

Tbx18 对小鼠心脏冠状血管及室壁结构发育的影响*

汪浩^{1, 2)} 余强^{1)**} 高凌志¹⁾ 查承沁¹⁾ 杜建霖¹⁾ 景小东¹⁾

(¹⁾ 重庆医科大学附属第二医院心内科, 重庆 400010; ²⁾ 重庆市急救医疗中心, 重庆 400010)

摘要 利用 Tbx18 谱系示踪小鼠模型及 Tbx18 条件性基因敲除小鼠模型, 探讨转录因子 Tbx18 对小鼠心血管结构发育的影响. 实验建立 Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 和 Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ 两种基因敲入谱系示踪小鼠模型和 Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠模型; 通过免疫荧光及 X-gal 染色技术, 示踪 Tbx18 在心血管系统结构形成中的命运; 通过小鼠心脏整体血管免疫组化及切片 HE 染色、免疫组化、免疫荧光技术, 比较 Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠与野生型对照小鼠心脏室壁结构及冠状血管结构发育情况. 示踪结果提示, Tbx18 参与小鼠冠状血管及室间隔结构的形成, 并与冠脉平滑肌细胞共表达; 对 Tbx18 基因敲除小鼠及野生型小鼠的心脏结构比较提示, Tbx18 基因敲除后, 仍能形成形态正常的冠状血管系统, 小鼠心室肌及室间隔厚度较野生型无明显差异. 结果表明, Tbx18 参与小鼠心脏血管平滑肌及室间隔结构的形成, 但其在小鼠心脏腔室结构及冠状血管结构形成过程中不是必需的.

关键词 Tbx18, 小鼠, 心脏发育, 谱系示踪, 敲除模型

学科分类号 R543.3, R394.1

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0279

T-box 基因家族在脊椎动物胚胎发育过程中起重要作用, 尤其是对心脏发育至关重要. 人类 T-box 基因突变可以导致先天性心脏缺陷. 转录因子 Tbx18 作为 T-box 基因家族成员之一, 既往研究已证实其对窦房结形成及分化起重要作用^[1-2], 且既往研究认为 Tbx18⁺ 细胞参与心脏冠状血管平滑肌, 甚至心房肌、室间隔、心室肌等结构的形成^[3-4]. 现有研究提出 Tbx18 在心外膜向心脏血管及室壁结构分化形成过程中无决定性作用^[5], 而另外有研究则认为 Tbx18 参与调节小鼠冠状血管的形成^[6], 故 Tbx18 在心脏冠状血管及室壁结构形成中的作用尚颇具争议. 本实验采用 Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 和 Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ 两种示踪小鼠模型特异性标记 Tbx18⁺ 细胞及其衍生细胞, 明确其是否参与小鼠冠状血管及心肌结构的形成, 并从整体及切片层面观察 Tbx18 基因敲除后小鼠心脏血管结构及室壁厚度的形态学变化情况, 为进一步探讨 Tbx18 在心脏血管网络的结构形成及心肌结构形成方面的作用提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 材料

蛋白酶 K(V3021)购自 Promega 公司; 5-溴-4-氯-3-吡啶半乳糖苷(X-gal(B4252))、铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)、亚铁氰化钾(K₄Fe(CN)₆·3H₂O)、脱氧胆酸钠(D6750)、NP-40 等试剂购自 Sigma 公司; 兔 MYH11 抗体(SC-98705)购自 SantaCruz 公司; 大鼠 PECAM-1 抗体(553370)购自 BD 公司; 兔 α-SMA 抗体购自 Abcam 公司; TRITC 标记山羊抗兔 IgG(ZF-0316)、TRITC 标记山羊抗大鼠 IgG(ZF-0318)、生物素化兔抗大鼠 IgG(ZB-2040)、山羊抗兔免疫组化染色试剂盒(sp-9001)、Victor ABC

* 国家自然科学基金(81270211, 81100088), 高等学校博士学科点专项基金(20125503110009)和重庆教委科学技术研究(KJ130324)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 023-63693751, E-mail: qshe98@hotmail.com

收稿日期: 2014-12-24, 接受日期: 2015-03-04

kit 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物有限公司; 山羊血清、兔血清、OCT、TritonX-100 等购自北京鼎国生物技术公司; 多聚甲醛、蔗糖、 $MgCl_2$ 、NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 等试剂购自上海化学试剂公司。

