200 ±0.010	0.257 ±0.016	0.270 ±0.036 **	0.289 ±0.055 **	0.289 ±0.040 **	0.275 ±0.046 *

2.3 各组肉鸡肺动脉 mMTPA(%)、WA/ TA(%)的动态变化

低温处理后,可明显观察到肉鸡肺动脉中膜增厚(见图 1, 2)。各组肉鸡不同时期 mMTPA(%)和 WA/ TA(%)变化见表 3 和表 4。正常组肉鸡 20~50 μm 肺动脉 mMTPA(%)和 WA/ TA(%)都较

50~150 μm 肺动脉 mMTPA(%)和 WA/ TA(%)明显升高;低温组肉鸡 20~50 μm 和 50~150 μm 肺动脉 mMTPA(%)和 WA/ TA(%)从 22 日龄开始逐渐升高,36~50 日龄明显高于对照组 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$),尽管 43~50 日龄没有明显增加,但也明显高于对照组。

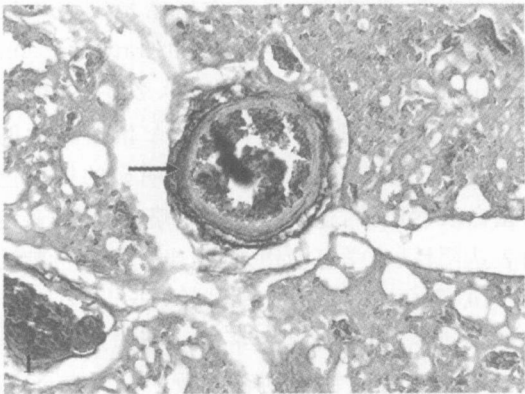


图 1 对照组肉鸡肺动脉中膜层较薄(箭头),管腔较大
Weight & Van Gieson, ×200
Fig.1 Pulmonary artery of broiler in the control group with thin media (arrow) Weight & Van Gieson, ×200

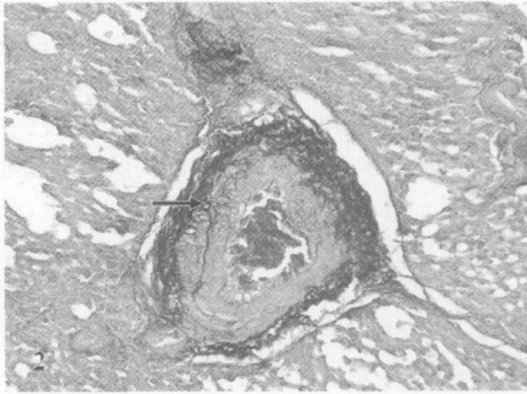


图 2 低温组肉鸡肺动脉中膜层明显增厚(箭头),管腔缩小
Weight & Van Gieson, ×200
Fig.2 Pulmonary artery of broiler in low temperature group with thick media (arrow) Weight & Van Gieson, ×200

表 3 各组肉鸡肺小动脉相对中膜厚度 mMTPA 的变化 (n = 6)

Table 3 mMTPA of pulmonary arteries with different diameters of broilers in different groups (n = 6)

%

日龄/ d	20 ~ 50 μm		50 ~ 150 μm	
Age	对照组 C	低温组 L	对照组 C	低温组 L
15	38.26 ±2.91	37.49 ±2.76	28.81 ±1.37	28.76 ±1.52
22	36.07 ±3.02	36.67 ±2.41	27.24 ±2.22	27.61 ±3.14
29	32.07 ±2.46	37.93 ±1.99	29.46 ±3.35	30.68 ±3.16
36	30.86 ±2.45	43.23 ±0.75 **	29.02 ±3.64	35.73 ±2.97 *
43	30.57 ±1.53	43.37 ±1.93 **	29.69 ±2.44	36.05 ±3.52 **
50	32.74 ±1.69	42.28 ±1.40 *	29.42 ±2.63	36.76 ±2.50 **

表 4 各组肉鸡肺小动脉管壁面积占管总面积百分比(WA/ TA)的变化 (n = 6)

Table 4 WA/ TA of pulmonary arteries with different diameters of broilers in different groups (n = 6)

