

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*

杜建霖** 张进** 蒲荻 高二志 杨景涛 高凌志 夏爽 邓松柏 余强***

(重庆医科大学附属第二医院心血管内科, 重庆 400010)

摘要 心脏祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)的研究对阐明先天性心脏病的机制及治疗心血管疾病具有重要意义。哺乳动物的心脏组织由多种不同 CPCs 分化形成。转录因子 Tbx18 在发育中的心外膜中表达, 对心脏的发育形成起重要的调节作用。为了在组织及活体细胞水平检测和阐明 Tbx18⁺CPC 的分化潜能, 应用 Cre-LoxP 系统建立 Tbx18⁺CPCs 基因命运谱系示踪模型: Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 和 Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ 双杂合基因敲入小鼠。该双杂合基因敲入小鼠通过 Cre 的表达能有效地示踪 Tbx18⁺细胞在胚胎和成年小鼠中的分化命运。Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 双杂合小鼠心脏能非常容易地利用流式细胞分选系统(FACS)分离出 YFP⁺细胞, 也可在倒置共聚焦显微镜下观察。应用 X-gal 染色分析其表达模式, 揭示 Tbx18 命运谱系参与心房肌、室间隔、心室肌、冠状动脉、瓣膜等的形成。应用免疫荧光技术初步揭示 Tbx18⁺CPCs 向心肌钙蛋白 T(cTNT)阳性心肌细胞和平滑肌肌球蛋白重链 11(MYH11)阳性血管平滑肌细胞分化的潜能。心脏是一个由多种肌肉和非肌肉组织细胞构成的复杂器官。推测 Tbx18 可能在心脏祖细胞向肌源性细胞分化的信号通路中起重要调节作用。在上述研究中应用基因谱系示踪技术, 验证 Tbx18 可作为一类 CPCs 的标志, 为更深入揭示心脏祖细胞向心系细胞的分化潜能打下基础。

关键词 T-box 转录因子 18, 心脏祖细胞, 谱系示踪, 心肌细胞

学科分类号 R394.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00616

心脏祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)的发现, 对阐明先天性心脏缺陷等心脏疾病的机制及治疗性心肌再生的研究可能具有非常重要的价值^[1-2]。有研究表明小鼠^[3]及人体^[4]内的 CPCs 具有分化为主要心脏组织细胞的能力, 为心肌再生提供一种优越的细胞类型。CPCs 具有内源再生潜能而不形成畸胎瘤。Tbx18⁺CPCs 是新近发现的一组可能对心肌细胞再生, 特别是心脏传导系统的发育形成, 起重要作用的细胞群^[4-5], 但是, Christoffels 等^[6]对 Tbx18⁺CPCs 存在质疑, 因此, 阐明其心肌分化潜能, 具有重要意义。本研究的目的是利用 Cre-LoxP 系统, 建立 Tbx18⁺CPCs 谱系示踪模型, 揭示 Tbx18⁺CPCs 分化形成心脏组织细胞的潜能。

1 材料和方法

1.1 材料

GoTa^q® Master Mix(M7122)、Wizard® 基因组

纯化试剂盒(A1120)、蛋白酶 K(V3021)购自 Promega 公司; 5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷(X-gal(B4252))、N,N-二甲基甲酰胺(D4551)、铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)、亚铁氰化钾(K₄Fe(CN)₆·3H₂O)、脱氧胆酸钠(D6750)、多聚-L-赖氨酸氢溴酸盐(P1524)及 MgCl₂、EGTA、NP-40、胰蛋白酶、HEPES、NaCl、葡萄糖、MgSO₄ 等试剂购自 Sigma 公司; 细胞培养瓶、24 孔细胞培养板购自 Corning 公司; II 型胶原蛋白酶购自 Worthington(LS004176); 小鼠 cardiac troponin

* 国家自然科学基金面上项目(NSFC. 30971213), 重庆市卫生局重点项目(2009-1-13)和 2010 重庆医科大学校级重点项目(XBZD. 201010)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 023-63693752, E-mail: qshe98@hotmail.com