1.2 小鼠谱系示踪模型和基因敲除模型的建立

实验用小鼠均饲养于重庆医科大学 SPF 级动物房。由美国加州大学 Evans 教授惠赠的 Tbx18-Cre 基因敲入雄性小鼠^[9]与同一品系的 C57BL/6 雌性成年小鼠进行交配, 可繁育出基因型为 Tbx18:Cre/+ 的雄性及雌性小鼠, 因纯合子 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠具有胚胎致死性, 故其繁育在杂合子状态下进行, 最终使基因型为 Tbx18:Cre/+ 的小鼠得到传代保存。条件性 Cre 报告系统 Rosa26R-EYFP 及 Rosa26R-LacZ 小鼠^[7-8]来自美国 Jackson 实验室。成年基因型为 Rosa26R-EYFP 和 Rosa26R-LacZ 的雄鼠分别与成年基因型为 Tbx18:Cre/+ 雌鼠交配 (1:2), 22:00 合笼, 次日 8:00 观察, 若见阴栓记胚龄 E0.5 天, 子代小鼠用半定量 PCR 方法筛选双杂合 Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP、双杂合 Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ 小鼠用于实验, 具体鉴定方法参考文献[7-8]。成年 Tbx18:Cre/+ 雄鼠和 Tbx18:Cre/+ 雌鼠交配, 可得到基因型为 Tbx18:Cre/Cre 的小鼠, 因其 Tbx18 基因失活, 故称为 Tbx18 基因敲除小鼠。用荧光定量 PCR 鉴定子代鼠中 Cre 基因拷贝数, 根据 Cre 基因的相对表达倍数筛选出同窝 Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠及野生型小鼠用于实验, 具体方法如文献[9]所述。

1.3 整体 X-gal 染色

取基因型为 Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ 的小鼠心脏组织, 4%多聚甲醛 4℃固定 90 min, 室温 β 半乳糖苷酶洗涤缓冲液中洗涤后, 进行 X-gal 染色, 具体方法参考文献[4]。染色后, 4%多聚甲醛 4℃固定过夜, 储存在 PBS 中用体视镜 (OLYMPUSSZX16) 观察、拍照。染色的组织, 常规石蜡包埋、切片、复染、封片处理, 显微镜拍照。

1.4 免疫荧光染色

E18.5 小鼠胚胎去掉头部及腹部以下部位, 4%多聚甲醛 4℃固定过夜, PBS 清洗后蔗糖脱水, OCT 包埋, 冰冻切片 (5~10 μm)。切片经 PBS 洗涤后, 按 1:100 比例孵育一抗 (含 10%二抗来源血清的 PBS 配制), 4℃过夜, PBS 洗 3×10 min,

TRITC 标记 IgG 二抗 37℃孵育 1 h, PBS 洗 3×5 min, DAPI 染核, PBS 洗后 50%甘油封片, 激光共聚焦显微镜采集图像。

1.5 HE 染色

E18.5 小鼠胚胎去掉头部及腹部以下部位, 4%多聚甲醛固定过夜, 梯度浓度乙醇脱水后行石蜡包埋, 组织切片 (4~5 μm)。按常规方法对切片行 HE 染色, 中性树脂封片后 Leica 正置荧光显微镜采集图像, Leica 系统配置软件对图像进行测量及分析。

1.6 切片免疫组化

按上述方法制作石蜡切片后, 二甲苯脱蜡, 逐级水化, 枸橼酸抗原修复后按常规步骤对切片进行免疫组化染色。封片后显微镜下观察并拍照。

1.7 整体心脏 PECAM-1 免疫组化

整体心脏 PECAM-1 免疫组化具体方法参考文献[10-11]。取小鼠整体心脏, 注意结构的完整性, 4%多聚甲醛固定过夜, 梯度浓度甲醇逐级脱水, 100%甲醇 -20℃保存。实验时取出心脏, 5% H_2O_2 /甲醇室温孵育 30 min, 梯度浓度甲醇逐级水化, PBSST (5% 兔血清 /PBS, 0.1% Triton X-100) 室温封闭 2 h, 在 4℃中分别孵育大鼠抗小鼠 PECAM-1 一抗 (1:200, BD 公司) 24 h, 生物素化兔抗大鼠 IgG (1:100, 中杉金桥) 及 Vectastain ABC- 过氧化物酶试剂 (ABC kit 试剂盒中 A 及 B 试剂按说明现配制) 过夜, 配制抗体均使用 PBSST, 每次孵育后需用 PBSST 清洗 5×1 h。经 DAB 显色, 10%甘油清洗过夜后用体视镜 (OLYMPUSSZX16) 观察、拍照。

1.8 统计学处理

所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析, 对室间隔、左室壁、右室壁心肌厚度数据的比较采用配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Tbx18 示踪模型及敲除模型的基因型鉴定结果

分别采用成年带有 Rosa26-EYFP 和 Rosa26-LacZ 转入基因的报告系统纯合子雄鼠与成年基因型为 Tbx18:Cre/+ 雌鼠交配, 得到的子代理论上有 50% 概率是实验所需基因型为 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP 及 Tbx18-Cre/Rosa26-LacZ 的示踪小鼠。Tbx18-Cre、Rosa26-EYFP、Rosa26-LacZ 阳性小鼠 PCR 分别扩增出约 400、320、340 bp 的目的条带。鉴定结果如图 1a, b 所示, 3、4、5、6 号小鼠