%

日龄/ d	20 ~ 50 μm		50 ~ 150 μm	
Age	对照组 C	低温组 L	对照组 C	低温组 L
15	63.47 ±1.74	63.99 ±1.08	51.25 ±3.45	46.69 ±5.26
22	51.45 ±4.58	56.75 ±5.56	44.98 ±4.35	48.62 ±3.42
29	54.44 ±3.06	61.77 ±2.43	47.00 ±3.88	52.71 ±1.51
36	54.99 ±1.78	69.23 ±2.32 **	53.78 ±3.92	59.80 ±3.11 *
43	51.12 ±2.24	65.42 ±1.00 **	50.90 ±3.99	62.94 ±4.16 **
50	52.56 ±1.44	66.37 ±2.25 **	50.38 ±2.33	60.11 ±3.15 **

2.4 各组肉鸡肺动脉平滑肌细胞 PI 的动态变化

观察发现低温组肉鸡肺动脉有大量的 PCNA 阳性平滑肌细胞,而对照组只有少量(见图 3、4)。各组肉鸡不同时间点血管平滑肌细胞 PI 见表 5。对照组肉鸡肺动脉平滑肌细胞 PI 保持相对平稳,在后期稍显下降。低温组肉鸡 20 ~ 50μm 肺动脉平滑肌细胞 PI 从低温处理开始到 43 日龄不断升高,然

后下降,但在 50 日龄时仍极显著高于对照组 ($P < 0.01$);低温组 50 ~ 150 μm 肺动脉平滑肌细胞 PI 22 ~ 50 日龄不断升高,并在 36 ~ 50 日龄极显著高于对照组 ($P < 0.01$);20 ~ 50 μm 肺动脉平滑肌细胞 PI 增殖幅度远高于 50 ~ 150 μm 肺动脉平滑肌细胞。

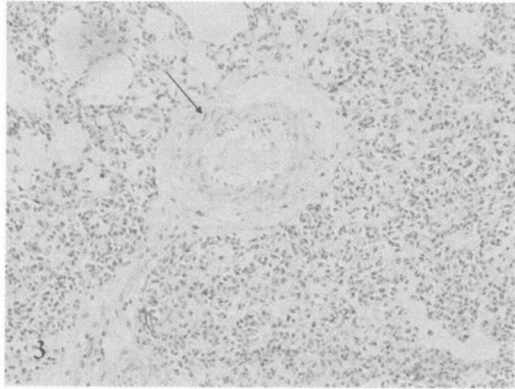


图 3 对照组肉鸡肺动脉平滑肌细胞 PCNA 免疫组织化学染色,其阳性细胞(箭头)较少 ×200
Fig.3 Pulmonary artery of broiler in the control group with a little of PCNA-positive VSMCs (arrow) and lots of PCNA-negative VSMCs in the media of artery ×200

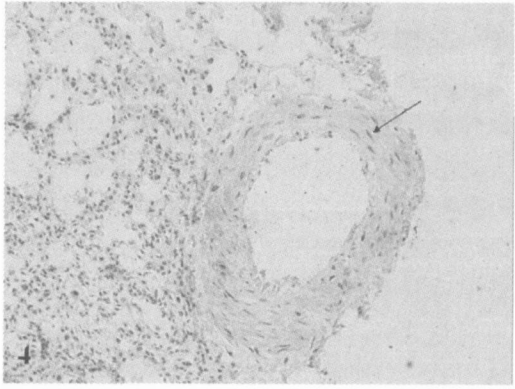


图 4 低温组肉鸡肺动脉平滑肌细胞 PCNA 免疫组织化学染色,其阳性细胞(箭头)较多 ×200
Fig 4 Pulmonary artery of broiler in low temperature group with a little of PCNA-negative VSMCs and lots of PCNA-positive VSMCs (arrow) in the media of artery ×200

表 5 各组肉鸡肺小动脉血管平滑肌细胞增殖指数(PI)变化 (n=6)
Table 5 PI of pulmonary arteries of broilers in different groups (n=6)

日龄/d	20~50 μm		50~150 μm	
Age	对照组 C	低温组 L	对照组 C	低温组 L
15	13.14 ±1.53	13.10 ±1.44	12.76 ±1.28	12.33 ±1.32
22	11.97 ±1.25	15.63 ±1.41 **	11.85 ±1.55	11.79 ±1.16
29	13.63 ±2.19	23.58 ±6.37 **	12.65 ±1.61	15.65 ±3.80
36	12.87 ±3.61	32.78 ±3.27 **	11.86 ±1.07	21.19 ±3.65 **
43	10.37 ±1.28	41.07 ±0.91 **	10.51 ±1.00	36.33 ±3.61 **
50	9.56 ±2.21	36.73 ±2.61 **	8.37 ±1.20	40.11 ±5.47 **