收稿日期: 2010-11-27, 接受日期: 2011-01-12

T 抗体购自 Thermo Scientific 公司 (MSZ-295-P, 1 : 200), 兔 MYH11 抗体 (SC-98705)、小鼠 VE-cadherin 抗体 (SC-9989) 购自 Santa Cruz 公司; TRITC 标记抗兔 IgG (ZF-0316)、TRITC 标记抗小鼠 IgG (ZF-0313) 为北京中杉公司生产, 重庆医科大学神经病学实验室朱琼博士惠赠; 马血清为 HyClone 产品; 高糖 DMEM 培养基、M199 细胞培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、双抗为 Invitrogen 公司产品。

1.2 条件性基因敲入小鼠的繁育、筛选及双杂合模型的建立

实验用小鼠饲养于 SPF 级动物房; Tbx18-Cre 基因敲入雄性小鼠^[9] (美国加州大学 Evans 教授惠赠) 与同一品系的 C57BL/6 雌性小鼠进行交配, 纯合子 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠具有胚胎致死性, 繁育在其杂合子状态下进行。条件性 Cre 报告系统小鼠 Rosa26-EYFP 和 Rosa26-LacZ 系^[7-8], 可以杂合子状态或者纯合子状态与杂合子 Tbx18-Cre 基因敲入小鼠交配 (1 : 2), 22 : 00 交配, 次日 8 : 00 观察, 若见阴栓记胚龄 E0.5 天。子代基因敲入小鼠在出生 8 到 14 天之间, 取尾并标记, 而胚胎取胚胎组织, Wizard[®] 基因组纯化试剂盒提取基因组, Tbx18-Cre 杂合子、Rosa26-EYFP 和 Rosa26-LacZ 纯合子或者杂合子、双杂合 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP、双杂合 Tbx18-Cre/Rosa26-LacZ, 用 PCR 方法筛选, 具体方法参考相关文献^[5, 7-8]。

1.3 整体 X-gal 染色

小鼠胚胎或者心脏组织用 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 15~90 min。室温 β-半乳糖苷酶洗涤缓冲液 (2 mmol/L MgCl₂、0.01% 脱氧胆酸钠、0.02% NP-40、100 mmol/L PBS 缓冲液) 洗涤 3 次, 室温 β-半乳糖苷酶染色液 (5 mmol/L 铁氰化钾, 5 mmol/L 亚铁氰化钾, 2 mmol/L MgCl₂, 0.01% 脱氧胆酸钠, 0.02% NP-40, 0.1% X-gal, PBS 缓冲液) 中染色 1~24 h。4% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜或者更长时间。整体胚胎或者组织可储存在 PBS 中用体视镜 (OLYMPUS SZX16) 观察、拍照。染色的胚胎或者组织, 常规石蜡包埋、切片、复染、封片处理, 显微镜拍照。

1.4 心肌细胞培养及细胞分离

胚龄 E16.5 或者出生 24 h 内新生小鼠, 在无菌条件下取出心脏, 预冷的 ADS 缓冲液 (116 mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES, 0.012% NaH₂PO₄·2H₂O, 0.1% 葡萄糖, 0.04% KCl, 0.01% MgSO₄·7H₂O,

pH7.35) 中漂洗 3 次, 剪成小的组织块, 经 ADS 缓冲液配制的消化酶 (0.05% II 型胶原蛋白酶和 0.06% 胰蛋白酶) 37℃ 恒温振荡消化, 吸取上清, 胎牛血清终止, 离心搜集细胞, 重复消化 4~5 次, 直到组织全部消化完, 37℃ 预热的培养基培养 (DMEM 和 M199 按 4 : 1 配制, 10% 马血清, 5% FBS, 5 mmol/L HEPES, pH7.4, 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 1×双抗) 培养。最后用差速贴壁法分离心肌细胞, 爬片培养 48 h 后进行免疫荧光染色。取 20 个胚胎心脏或者新生 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP 小鼠心脏, 体外培养心肌细胞, 48 h 后激光共聚焦显微镜 (Leica SP2, 德国) 观察活细胞 EYFP 的表达, 流式细胞分选仪 FACS (BD, 美国) 分选纯化 EYFP⁺ 细胞。