为 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP 双杂合基因敲入小鼠. 图 1c, d 中, 显示 1、2、5 号的小鼠为 Tbx18-Cre/Rosa26-LacZ 双杂合基因敲入小鼠. 用基因型为 Tbx18:Cre/+ 的成年雄鼠和雌鼠交配, 得到的子代理论上为 1/4 的概率为 Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠. 其子代鉴定结果如图 1e 所示: 1 号和 2 号标本的 cre 基因拷贝数约为 5、6、7、8 号标本的 2 倍, 为 Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠; 3 号和 4 号标本仅极少量 cre 基因表达, 考虑为外源性污染, 为野生型小鼠.

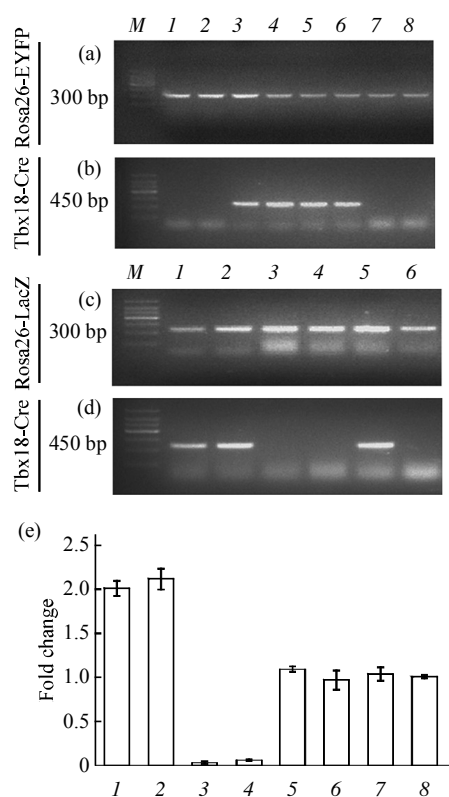


Fig. 1 Identification of Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP and Tbx18-Cre/Rosa26-LacZ double-heterozygous mice and Tbx18-deficient mice

(a) Rosa26-EYFP reporter strain mice. (b) Tbx18-Cre knock-in mice. (c) Rosa26-LacZ reporter strain mice. (d) Tbx18-Cre knock-in mice. (e) Linear representations of cre gene expression patterns in homozygous (1, 2) and heterozygous (5, 6, 7, 8) Tbx18 mutant mice and wild-type (3, 4).

2.2 示踪模型揭示 Tbx18 参与心脏血管及心脏室间隔结构的形成

为观察 Tbx18 在心血管结构形成中的命运,

我们对基因型为 Tbx18-Cre/Rosa26-LacZ 的小鼠心脏组织进行了整体及切片 X-gal 染色, 检测 LacZ 蛋白的表达. LacZ 蛋白能特异性示踪 cre 重组酶, 从而特异性地示踪 Tbx18⁺ 细胞及其衍生细胞. 新生小鼠心脏整体染色(图 2a, b)、成年小鼠心脏染色后切片室间隔部位(图 2c, d)及 E14.5 胚胎组织切片染色(图 2e)结果提示, LacZ 蛋白在冠状血管结构中及室间隔结构中有表达. 我们对基因型为 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP 的小鼠心脏组织切片进行免疫荧光染色, EYFP 细胞可特异性示踪 cre 重组酶, 从而特异性地使 Tbx18⁺ 细胞及其衍生细胞呈现绿色荧光. 新生小鼠心脏切片免疫荧光结果提示, 心室壁, 特别是室间隔有明显的 EYFP 阳性细胞表达(图 2f), 心脏血管管周有明显的 EYFP 阳性细胞表达, 且该阳性细胞能与血管平滑肌特异性标志物 α -SMA 共表达(图 2g~j), 不能与内皮细胞标志物 PECAM-1 共表达(图 2k~n). 以上结果提示 Tbx18 参与小鼠心脏血管平滑肌及室间隔的结构形成.