3 讨论

研究认为低温环境是诱发肉鸡 AS 的有效方法,本研究通过环境低温诱发肉鸡 AS,其发生率达 18.75%,远高于对照组 1.25%,表明低温成功诱发了 AS。RV TV 作为右心肥大指数,是 AS 发生过程中的一个病理参数,可用来测定肉鸡在损伤明显出现以前的腹水发生进程状态^[4, 13]。本研究中低温组肉鸡 RV TV 在低温处理后期(29~50 日龄)明显高于对照组,表明低温处理肉鸡处于 AS 发生过程中。

3.1 低温诱发的肺血管重塑是 AS 发生的主要病理学特征

在成功诱发肉鸡 AS 的基础上,本试验对肉鸡 AS 发生发展过程中肺血管重塑进行了研究。mMTPA(%)和 WA/TA(%)作为肺血管重塑的主要指标,分别反映肺动脉中膜的厚度和血管管腔大小。据报道如果中膜增厚,肺动脉管腔将缩小^[8, 14],根据 Poiseuille 定律,肺血管阻力与动脉管腔半径的 4 次方成反比,故肺动脉管腔微小的变化都会明显导致肺血管阻力增加,从而相应地促进肺动脉压升高^[2]。增加的肺动脉压将会导致右心肥大和衰竭,最终导致 AS 的发生^[1]。本试验中将肺动脉按直径分成两类,即 20~50 μm 和 50~150 μm,研究发现低温诱发肉鸡肺血管重塑存在以下特征:(1)对照组肉鸡直径 20~50 μm 肺动脉 mMTPA(%)和 WA/TA(%)明显高于直径 50~150 μm 肺动脉 mMTPA(%)和 WA/TA(%),此结果与健康鼠和仔猪的研究相一致,认为在一定肺动脉直径范围内随着肺动脉外径的增加,动脉中膜厚度降低^[14, 15]。(2)mMTPA(%)和 WA/TA(%)在低温组肉鸡肺动脉明显高于相应时间点的对照组,表明低温明显诱发了肉鸡肺血管重塑。(3)低温组肉鸡直径 20~

50 μm 肺动脉结构重塑幅度明显高于直径 50~150 μm 肺动脉,推测认为直径 20~50 μm 肺动脉对低温环境较直径 50~150 μm 肺动脉更敏感。

3.2 低温诱发的肉鸡肺动脉平滑肌细胞增殖是肺血管重塑的主要原因

肺动脉中膜的增厚直接反映了血管平滑肌细胞数量的增加,在哺乳动物已经证实平滑肌细胞增殖是肺血管重塑的主要原因^[8]。在肉鸡肺血管重塑过程中平滑肌细胞增殖是否起着重要的作用呢?本研究应用 PCNA 免疫组织化学技术动态测定了肺动脉平滑肌细胞的增殖情况。增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA),是真核生物 DNA 聚合酶 的补充蛋白,仅在增殖细胞中合成或表达,在细胞周期的 G₁ 晚期开始增加,S 期达到高峰,G₂/M 期降低,G₀ 期不能检测到,其含量变化与 DNA 合成相一致,静止细胞 PCNA 表达极低,增殖活跃细胞表达明显增加,是检测细胞增殖状态的有效标志^[16],本试验中应用的 PCNA 单克隆抗体购自 Zymed Laboratories,可标志所有脊椎动物细胞增殖状态。PCNA 免疫组织化学法已经在哺乳动物肺动脉平滑肌细胞增殖方面的研究中得到了广泛的应用^[10],而在禽类中只见于处于原肠胚阶段鸡胚的细胞增殖的免疫细胞化学研究报道^[17]和鸡胚脊索增殖能力的免疫组织化学研究报道^[18],对肺动脉结构重塑中细胞增殖方面的应用还未见报道。本试验中,应用 PCNA 免疫组织化学法结合半定量分析法测得低温组肉鸡肺动脉平滑肌细胞发生了进行性的增殖,且直径 20~50 μm 肺动脉平滑肌细胞增殖先于血管重塑,表明低温促进了平滑肌细胞进入细胞周期,在丝裂原的作用下发生增殖,从而导致肺动脉中膜增厚;与肺血管重塑相一致,直径 50~150 μm 肺动脉平滑肌细胞增殖迟于 20~50 μm 肺动脉,故推断认为平滑肌细胞增殖是肺血管重塑的