1.5 免疫荧光染色

胚胎或者组织在解剖后于 4% 多聚甲醛 4℃ 固定 10~30 min, OCT 包埋, 冰冻切片 (5~10 μm), 然后固定 5 min 减少内源性 YFP 的表达, 细胞仅固定 8 min, 按常规方法进行免疫荧光染色, 激光共聚焦显微镜采集图像。

2 结 果

2.1 Tbx18⁺心脏祖细胞谱系示踪模型的建立

2.1.1 双杂合 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP、双杂合 Tbx18-Cre/Rosa26-LacZ 基因型鉴定。 Tbx18-Cre、Rosa26-EYFP、Rosa26-LacZ 阳性小鼠 PCR 分别扩增出约 400 bp、320 bp、340 bp (例图略) 的目的条带。如图 1 所示, 编号 1、2、5、16 的小鼠为 Rosa26-EYFP 杂合基因敲入鼠, 编号 10、12、13 的鼠为 Tbx18-Cre 基因敲入杂合鼠, 而编号为 6、9、11、14 的小鼠为 Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP 双杂合基因敲入小鼠。

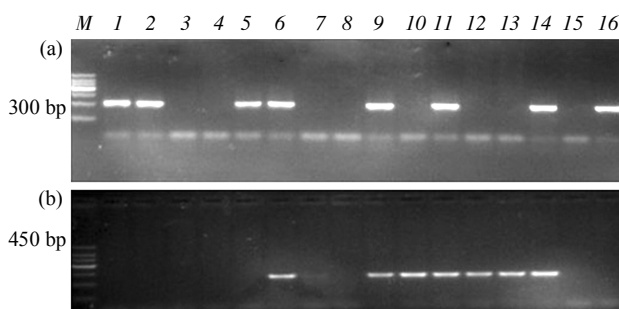


Fig. 1 Identification of Tbx18-Cre/Rosa26-EYFP double-heterozygous mice by PCR

(a) Rosa26-EYFP reporter strain mice. (b) Tbx18-Cre knock-in mice.

2.1.2 EYFP 阳性活细胞蛋白质表达检测. 为验证 $Tbx18$ -Cre/Rosa26-EYFP 模型在活体细胞 EYFP 的表达水平, 我们对培养的新生或者胚胎心肌细胞进行 EYFP 荧光观察, EYFP 在活体 $Tbx18$ -Cre/Rosa26-EYFP 模型心肌细胞表达(图 2a~c). 为再次验证 EYFP 表达水平和分析 EYFP 阳性细胞的比例, 利用 FACS 分选纯化 EYFP⁺ 细胞, 最后成功地在体外分选出纯化的 EYFP⁺ 细胞(图 2d). 我们共培养 $Tbx18$ -Cre 杂合子与 Rosa26-EYFP 杂合子杂交后新生或者胚胎小鼠心脏 20 个, 最后有 5 只

小鼠经过基因型鉴定为 $Tbx18$ -Cre/Rosa26-EYFP 双杂合小鼠, 最后在全部分离出 EYFP⁺ 细胞比例为 6.16%, 可以估算 EYFP⁺ 细胞占全部心肌细胞的比例约 25%左右, 推测 $Tbx18^+$ CPCs 至少参与大约四分之一的心肌细胞形成. 全部基因敲入阳性鼠比例基本符合孟德尔遗传规律, 所有基因敲入小鼠均没有发生基因遗漏及蛋白质表达水平不足现象(具体数据略). 该模型的建立对从活体细胞水平阐明 $Tbx18^+$ CPCs 的机制和验证其分化出的细胞功能, 具有重要意义.

