文章编号:1000-5404(2012)12-1171-05

论著

转录因子 Tbx18 在小鼠胚胎发育过程中的时空表达

蒲 荻,杜建霖,李晓群,翁敏杰,佘 强 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院心血管内科)

[摘要] **目的** 检测胚胎期小鼠 Tbx18 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况,了解 Tbx18 在小鼠胚胎发育过程中的时空表达模式。**方法** 用整体原位杂交技术检测小鼠整胚 TBX18 mRNA 的表达,用 X-gal 染色检测 Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ 双杂合基因谱系示踪模型小鼠胚胎的报告基因 LacZ 蛋白的表达,用荧光定量 PCR 检测小鼠胚胎期心脏 mRNA 的定量表达。**结果** 发现在小鼠胚胎期 9.5 ~ 10.5 d 转录因子 Tbx18 主要在前体心外膜表达,由前体心外膜逐渐迁移定位于心外膜;在 11.5 ~ 12.5 d 的小鼠胚胎 Tbx18 主要定位于心脏、上下肢、体节及上下唇鄂区域;大于 12.5 d 的小鼠胚胎 Tbx18 除了上述部位外还定位于肾、输尿管、膀胱等区域。**结论** 转录因子 Tbx18 在小鼠胚胎发育过程中的表达具有时空特异性,对小鼠心脏的发育可能起着至关重要的作用;同时在上下肢、体节、唇鄂、肾、输尿管、膀胱的发育中也可能起非常重要的作用。

[关键词] 转录因子 Tbx18;整体原位杂交;小鼠;胚胎发育;时空表达
[中图法分类号] R329.1;R329.28;R394.3 [文献标志码] A

Spatiotemporal expression of transcription factor Tbx18 during mouse embryonic development

Pu Di, Du Jianlin, Li Xiaoqun, Weng Minjie, She Qiang (Department of Cardiovascular Diseases, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To detected the mRNA and protein expression of transcription factor Tbx18, and to reveal its spatiotemporal expression during mouse embryonic development. **Methods** The Tbx18 mRNA expression in whole embryo during mouse embryonic development was detected by whole mount *in situ* hybridization. The protein expression of reporter LacZ gene in Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ genetic lineage tracer model of mouse embryos was detected using X-gal staining. The mRNA expression Tbx18 in mouse embryonic heart were detected using fluorescence quantitative PCR. **Results** The Tbx18 signals of the E9.5 d to E10.5 d mouse embryos were mainly expressed in the proepicardium at first and then emigrated to the epicardium gradually. The Tbx18 signals of the E11.5 d to E12.5 d mouse embryos were mainly expressed in epicardium, forelimb bud and hindlimb bud, somite and mandibula/maxillar cleft region. Besides the regions above, the Tbx18 signals of the mouse embryos older than E12.5 d were also expressed in the kidney, ureter and bladder. **Conclusion** The expression of the transcription factor Tbx18 has spatiotemporal idiosyncrasy in mouse embryonic development. It may play a vital role in mouse heart development, and also in the development of kidney, ureter, bladder, somite, forelimb and hindlimb buds, and mandibular/maxillar cleft region.

[**Key words**] transcription factor Tbx18; whole mount in situ hybridization; mouse; embryonic development; spatiotemporal expression

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30971213), the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (81100088), the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-1-13) and the Key Project of Chongqing Medical University (XBZD201010).
Corresponding author: She Qiang, Tel: 86-23-63693752, E-mail: qshe98@hotmail.com

整体原位杂交技术已成为研究胚胎发育过程中基因表达及其时空定位的一种准确、有效的技术,它能从整体水平为研究 mRNA 的表达提供三维信息,对研究胚胎期基因表达的作用尤为突出,数十年来该技术已得到了广泛的应用和巨大的发展[1-4]。基因谱系示踪模型 Cre/Rosa26R/LacZ 可以追踪基因的表达模式[5],Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ 双杂基因谱系示踪模型可通过检测小鼠报告基因 LacZ 蛋白表达定位情况来准确示踪 Tbx18 的表达模式。T-box 基因编码的转录因子调节着生物心脏发育进程的多个方面[6]。转录因子 Tbx18 是 T-box 家族的成员之一,位于染色体 6q14-q15,是新的祖细胞标记因子之一,具有诱导多向分化