重要因素。抑制缺氧诱导的鼠肺动脉平滑肌细胞的增殖可以明显抑制血管重塑,从而也从反面证明了平滑肌细胞增殖是肺血管重塑的主要因素^[19],是否抑制肉鸡平滑肌细胞增殖从而可以抑制肺血管重塑,有待于进一步研究。

4 结 论

本试验中低温诱发肉鸡 AS 发生发展过程中肺动脉平滑肌细胞发生了明显的增殖,结构发生了明显的重塑,并且二者密切相关,表明了平滑肌细胞的增殖是肺血管重塑的主要原因之一,在肉鸡 AS 发生发展过程中起着重要的作用。

参考文献:

- [1] Julian R J. Ascites in poultry [J]. *Avian Pathology*, 1993, 23:419~454.
- [2] Jeffery T K, Wanstall J C. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension [J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 92:1~20.
- [3] Hernandez A. Hypoxic Ascites in Broilers: a review of several studies done in Colombia [J]. *Avian Disease*, 1987, 31:658~661.
- [4] Peacock A J, Pickett C, Morris K, *et al.* The relationship between rapid growth and pulmonary haemodynamics in the fast-growing broiler chicken [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1989, 139:15~24.
- [5] Enkvetchakul B, Beasley J, Bottje W, *et al.* Pulmonary arterial hypertrophy in broilers with pulmonary hypertension syndrome [J]. *Poultry Science*, 1995, 74:1 676~1 682.
- [6] Tan X, Pan J Q, Li J C, *et al.* L-Arginine inhibiting pulmonary vascular remodeling is associated with promotion of apoptosis in pulmonary arterioles smooth muscle cells in broilers [J]. *Research in Veterinary Science*, 2005a, 79(3):203~209.
- [7] Tan X, Liu Y J, Li J C, *et al.* Activation of PKCa and pulmonary vascular remodeling in broilers [J]. *Research in Veterinary Science*, 2005b, 79:131~137.
- [8] Mandegar M, Fung Y C, Huang W, *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension [J]. *Microvasc Res*, 2004, 68:75~103.
- [9] Cooper A L, Debbie B. Hypoxia stimulates proliferation and interleukin-1 production in human vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277: H1 326~H1 337.
- [10] Wohrley J D, Frid M G, Moiseeva E P, *et al.* Hypoxia selectively induces proliferation in a specific subpopulation of smooth muscle cells in the bovine neonatal pulmonary arterial media [J]. *J Clin Invest*, 1995, 1:273~281.
- [11] Julian R J. The effect of increased sodium in the drinking water on right ventricular hypertrophy, right ventricular failure and ascites in broiler chickens [J]. *Avian Pathology*, 1987, 16:61~71.
- [12] Marks D S, Vita J A, Folts J D, *et al.* Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide [J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(6):2 630~2 638.
- [13] Balog J M, Kidd B D, Huff W E, *et al.* Effect of cold stress on broilers selected for resistance or susceptibility to ascites syndrome [J]. *Poult Sci*, 2003, 82:1 383~1 387.
- [14] van Suylen R J, Smits J S, Daemen M J, *et al.* Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(5):1 423~1 428.
- [15] Hall S M, Hislop A A, Wu Z S, *et al.* Remodeling of the pulmonary arteries during recovery from pulmonary hypertension induced by neonatal hypoxia [J]. *J Paediatr*, 2004, 203:575~583.
- [16] Yamaguchi M, Hayashi Y, Hirose F, *et al.* Molecular cloning and structural analysis of mouse gene and pseudogenes for proliferating cell nuclear antigen [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19:2 403~2 410.
- [17] Sanders E J, Varedi M, French A S. Cell proliferation in the gastrulating chick embryo: a study using BrdU incorporation and PCNA localization [J]. *Development*, 1993, 118:389~399.
- [18] Chanem E, Cornelissen M, De Ridder L. Proliferative capacity of embryonic chick notochord: a comparison between PCNA positivity versus ³H-thymidine incorporation [J]. *Cell Biology International*, 1995, 19:777~783.
- [19] Nong Z, Stassen J M, Moons L, *et al.* Inhibition of tissue angiotensin-converting enzyme with quinapril reduces hypoxic pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling [J]. *Circulation*, 1996, 94: 1 941~1 947.