2.3 Tbx18 基因敲除后对心脏整体结构及心肌发育的影响

Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠会在临出生或出生后数小时内死亡, 故我们取 E18.5 Tbx18 基因敲除(KO)小鼠及同窝野生型(WT)小鼠心脏进行组织形态学分析比较. Tbx18 基因敲除小鼠心脏整体形态结构与野生型小鼠无明显差异(图 3a, b). 取 E18.5 小鼠胚胎, 去掉头部及腹部以下区域, 石蜡包埋后进行连续切片并 HE 染色, 挑选同窝 Tbx18 基因敲除小鼠及野生型小鼠的对应层面进行结构及形态比较, 发现基因敲除小鼠心脏的位置、腔室结构、瓣膜结构、血管数量及分布等较野生型小鼠无明显差别(图 3c, d). 取 5 窝 E18.5 小鼠胚胎进行石蜡包埋连续切片, 每窝小鼠中挑选出 1 只 Tbx18 基因敲除小鼠及 1 只野生型小鼠的 3 组对应层面的切片进行 HE 染色, 用 Leica 配套软件对室间隔、左室壁、右室壁厚度进行测量后取平均值, 得到 1 组数据, 共 5 组相匹配的数据. 对数据结果的比较采用配对样本 *t* 检验, 经统计分析, Tbx18 基因敲除小鼠与同窝野生型对照小鼠室间隔厚度[WT: (126.297 $\pm$ 13.844) μ m; KO: (124.495 $\pm$ 9.375) μ m]、左室壁厚度[WT: (79.775 $\pm$ 1.650) μ m; KO: (70.110 $\pm$ 13.189) μ m]、右室壁厚度[WT: (68.800 $\pm$ 6.603) μ m; KO: (62.084 $\pm$ 12.264) μ m]差异均无统计学意义(图 3c~e).

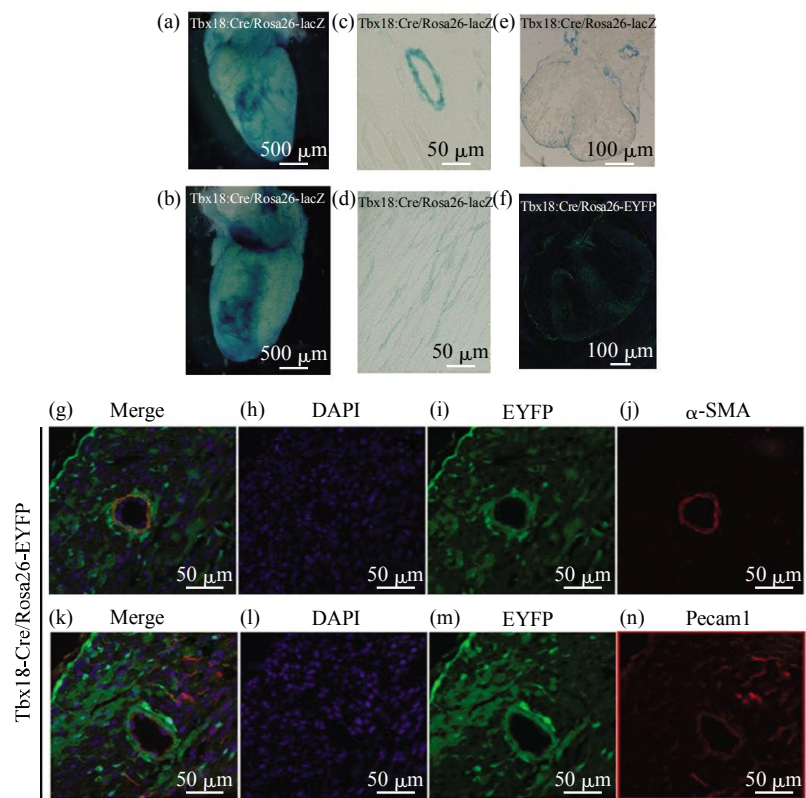


Fig. 2 **Tbx18** lineage tracing in the **Tbx18-Cre/Rosa26- LacZ** and **Tbx18-Cre/ Rosa26- EYFP** double-heterozygous mice
(a, b) Whole-mount X-gal staining of **Tbx18:Cre/Rosa26-lacZ** newborn mouse heart. (c, d) X-gal staining on cardiac sections from **Tbx18:Cre/ Rosa26-lacZ** adult mouse shows that **Tbx18** expression is maintained in some coronary vascular cells and the ventricular septum cells. (e) X-gal staining on cardiac sections from **Tbx18:Cre/ Rosa26-lacZ** embryo at E14.5. (f) **Tbx18** lineage-traced cardiac sections from **Tbx18:Cre/Rosa26-EYFP** newborn mouse heart. (g~j) **Tbx18** lineages give rise to coronary vascular smooth muscle cells (co-localized with alpha smooth muscle actin). (k~n) **Tbx18** lineages do not give rise to coronary vascular endothelial cells (not co-localized with **Pecam1**).