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30971213);国家自然科学青年基金(81100088);重庆市卫生局重点项目(2009-1-13);2010 重庆医科大学校级重点项目(XBZD201010)
[通信作者] 佘 强,电话:(023)63693752,E-mail:qshe98@hotmail.com

潜能,是胚胎发育期重要的转录因子之一,对小鼠胚胎期多种器官的发育起重要作用,特别是对胚胎期心脏的发育作用尤为突出[6-7],但其在胚胎发育过程中的时空定位、定量表达及其对胚胎发育的作用及具体机制尚未完全明了[7-10]。为进一步揭示转录因子 Tbx18 的时空表达模式,本实验应用整胚及整器官原位杂交技术检测小鼠胚胎期 Tbx18 mRNA 的整体表达情况,并与 Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ 双杂基因谱系示踪模型小鼠在胚胎 LacZ 染色结果进行对照;利用荧光定量 PCR 检测胚胎心脏 Tbx18 mRNA 变化,进一步揭示 Tbx18 mRNA 在胚胎心脏发育的定量表达情况。拟在 mRNA 水平及蛋白水平阐明转录因子 Tbx18 在小鼠胚胎发育过程中的时空表达问题,为进一步的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

8~9 周龄成年 C57 小鼠,雌性及雄性小鼠各 30 只,体质量 25~30 g,购自重庆医科大学实验动物中心;成年 LacZ 雄性小鼠及 Cre 雌性小鼠各 20 只,均为 8~9 周龄,体质量 25~30 g,由 Jackson 实验室引进,并由重庆医科大学 SPF 中心繁殖。分别将其按雌雄 1∶1比例于 20:00 合笼,次日 8:00 分笼,查见雌鼠有阴栓者计为胚胎(E)0.5 d。在适当天数收集胚胎。

肝素、甘氨酸、吐温-20、甲醇、戊二醛、过氧化氢和多聚甲醛、绵羊血清、20×SSC、EDTA、马来酸(均购至北京鼎国生物);质粒抽提试剂盒、*Eco*RⅠ、*Hind*Ⅲ、肝素、戊二醛、BSA、酵母转运 RNA 和去离子甲酰胺、5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷(X-gal)、脱氧胆酸钠、NP-40(购自 Promega 公司);RNAiso Plus、PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(购自 TaKaRa 公司);蛋白酶 K、FastStart Universal SYBR Green Master、DIG RNA labeling kit 和 DIG Detection kit(购自 Roche 公司)。DH5α 感受态菌株由本实验室保存。Tbx18 探针质粒由德国汉诺威医学院 Andreas Kispert 教授惠赠。

1.2 试剂配制

①PBST:PBS(pH=7.4)中加入 0.1% 吐温-20。②预杂交液:50%(体积比)去离子甲酰胺、1%(质量体积比) blocking reagent、5×SSC、1 mg/ml 酵母转运 RNA、0.1 mg/ml 肝素、0.1%(质量体积比) CHAPS、5 mmol/L EDTA、0.1% BSA、0.1% 吐温-20。MA 缓冲液(pH=7.5):100 mmol/L 马来酸、150 mmol/L NaCl。抗体缓冲液:10%(体积比)灭活绵羊血清、1%(质量体积比)封阻剂,溶于 PBST 中。抗体溶液:抗地高辛抗体与抗体缓冲液按 1∶2 000 的比例配制。AP_1 缓冲液:0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris pH=9.5, 50 mmol/L $MgCl_2$。显色液:NBT/BCIP 与 AP_1 缓冲液按 1∶50 的比例配制。终止液:100 mmol/L Tris pH=7.4, 1 mmol/L EDTA。所用玻璃器皿及 EP 管等都经 DEPC 处理以去除 RNA 酶,所有试剂用经 DEPC 处理后的水配制。