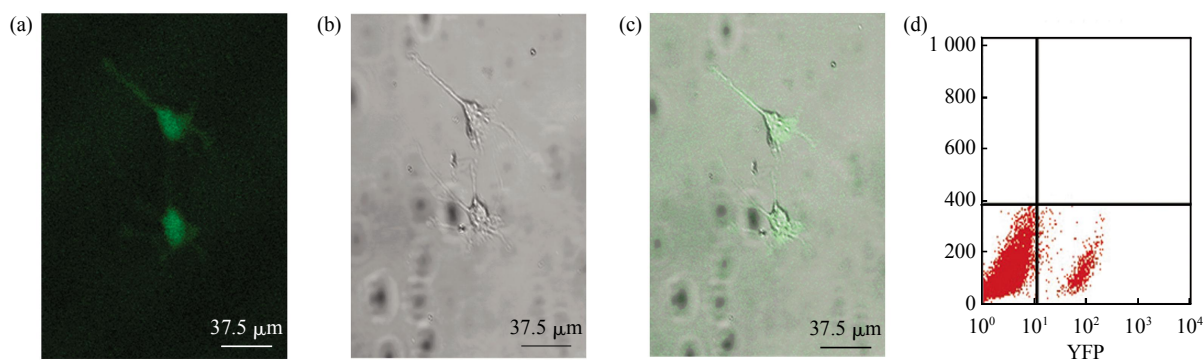


Fig. 2 The observation of $Tbx18$ -derived living cells by laser scanning confocal microscope and FACS

(a), (b), (c) YFP⁺ cardiomyocytes can be observed with 488 nm excitation. Cultured cells are YFP positive, demonstrating they are $Tbx18$ descendants which can be monitored under an inverted confocal microscope. (d) YFP⁺ cardiomyocytes can be easily isolated from heart of $Tbx18$ -Cre/Rosa26-EYFP double-heterozygous mice by fluorescence activated cell sorter(FACS).

2.2 组织检测 LacZ 蛋白表达

为观察 $Tbx18$ -Cre/Rosa26-LacZ 模型心脏组织的 LacZ 蛋白表达水平, 我们对解剖的双杂合小鼠心脏组织进行整体心脏 X-gal 染色, 检测 LacZ 蛋白的表达. 结果显示 LacZ 蛋白表达部位能特异性示踪 Cre. LacZ 蛋白表达阳性鼠比例也基本符合孟德尔遗传规律, 不同发育阶段的小鼠心脏组织 LacZ 蛋白表达水平正常(图 3a~d). 为阐明 $Tbx18^+$ CPCs 对心脏形成的影响, 组织切片观察 LacZ 蛋白表达. 我们观察到, 在 E15.5 天后胚胎及新生小鼠, LacZ 蛋白均在心脏心房、心室、室间隔、瓣膜、上腔静脉等多处表达, 揭示 $Tbx18^+$ CPCs 参与心房肌、心室肌、室间隔、瓣膜、上腔静脉的形成(图 3e~l).

2.3 $Tbx18$ 向心系细胞分化免疫荧光染色检测

为在细胞水平阐明 $Tbx18^+$ CPCs 向心系细胞分化的能力, 取胚龄 E16.5 至出生 24 h 内新生小鼠心脏, 进行心肌细胞培养及免疫荧光染色. cTNT 是心肌细胞特异性标记, 免疫荧光结果显示

$Tbx18^+$ CPCs 可分化为 cTNT 阳性细胞, 说明其能在体内分化为具有心肌细胞表型的细胞(图 4a~c). 平滑肌肌球蛋白重链抗体 MYH11 是心脏血管平滑肌细胞的特异性标记, 来源于 $Tbx18^+$ CPCs 的 EYFP 阳性细胞, 其平滑肌肌球蛋白重链抗体 MYH11 阳性, 揭示其具有向血管平滑肌细胞分化的潜能(图 4d~f). 血管内皮细胞钙黏蛋白 (VE-cadherin) 是心脏组织内皮细胞的标记之一, 但我们没有观察到 EYFP 阳性细胞具有 VE-cadherin 阳性的特征, 揭示 $Tbx18^+$ CPCs 可能不具备向心脏组织内皮细胞分化的潜能(图 4g~j). 我们在组织水平观察成年 $Tbx18$ -Cre/Rosa26-EYFP 双杂合小鼠心脏组织的表型. 组织免疫荧光染色揭示, 在 cTNT 阳性心肌组织中部分 EYFP 表达阳性, 说明这些心肌组织由 $Tbx18^+$ CPCs 分化形成. 但是, 我们也观察到心脏一些部位的内膜完全没有 EYFP 的表达, 说明心肌内膜的形成可能没有 $Tbx18$ 的信号调控(图 4k~m).