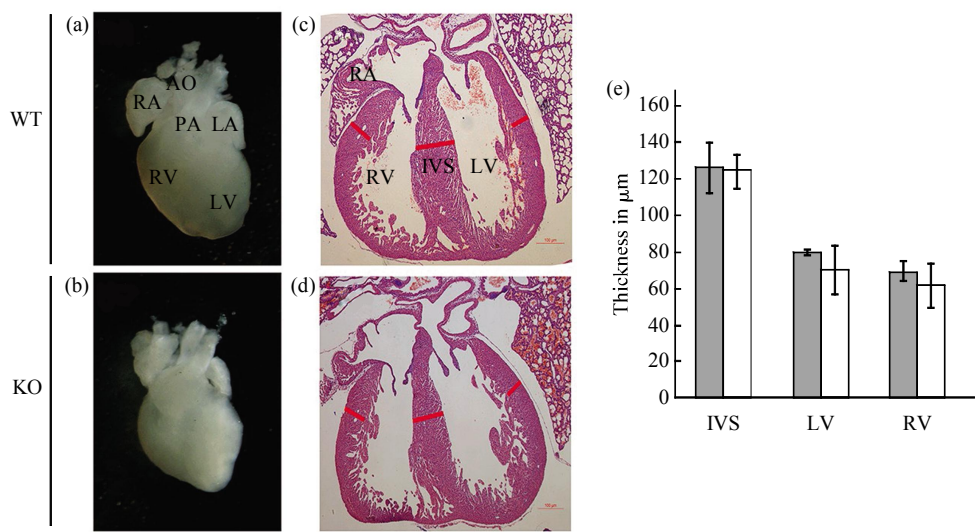


Fig. 3 **Comparative histological analysis of E18.5 heart structure in control and **Tbx18**- deficient embryos**
(a, b) Analysis of morphology of whole hearts does not reveal phenotypic changes between E18.5 WT and **Tbx18** KO embryos. (c, d) Analysis of morphology of transverse heart sections by haematoxylin and eosin (HE-) staining does not reveal phenotypic changes between E18.5 WT and **Tbx18**KO embryos. (e) Quantitative analysis of myocardial wall thickness in 5 specimens per genotype showed no difference between E18.5 WT and **Tbx18**KO embryos ($n=5$ in each group, paired samples t test; $P > 0.05$). Abbreviations: AO: aorta; PA: pulmonary artery; RA: Right atrium; LA: Left atrium; LV: Left ventricle; RV: Right ventricle; IVS: Interventricular septum. ■ : WT; □ : KO.

2.4 Tbx18 基因敲除后对心脏冠状血管结构发育的影响

为探讨 Tbx18 基因敲除后是否会对心脏冠状血管网络结构的形成产生影响, 我们取 E18.5 基因敲除鼠心脏及同窝野生型小鼠心脏进行 Pecam-1 整体免疫组化染色, 染色结果提示与野生型小鼠相比, Tbx18 基因敲除小鼠心脏腹侧及背侧的主要冠状血管存在及走形均未发现明显异常(图 4a~d). E18.5 小鼠胚胎心脏切片 HE 染色后对冠状血管的

分析提示, 敲除小鼠与对照小鼠心脏左室壁、右室壁、室间隔各个部位的血管管周形态均无明显差异(图 4e, f). 用 E18.5 小鼠胚胎心脏石蜡切片行平滑肌标志物 Myh11 和 α -SMA 免疫组化染色(图 4g~j) 及用 E18.5 小鼠胚胎心脏冰冻切片行 Myh11 及 α -SMA 免疫荧光染色(图 4k~n)均提示, Tbx18 基因敲除后小鼠冠状血管主要支持细胞 - 冠脉平滑肌细胞仍正常表达.