1.3 实验方法

1.3.1 扩增质粒及鉴定 将 Tbx18 探针质粒用化学转化的方法转化到感受态大肠杆菌 DH5α 中,挑出单克隆菌摇菌扩增质粒,通过质粒抽提试剂盒抽提质粒,并用 *Eco*RⅠ对其双酶切位点进行酶切并测序鉴定。

1.3.2 探针质粒的线性化 用限制性内切酶 *Hind*Ⅲ酶切探针质粒使其线性化,并通过琼脂糖凝胶电泳看是否酶切完全。用酚-氯仿法提取并纯化后用冷乙醇沉淀酶切好的线性探针质粒,用无 RNA 酶的水溶解沉淀的 DNA 使终浓度为 0.5~1.0 μg/μl。

1.3.3 RNA 探针的标记 以线性化的 Tbx18 为模板,用 DIG RNA labeling kit 合成地高辛标记 Tbx18 RNA 探针,其反应体系及反应条件参照 DIG RNA labeling kit 说明书,以 0.7% 琼脂糖凝胶电泳估计探针 RNA 产量。加 2 μl DNA 酶 37 ℃孵育 15 min 除去剩余 DNA,加入 0.2 mmol/L EDTA 2 μl 终止反应。加入 100 μl TE、10 μl 4 mol/L LiCl、300 μl 预冷无水乙醇,混匀于 -70 ℃过夜。次日,以 12 000 r/min,4 ℃离心 15 min,70% 的乙醇洗涤,12 000 r/min 离心 10 min,再用无 RNA 酶的水溶解探针,使其浓度为 0.5~1.0 μg/μl。

1.3.4 胚胎及器官杂交前的准备 按照实验设计的天数,处死怀孕雌鼠,小心解剖出胚胎及整体器官(将培养皿置冰上操作),用预冷的 PBS 漂洗胚胎 2 次,加新鲜配制的 4% 多聚甲醛/PBS 溶液,4 ℃轻摇固定过夜。次日,用 PBST 洗胚胎(或器官)5 min,2 次,用 25%、50%、75% 的甲醇/PBST 溶液每步 5 min梯度脱水;加 100% 的甲醇脱水 5 min,2 次(于 -20 ℃储存)。杂交前取出胚胎,用 75%、50%、25% 的甲醇/PBST 溶液每步 5 min 梯度复水,用 PBST 洗 5 min,2 次。用 6% 的 H_2O_2 处理 12.5 d 的胚胎 30 min、11.5 d 胚胎 15 min、9.5 d 和 10.5 d 的胚胎无需 H_2O_2 处理(整体器官视胚龄及组织大小适当处理)。再用 PBST 洗胚胎 5 min,2 次。用蛋白酶 K 室温(18~25 ℃)消化胚胎:9.5 d 的胚胎以 10 μg/μl 的蛋白酶 K 消化 10 min,10.5 d 的胚胎以 10 μg/μl 的蛋白酶 K 消化 20 min,10.5 d 的胚胎以 20 μg/μl 的蛋白酶 K 消化 25 min,10.5 d 的胚胎以 20 μg/μl的蛋白酶 K 消化 35 min。加 2 mg/ml 的甘氨酸/PBST 5 min终止消化,用 PBST 洗胚胎 5 min,2 次。用 4% 的多聚甲醛/0.2% 戊二醛/PBST 再固定胚胎 20 min,用 PBST 洗 5 min,2 次。

1.3.5 杂交及杂交后洗涤 向含胚胎的 2 ml EP 管中加入 900 μl 预杂交液,于 68 ℃水浴中预杂交 4~6 h。加 1 μg 探针至 100 μl 预杂交液于 95 ℃中变性 5 min,立即置于冰上 10 min,再将其加至含胚胎的 EP 管中 70 ℃杂交 24~36 h。移出并回收含探针的杂交液,加 800 μl 预杂交液 70 ℃孵育 5 min。不移出预杂交液,加 400 μl 5×SSC(pH=4.5)70 ℃孵育5 min,3 次。弃液,加 2 ml 2×SSC(pH=7.0)/0.1% CHAPS 70 ℃水浴洗涤 30 min,重复 1 次。用 MA 缓冲液常温洗涤胚胎 10 min,2 次。2 ml MA 缓冲液 70 ℃洗涤胚胎 30 min,2 次。PBS 室温洗涤胚胎 10 min,2 次。PBST 室温洗胚胎 5 min,1 次。