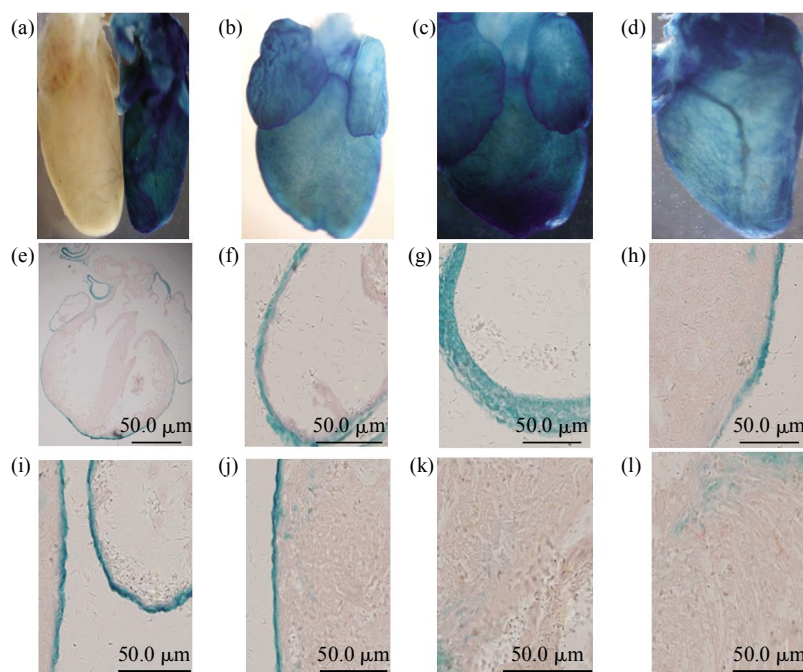


Fig. 3 X-gal staining of Tbx18 lineage-traced heart

(a), (b), (c), (d) Corresponding to Tbx18 lineage-traced heart at neonatal (X2.5), E15.5(X3), E18(X3), neonatal(X3) with whole-mount X-gal staining. (e), (f), (g), (h), (i), (j), (k), (l) Corresponding to whole-mount, left/right atrium, superior vena cava, left/right ventricle, left/right atrium, left/right ventricle, ventricular septum-A, ventricular septum-B of Tbx18 lineage-traced heart at E18 by X-gal staining on sections. LacZ expression in Tbx18-Cre/Rosa26-LacZ mice heart revealed that atria, ventricular septum, ventricular wall, coronary vascular can be generated from Tbx18 lineages.