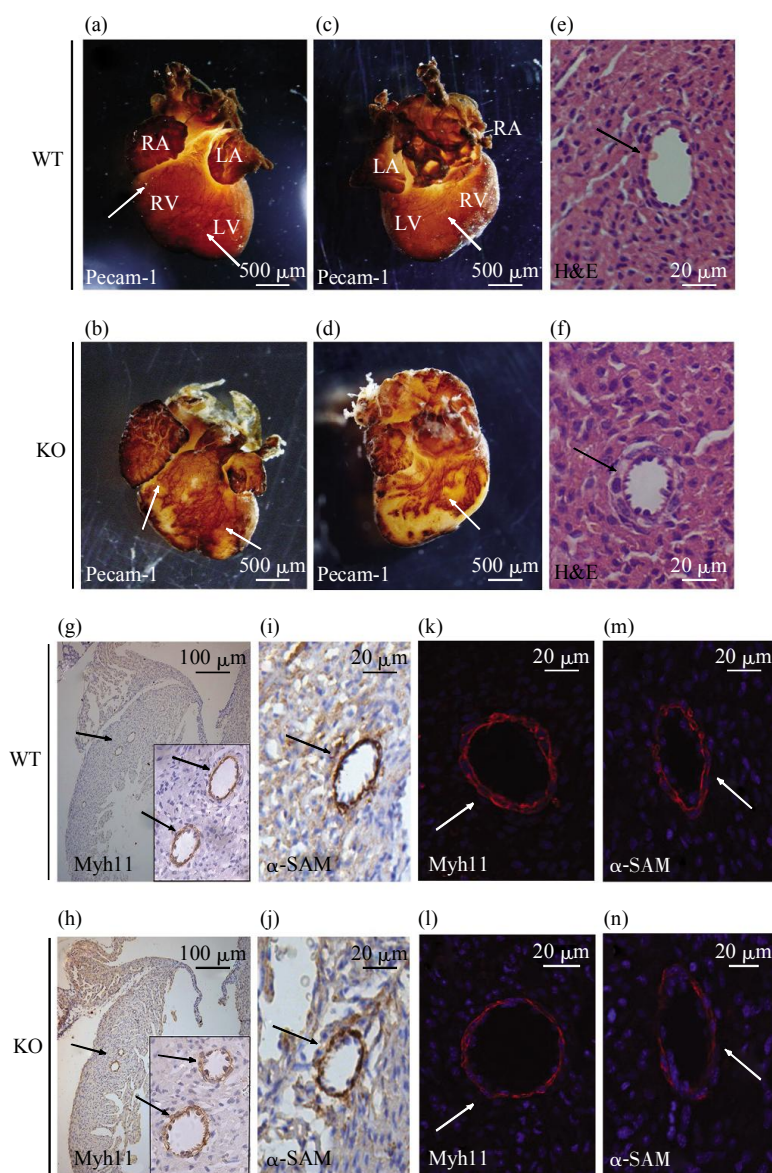


Fig. 4 Tbx18 is dispensable for coronary vasculature development

We observed more than 5 mice in each group. (a, b) Ventral view of the intact whole-mount PECAM-1 staining of WT (a) and Tbx18-KO (b) mice at E18.5. (c, d) Dorsal views depict coronary vein vasculature in WT (c) and Tbx18-KO (d) embryos. (e, f) H&E stain were used for histological analysis of the vascular structure. (g~j) Paraffin sections from E18.5 embryo hearts were immunostained with the SMC proteins Myh11 and α -SMA antibody in WT (g, i) and mutant (h, j) mice to analyze the smooth muscle component of the coronary vessels. (k~n) Immunofluorescence analysis of the SMC proteins Myh11 and α -SMA antibody on frozen sections from E18.5 hearts shows that formation of SMCs occurs normally in E18.5 Tbx18 KO hearts.

3 讨 论

T-box 基因是一类可编码调节多种信号转导的转录因子家族, 以具有高度保守的 DNA 结合区域即 T-box 区域为特点, 可以特异性识别 DNA 成分, 实现转录活化或抑制。许多 T-box 基因家族成员在脊椎动物胚胎形式发育及器官发生过程中起重要作用, 尤其在心血管系统的发生发育过程中意义重大^[10-14]。哺乳动物中有 18 个 T-box 基因家族成员^[15], 共分为 5 个亚家族, 其中与心脏发育相关的有 Tbx1 及 Tbx2 两个亚家族, 包括 Tbx20、Tbx18、Tbx1 及 Tbx2、Tbx3、Tbx5, 在心脏窦房结、心房、心室、流出道、传导系统等各个结构及区域发育过程中起重要作用^[1-3, 16-20]。

Tbx18 是 T-box 基因家族中 Tbx1 亚家族成员之一, 与脊椎动物胚胎期心脏发育密切相关^[21], 且有研究表明其与成年心脏损伤后再生有关^[22-23]。研究表明 Tbx18 对脊椎动物心脏窦房结形成及分化起重要作用^[1-2], 并且有可能参与心房、心室、室间隔、冠状血管等结构的形成^[3]。由于 Tbx18⁺ 细胞在胚胎早期心脏中主要定位于心外膜, 且有研究认为 Tbx18⁺ 细胞从心外膜迁徙分化为心肌细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞参与心脏结构形成^[3-4]。同 Wt1、Tcf21 等一样, Tbx18 被看作心外膜标志物之一, Tbx18⁺ 细胞被称为前体心外膜细胞(Tbx18⁺ CPCS)。心脏发育过程中, Tbx18 在窦房结及静脉回流系统中的作用是肯定的^[1-2], 但其在心肌结构及血管形成方面的作用尚不够明确。

利用美国 Jackson 实验室引进的两种条件性 Cre 报告系统小鼠及美国加州大学 Evans 教授惠赠的 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠, 我们已成功地建立、繁殖出 Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 和 Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ 两种 Tbx18 谱系示踪小鼠模型及 Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠模型, 并通过基因和蛋白质表达分析, 已验证建立的示踪模型能特异性地示踪 Tbx18 的命运^[4, 24]。本实验研究中, 采用我们建立的两两种示踪小鼠模型特异性标记 Tbx18⁺ 细胞及其衍生细胞, 观察到 Tbx18 参与心脏冠状血管及室间隔结构的形成, 并通过免疫荧光后激光共聚焦检测, 得出其对冠状血管形成的贡献主要为平滑肌细胞, 不分为内皮细胞。我们用 Tbx18:Cre/Cre 基因敲除小鼠模型观察 Tbx18 敲除后对小鼠心血管结构的影响, 发现与同窝野生型对照组相比, Tbx18 基因敲除后小鼠心脏整体形态、腔室结