1.3.6 免疫检测 向含胚胎的 EP 管中加入 1 ml 抗体缓冲液,4 ℃轻摇孵育 6 h 至过夜。(同时将抗地高辛抗体以 1∶2 000的比例加入抗体缓冲液配制成抗体溶液)。移去抗体缓冲液,向 EP 管中加入 1 ml 抗体溶液于 4 ℃轻摇孵育过夜。移出并回收抗体溶液,将胚胎转至 10 ml EP 管,用 4 ml PBST/0.1% BSA 于常温轻摇洗胚胎 1 h,重复 6 次或过夜,用 AP_1 缓冲液室温洗胚胎 10 min,2 次。将胚胎转至 12 孔培养皿,加显色液 4 ml,于 4 ℃避光轻摇显色(每 30 分钟体视镜下观察显色情

况)。显色满意后,用终止液常温洗涤胚胎 15 min,2 次。再用 25%、50%、75% 的甲醇/PBST 梯度甲醇溶液脱水,每步 5 min。再用 100% 的甲醇溶液脱水 5 min,3 次。将胚胎转移至含 75% 的甲醇/PBST 溶液,在体视镜下观察拍照。

1.3.7 整胚杂交后心脏切片分析 对整体小鼠胚胎原位杂交结果进行心脏切片分析,以明确其具体的表达定位情况。操作步骤参见文献[1]。

1.3.8 X-gal 染色 我们利用 X-gal 染色方法检测 Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ 双杂合基因谱系示踪模型的小鼠胚胎在发育早期 LacZ 蛋白表达定位情况,并与原位杂交结果相对照,观察在 Tbx18 在蛋白表达定位是否与 mRNA 水平相一致,进一步揭示 Tbx18 的时空表达模式。X-gal 染色具体方法参照文献[11]。

1.3.9 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 技术检测 E12.5 d 至新生的小鼠心脏 Tbx18 mRNA 的表达情况,进一步明确 Tbx18 mRNA 在心脏的表达随胚龄的变化情况。提取相应天数小鼠心脏 RNA 并将其逆转录(操作过程见 TaKaRa 相关说明书)。设计目的基因 Tbx18 mRNA(GenBank 登录号:MA078132)上游引物为:5′-ATCCCTGGAATCCCAAAGCAA-3′,下游:5′-ATCCAGACAACAGGTGAGGATGTG-3′,产物长度为 100 bp,并设计小鼠内参基因 GAPDH 引物上游:5′-AAATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3′,下游:5′-CAACAATCTCCACTTTGCCACTG-3′,产物长度为 100 bp。荧光定量 PCR 反应体系和条件按 Bio-Rad C1000 仪器使用手册设置进行扩增,最后对目的基因及内参基因扩增产物进行融解曲线分析。

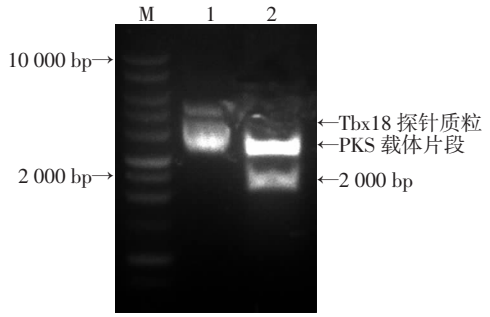
1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件,组间比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 Tbx18 探针质粒的成功扩增及鉴定