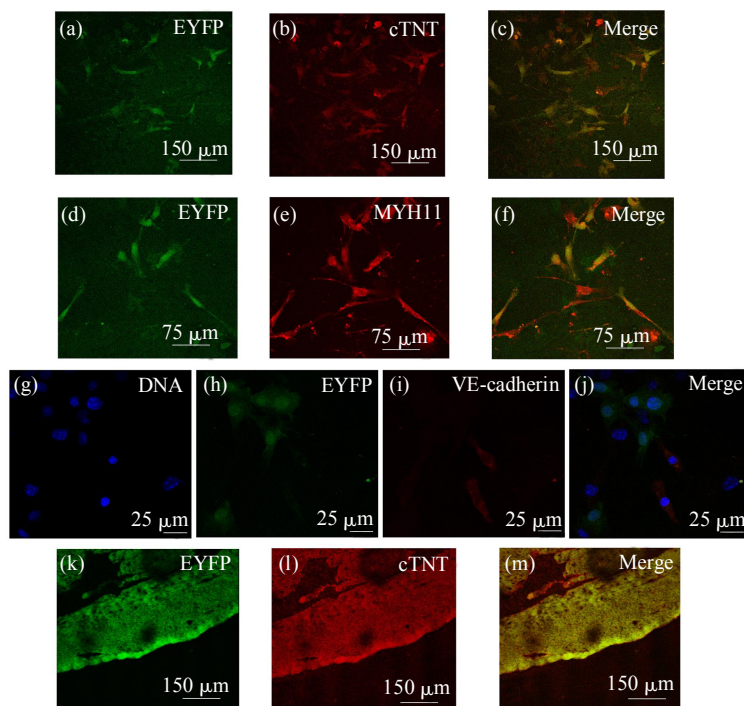


Fig. 4 Immunofluorescence in Tbx18 lineage-traced cells

(a, d, h, k) EYFP⁺ cells and tissues demonstrating they are Tbx18 descendants(Tbx18-lineage-traced cells or tissues). (a~c) Isolated Tbx18-derived cells differentiated into cardiomyocytes (Immunostaining with cTNT antibodies). (d~f) Smooth muscle cells (Immunostaining with myosin heavy chain11 antibodies, MYH11). cTNT as cardiac markers in cells or tissues. cTNT⁺ cells and tissues demonstrating they are cardiomyocytes. MYH11 as a marker of smooth muscle cells, Tbx18-derived EYFP⁺ cells is co-localized with MYH11 demonstrating they are vascular smooth muscle cells. (g~j) VE-cadherin as a specific marker of vascular endothelial cells, Tbx18-derived EYFP⁺ cells is not co-localized with VE-cadherin demonstrating Tbx18-derived cells can not differentiate into VE-cadherin positive cells (Immunostaining with VE-cadherin antibodies). (k~m) Tbx18 lineage-traced heart sections is co-localized with cTNT at adult demonstrating Tbx18-derived EYFP⁺ tissues are heart tissues.

3 讨 论

目前已发现有多种 CPCs, 主要有 3 类: Isl-1/*Nkx2.5*⁺ 第一区 CPCs、Isl-1⁺ 第二区 CPCs 以及 Wt-1⁺ 心外膜祖细胞 (epicardial progenitor cells, EPCs)^[1]. 其中 *Nkx2.5*⁺ 第一区 CPCs 目前成分复杂, 很难获得纯化细胞^[1], Isl-1⁺ 第二区 CPCs 是目前研究最多的 CPCs, 具有定向分化为心系细胞的潜能^[1-2]. T-box(Tbx)基因编码一个调节多种发育阶段的转录因子家族, 如 Tbx3、Tbx5、Tbx18、Tbx20 等亚型对心脏的发育形成起重要作用^[4-6, 9-10]. 在研究斑马鱼心脏再生的过程中, 发现其与再次激活 Tbx18 的表达有关^[11-12]. Evans 等的研究表明^[5], Tbx18⁺ 细胞在胚胎早期是位于心脏非心肌组织, 主要位于心外膜, 之后 Tbx18⁺ 细胞从心外膜迁徙分化为心肌细胞, 故称其为心外膜祖细胞, 但是, Christoffels 等^[6]对 Tbx18⁺ 心外膜祖细胞存在质疑, 所以我们认为将该组细胞称为 Tbx18⁺CPCs 可能更为准确些.

如何在体外定向诱导分化、分离出纯化的心肌细胞, 一直是科学界探索的难点课题. Narazaki 等^[13]创立了直接系统性体外诱导分化、分离心肌细胞的方法, 成功地从 iPS 细胞中诱导分化、分离出心肌细胞, 但是该方法是用流式细胞分选系统 (FACS) 直接分离以 Flk1 为标记的细胞群, 而目前已知的 CPCs 标志物如 Isl1、Wt1 等转录因子, 均无法直接通过 FACS 分离. Moretti 等^[14]利用条件性