构、心室壁及室间隔厚度、冠状血管走形、血管分布、血管数量及管周形态均无明显差异, 且管周平滑肌细胞仍可正常表达。因此我们得出, Tbx18 虽然部分参与心血管结构的形成, 但其在心脏腔室结构发育及冠状血管结构发育中不占主要地位, 不是必需的。

所有 T-box 家族成员享有共同的 DNA 结合区域, 可以识别相似序列, 而且这个区域是一个可以与其他转录因子相互干扰的 DNA 结合区域^[25]。现有研究表明, Tbx18 与其他 T-box 家族成员如 Tbx5、Tbx6、Tbx15 等相互影响^[26-27], 其中 Tbx5 与 Tbx18 一样, 在心外膜有明显表达, 并已明确其在心外膜形成及冠状血管形成过程中有重要作用^[28-29]。故我们推测, Tbx18 基因敲除后心脏腔室形态及冠状血管结构未发生明显变化, 可能与 Tbx5 的代偿作用有关。当然, 也有可能同为心外膜标志基因, 且同 Tbx18 一样在心外膜细胞迁移分化为心肌细胞及血管平滑肌细胞过程中起重要作用的 Wt1 基因的代偿作用有关^[30-31]。具体原因可以进一步通过多种基因敲除模型来分析哪种代偿起主要作用, 也可能是与 Tbx18 有相互影响的其他多种转录因子共同作用导致的。

综上所述, 本实验成功地利用示踪小鼠模型及敲除小鼠模型, 得出了 Tbx18 虽然部分参与心脏结构形成, 但其在心脏腔室结构发育及冠状血管发育过程中不是必需因素的结论。该结论为进一步探索 Tbx18 在心血管发育过程中的作用奠定了一定基础, 但 Tbx18 对心脏发育的调控是一个相当复杂的过程, 涉及众多信号通路, 导致此现象的确切原因及具体机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Christoffels V M, Mommersteeg M T, Trowe M O, *et al.* Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res*, 2006, **98**(12): 1555-1563
- [2] Wiese C, Grieskamp T, Airik R, *et al.* Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circulation Research*, 2009, **104**(3): 388-397
- [3] Cai C L, Martin J C, Sun Y, *et al.* A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature*, 2008, **454**(7200): 104-108
- [4] 杜建霖, 张 进, 蒲 荻, 等. 基因谱系示踪技术揭示小鼠 Tbx18⁺ 心脏祖细胞向心系细胞分化的潜能. *生物化学与生物物理进展*, 2011, **38**(2): 127-133
- Du J L, Zhang J, Pu D, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2011, **38**(2): 127-133