成功地转化并扩增了 Tbx18 探针质粒,应用限制性内切酶 *Eco*RⅠ酶切其双酶切位点鉴定 Tbx18 探针质粒,得到了大小为 2 000 bp 的线性化质粒片段(图 1),与获赠质粒的信息一致,通过测序鉴定,并与 PubMed 上查得的 Tbx18 序列进行验证,鉴定结果与 Tbx18 序列符合。

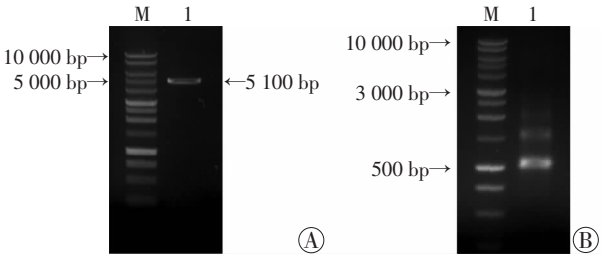


M:1 kb DNA 标准;1:Tbx18 探针质粒;2: Tbx18 序列片段

图 1 Tbx18 探针质粒扩增及鉴定结果

2.2 Tbx18 探针质粒的成功标记

应用 *Hind*Ⅲ酶切 Tbx18 探针质粒得到了线性化的质粒片段(图 2A)。以线性化的探针质粒为模板,用地高辛标记试剂盒成功地标记合成了地高辛标记的 Tbx18 RNA 探针(图 2B)。

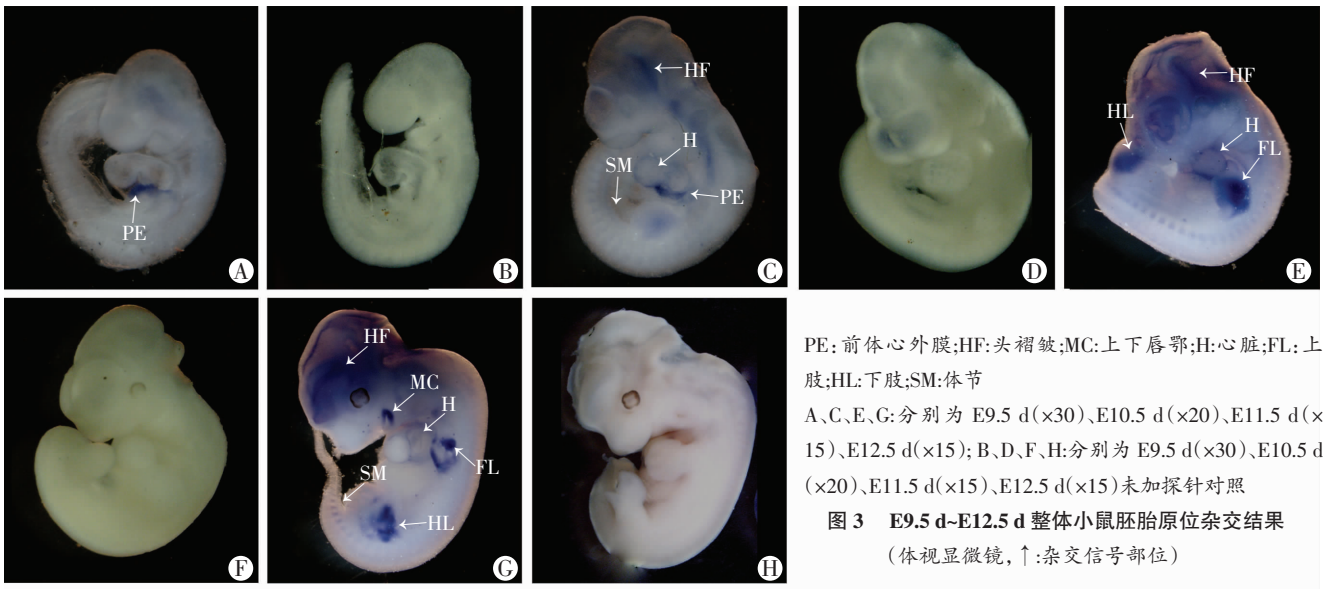


A:Tbx18 Tbx18 探针质粒的线性化 M:1 kb DNA 标准;1:线性化的 Tbx18 质粒;B: Tbx18 探针质粒的标记 M:1 kb DNA 标准;1:标记合成的 Tbx18 RNA 探针