- [5] Greulich F, Farin H F, Schuster-Gossler K, *et al.* Tbx18 function in epicardial development. Cardiovascular Research, 2012, **96** (3): 476–483
- [6] Wu S P, Dong X R, Regan J N, *et al.* Tbx18 regulates development of the epicardium and coronary vessels. Dev Biol, 2013, **383** (2): 307–320
- [7] Srinivas S, Watanabe T, Lin C S, *et al.* Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. BMC Dev Biol, 2001, **1**: 4
- [8] Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporterstrain. Nature Genet, 1999, **21**(1): 70–71
- [9] 高凌志, 杜建霖, 李晓群, 等. 基因谱系示踪揭示小鼠 Tbx18⁺ 肾脏间质祖细胞分化为输尿管平滑肌. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, **28**(12): 65–70
Gao L Z, Du J L, Li X Q, *et al.* Chin J Biochem Mol Biol, 2012, **28**(12): 65–70
- [10] Mukoyama Y S, James J, Nam J, *et al.* Whole-mount confocal microscopy for vascular branching morphogenesis. Methods Mol Biol, 2012, **843**: 69–78
- [11] Singh M K, Lu M M, Massera D, *et al.* MicroRNA-processing enzyme dicer is required in epicardium for coronary vasculature development. The Journal of Biological Chemistry, 2011, **286**(47): 41036–41045
- [12] Hoogaars W M, Barnett P, Moorman A F, *et al.* T-box factors determine cardiac design. Cell Mol Life Sci, 2007, **64**(6): 646–666
- [13] Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. Cardiovasc Res, 2011, **91** (2): 212–222
- [14] Jensen B, Wang T, Christoffels V M. Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. Biochim Biophys Acta, 2013, **1833**(4): 783–794
- [15] Showell C, Binder O, Conlon F L. T-box genes in early embryogenesis. DevDyn, 2004, **229**(1): 201–218
- [16] Bakker M L, Boukens B J, Mommersteeg M T, *et al.* Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system. Circ Res, 2008, **102**(11): 1340–1349
- [17] Christoffels V M, Grieskamp T, Norden J, *et al.* Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. Nature, 2009, **458**(7240): E8–9
- [18] Plageman T F Jr, Yutzy K E. Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. J Biol Chem, 2004, **279**(18): 19026–19034
- [19] Christoffels V M, Hoogaars W M, Tessari A, *et al.* T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. Dev Dyn, 2004, **229**(4): 763–770
- [20] Vitelli F, Morishima M, Taddel I, *et al.* Tbx1 mutation causes multiple cardiovascular defects and disrupts neural crest and cranial nerve migratory pathways. Hum Mol Genet, 2002, **11**(8): 915–922
- [21] Naiche L A, Harrelson Z, Kelly R G, *et al.* T-box genes in vertebrate development. Annu Rev Genet, 2005, **39**: 219–239
- [22] Wills A A, Holdway J E, Major R J, *et al.* Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. Development, 2008, **135**(1): 183–192
- [23] Smart N, Bollini S, Dubé K N, *et al.* De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. Nature, 2011, **474**(7353): 640–644
- [24] 张进, 刘亚杰, 翁敏杰. Tbx18-Cre 基因敲入小鼠的繁殖、鉴定及其应用. 动物学杂志, 2012, **47**(03): 28–34
Zhang J, Liu Y J, Weng M J. Chin J Zoology, 2012, **47**(03): 28–34
- [25] Boogerd C J, Moorman A F, Barnett P. Protein interactions at the heart of cardiac chamber formation. Ann Anat, 2009, **191**: 505–517
- [26] Farin H F, Bussen M, Schmidt M K, *et al.* Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors. J Biol Chem, 2007, **282**(35): 25748–25759
- [27] Wehn A K, Chapman D L. Tbx18 and Tbx15 null-like phenotypes in mouse embryos expressing Tbx6 in somatic and lateral plate mesoderm. Dev Biol, 2010, **347**(2): 404–413
- [28] Hatcher C J, Diman N Y, Kim M S, *et al.* A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. Physiol Genomics, 2004, **18**(2): 129–140
- [29] Lewandowski S L, Janardhan H P, Smee K M, *et al.* Histone deacetylase 3 modulates Tbx5 activity to regulate early cardiogenesis. Hum Mol Genet, 2014, **23**(14): 3801–3809
- [30] Martínez-Estrada O M, Lettice L A, Essafi A, *et al.* Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. Nature Genetics, 2010, **42** (1): 89–93
- [31] Zeng B, Ren X F, Cao F, *et al.* Developmental patterns and characteristics of epicardial cell markers Tbx18 and Wt1 in murine embryonic heart. J Biomed Sci, 2011, **18**(1): 67

Tbx18 Function in The Development of Mouse Coronary Vascular and Ventricular Wall Structures*

WANG Hao^{1,2}, SHE Qiang^{1**}, GAO Ling-Zhi¹, ZHA Cheng-Qin¹, DU Jian-Lin¹, JING Xiao-Dong¹

⁽¹⁾ Department of Cardiovascular Medicine, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

⁽²⁾ Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400010, China)

Abstract Using Tbx18 lineage tracer mouse model and Tbx18 conditional knockout mouse model to explore the functions of Tbx18 in the development of the structures of coronary vascular and ventricular wall. Two types of lineage tracer mouse models are established: Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP and Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ, and Tbx18:Cre/Cre gene knockout mouse model are used in the experiment. We trace the fate of Tbx18 in the formation of the vascular and myocardial structure in the cardiovascular system by immunofluorescence and X-gal staining techniques. And we compare the structure of coronary vascular and ventricular wall in Tbx18:Cre/Cre gene knockout mouse with wild-type mouse by whole-mount PECAM immunohistochemistry, HE staining, immunohistochemistry and immunofluorescence techniques. The trace of Tbx18 shows that Tbx18 contributes to the structure of the mouse coronary vessels and interventricular septum, and Tbx18 expression co-localize with smooth muscle cells. The comparison between Tbx18:Cre/Cre gene knockout mouse and wild-type mouse shows that the knockout mouse can form normal coronary vascular system, and there is no difference between the thickness of the ventricular wall and the interventricular septum. The gene Tbx18 contributes to the heart vascular smooth muscle and interventricular septum, but it is not necessary in the formation of coronary vascular structure and the heart chamber structure.

Key words Tbx18, mice, heart development, genetic fate-mapping, knockout

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0279

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81270211, 81100088), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20125503110009), Scientific and Technological Research Program of Chongqing Municipal Education Commission (KJ130324).

**Corresponding author.

Tel: 86-23-63693751, E-mail: qshe98@hotmail.com

Received: December 24, 2014 Accepted: March 4, 2015