图 2 Tbx18 质粒线性化及 Tbx18 探针标记

2.3 整体胚胎原位杂交结果

对比 E9.5 d ~ E12.5 d 加 Tbx18 RNA 探针的杂交图像与未加探针的杂交图像(图 3),可见小鼠胚胎 Tbx18 mRNA 在 E9.5 d 主要在前体心外膜区域表达,E10.5 d 在前体心外膜及心外膜均有表达,在上肢、体节、头褶皱也有表达。E11.5 d、12.5 d 的小鼠胚胎 Tbx18 mRNA 除了定位于心脏、四肢、体节、头褶皱外,E12.5 d 还定位于上下唇鄂区域。

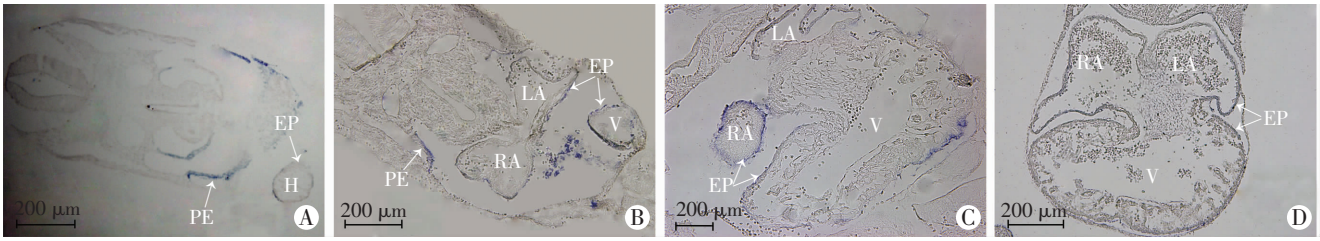


PE:前体心外膜;HF:头褶皱;MC:上下唇鄂;H:心脏;FL:上肢;HL:下肢;SM:体节

A、C、E、G:分别为 E9.5 d(×30)、E10.5 d(×20)、E11.5 d(×15)、E12.5 d(×15);B、D、F、H:分别为 E9.5 d(×30)、E10.5 d(×20)、E11.5 d(×15)、E12.5 d(×15)未加探针对照

图 3 E9.5 d~E12.5 d 整体小鼠胚胎原位杂交结果

(体视显微镜,↑:杂交信号部位)



PE:前体心外膜;H:心脏;EP:心外膜;LA:左心房;RA:右心房,V:心室 A: E9.5 d; B: E10.5 d; C: E11.5 d; D: E12.5 d

图4 E9.5 d~E12.5 d整体小鼠胚胎杂交后切片观察 (↑:杂交信号部位)

2.4 整体胚胎杂交后切片结果

对整体小鼠胚胎杂交后的结果进行心脏切片结果见图4。可见E9.5 d杂交信号主要在前体心外膜表达,心外膜上仅有少量点状分布;在E10.5 d杂交信号在前体心外膜及心外膜均有表达,但前体心外膜的表达量减少而心外膜上表达量增多;在E11.5 d、E12.5 d杂交信号主要在心外膜表达。

2.5 整器官原位杂交结果

大于E12.5 d小鼠胚胎Tbx18 mRNA表达除了定位于心脏、上下肢、体节等,也定位于肾、输尿管、膀胱等部位(图5)。

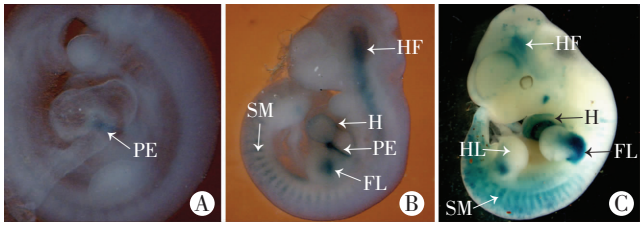


A: E12.5 d、E14.5 d、E16.5 d心脏;B: E14.5 d、E15.5 d、E16.5 d四肢;C: E18.5 d肾脏;D: E18.5 d肾脏输尿管;E: E18.5 d膀胱

图5 小鼠整器官原位杂交结果 (体视显微镜 ×15)

2.6 双杂合小鼠X-gal染色结果

整胚Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ双杂合基因谱系示踪模型小鼠X-gal染色结果(图6)显示在小鼠胚胎LacZ蛋白在E9.5 d主要在前体心外膜表达;在E10.5 d在前体心外膜及心外膜均有表达,在上肢、体节、头褶皱也有表达;在E11.5 d定位于心脏、四肢、体节、头褶皱。Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ双杂合基因谱系示踪模型报告基因LacZ蛋白的表达时空定位与Tbx18 mRNA结果(图3A、C、E)相一致。



PE:前体心外膜;HF:头褶皱;MC:上下唇鄂;H:心脏;FL:上肢;HL:下肢;SM:体节 A: E9.5 d(×50); B: E10.5 d(×20); C: E11.5 d(×15)

图6 体视显微镜观察Tbx18-Cre/Rosa26R/LacZ双杂合基因谱系示踪模型的小鼠整胚X-gal染色结果 (↑:杂交信号部位)

2.7 荧光定量PCR结果

小鼠心脏荧光定量PCR结果显示:以新生小鼠(1.000)为对照组作比较,E12.5 d(2.291±0.145)、E14.5 d(2.280±0.112)、E16.5 d(2.938±0.072)、E18.5 d(2.273±0.033)Tbx18 mRNA的表达量均增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在E16.5 d Tbx18 mRNA表达量最高,而在新生小鼠表达明显降低。E12.5 d、E14.5 d和E18.5 d的结果经分析未见统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

整体原位杂交技术是胚胎基因表达的一项重要研究手段,是基于单链DNA或RNA片段在适当的条件下与某一特定同源互补核酸片段进行配对杂交的原理[12],是目前研究胚胎期基因表达的一项重要手段。相比切片原位杂交而言,整体原位杂交具有可以减少RNA的丢失,操作简单,节约原料,实验条件要求相对较低,适合条件较差的实验室。地高辛标记的RNA探针较DNA探针具有更高的敏感性和特异性且无同位素标记探针的放射性[13],是目前整体原位杂交最常用的一种探针。实验中我们采用了地高辛标记的RNA探针对整体胚胎进行原位杂交从而保证了实验操作的可行性和实验结果的可靠性。

明确心脏祖细胞的起源及作用对于阐明先天性及获得性心脏病的发病机制有重要的作用[14-15]。通过调控心脏祖细胞的表达有可能从细胞水平来治疗心脏疾病[16]。Tbx18近年来发现的第3类心脏祖细胞,其对小鼠胚胎的发育起非常重要作用。我们的研究发现:在E9.5 d和E10.5 d的小鼠胚胎含转录因子Tbx18的细胞最初在前体心外膜表达,后逐渐向心外膜区域迁移;在≥E11.5 d的胚胎心脏也有明确而特异地Tbx18表达,表明转录因子Tbx18是小鼠胚胎前体心外膜的早期标志之一,对小鼠心脏的发育有重要作用,在小鼠胚胎期的心脏中E16.5 d Tbx18 mRNA的表达量最高,以后逐渐降低,到新生时表达已明显减少,证明其随对心脏发育的作用主要是在胚胎期,但其机制目前还不清楚。对于鸟类的研究发现在胚胎的形成过程中,前体心外膜细胞向心外膜迁移,并通过上皮间质转化机制向心系细胞转移分化[17-19]。近年来,对斑马鱼的研究发现心脏再生与转录因子Tbx18密切相关[20],在损伤的心脏再生过程中有Tbx18细胞的聚集,并且有新生血管的形成。而Tbx18能否促进小鼠心脏的损伤修复和心肌再生还需进一步的研究。有研究表明转录因子Tbx18对输尿管间充质的发育起调节作用[21],我们的实验发现转录因子Tbx18在小鼠胚胎期肾、输尿管、膀胱均有表达,表明其对泌尿系统的发育有重要作用。另外,在体节、上下肢、上下唇鄂区域也有Tbx18的表达,推测其对这些部位的发育也起重要作用。

转录因子Tbx18的在早期小鼠胚胎发育过程中的表达定位具有时空特异性,定位表达于不同胚胎时期的前体心外膜、心脏、上下肢、体节、肾、输尿管、膀胱等部位,表明其具有诱导多向分化潜能。从理论上说可以利用转录因子Tbx18的诱导多向分化潜能来促进心脏、肾、输尿管等部位细胞的再生和损伤修复,从而达到从细胞水平治疗疾病的目的。本实验为进一步研究Tbx18的功能提供了重要依据。

志谢 感谢德国汉诺威医学院Andreas Kispert教授惠赠本实验所用的Tbx18探针质粒

参考文献:

[1] Piette D, Hendrickx M, Willems E, *et al*. An optimized procedure for whole-mount in situ hybridization on mouse embryos and embryoid bodies[J]. Nat Protoc, 2008, 3(7): 1194-1201.

[2] Irving C. In-situ hybridization and immunohistochemistry in whole embryos[J]. Methods Mol Biol, 2008, 461: 687-695.

[3] Shimizu H, Uchibe K, Asahara H. Large-scale whole mount in situ hybridization of mouse embryos[J]. Methods Mol Biol, 2009, 577: 167-179.

[4] Irvine S Q. Whole-mount in situ hybridization of small invertebrate embryos using laboratory mini-columns[J]. Biotechniques, 2007, 43(6): 764, 766, 768.

[5] Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain[J]. Nat Genet, 1999, 21(1): 70-71.

[6] Plageman T F Jr, Yutzey K E. T-box genes and heart development: putting the "T" in heart[J]. Dev Dyn, 2005, 232(1): 11-20.

[7] Cai C L, Martin J C, Sun Y, *et al*. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells[J]. Nature, 2008, 454(7200): 104-108.

[8] 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[J]. Circ Res, 2009, 104(3): 388-397.

[9] Christoffels V M, Grieskamp T, Norden J, *et al*. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors[J]. Nature, 2009, 458(7240): E8-E9.

[10] Grieskamp T, Rudat C, Ludtke T H, *et al*. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells[J]. Circ Res, 2011, 108(7): 813-823.

[11] 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[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(2): 127-133.

[12] Gall J G, Pardue M L. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1969, 63(2): 378-383.

[13] Chotteau-Lelievre A, Dolle P, Gofflot F. Expression analysis of murine genes using in situ hybridization with radioactive and nonradioactively labeled RNA probes[J]. Methods Mol Biol, 2006, 326: 61-87.

[14] Olson E N. A decade of discoveries in cardiac biology[J]. Nat Med, 2004, 10(5): 467-474.

[15] Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis[J]. Cell, 2006, 126(6): 1037-1048.

[16] Murry C E, Field L J, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point[J]. Circulation, 2005, 112(20): 3174-3183.

[17] Mikawa T, Fischman D A. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(20): 9504-9508.

[18] Mikawa T, Gourdie R G. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ[J]. Dev Biol, 1996, 174(2): 221-232.

[19] Gittenberger-de-Groot A C, Vrancken-Peeters M P, Mentink M M, *et al*. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions[J]. Circ Res, 1998, 82(10): 1043-1052.

[20] Lepilina A, Coon A N, Kikuchi K, *et al*. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration[J]. Cell, 2006, 127(3): 607-619.

[21] Airik R, Bussen M, Singh M K, *et al*. Tbx18 regulates the development of the ureteral mesenchyme[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 663-674.

(**收稿**:2011-12-19;**修回**:2012-02-21)

(编辑 吴培红)