基因敲入小鼠结合报告系统工具鼠将 iPS 细胞体外诱导分化、分离出 Isl1⁺ CPCs, 并证实其可体外定向分化为心肌细胞, 并且无畸胎瘤的形成. 在体内示踪或者体外分离出以转录因子 Tbx18 为标记的细胞群, 存在一定技术难度. 借助多重条件性基因敲入技术, 我们成功地建立 Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 和 Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ 两种 Tbx18 谱系示踪小鼠模型, 图 5 简要介绍其设计原理. 通过基因和蛋白质表达分析, 验证该模型在组织水平能特异性地示踪 Tbx18 的命运, 而 Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP 模型还可以在体外分离出纯化的 Tbx18 阳性及其分化细胞, 这对更深入研究其功能、阐明其机制, 具有非常重要的价值. 为进一步阐明 Tbx18 的分化潜能, 通过检测 LacZ 蛋白的表达, 表明 Tbx18 对心房肌、心室肌、室间隔、瓣膜、上腔静脉的形成起非常重要的作用. 通过荧光双标法, 我们也在组织和细胞水平验证 Tbx18 CPCs 向心肌细胞和血管平滑肌细胞分化的能力. ISL1CPCs 具有向心室肌细胞、平滑肌细胞和心血管内皮细胞等三系心脏中主要类型的细胞分化的能力^[2, 15]. 但是, 在我们的研究中没有观察到 Tbx18 CPCs 向内皮细胞系统分化的能力, 在成年小鼠多处心肌组织中, 内膜完全没有 Tbx18 分化细胞的表达 (图 4m). 我们推测, 哺乳动物的心脏组织内膜可能受两个完全不同的祖细胞信号的调控, 而 Tbx18 CPCs 可能在其向肌源性分化的过程中扮演重要角色, 因此, 需更加深入的研究来揭示其机制.

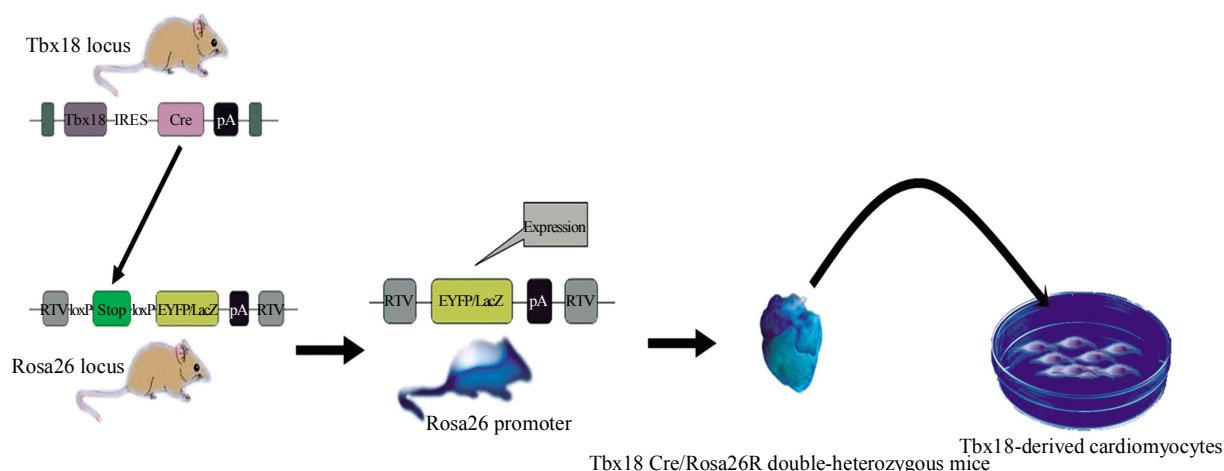


Fig. 5 Tbx18 genetic fate-mapping model: Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP and Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ double-heterozygous mice^[5, 14]

相对心脏祖细胞其他转录因子标记 Wt1、Isl-1、*Nkx2.5*, Tbx18 为标记的心脏祖细胞对心脏发育过

程的影响及其再生潜能还不明确. Tbx18-Cre/Rosa26R 双重杂合小鼠模型的建立, 在体内示踪

Tbx18⁺ 心脏祖细胞分化命运, 初步揭示 Tbx18⁺ 心脏祖细胞向肌源性细胞分化的潜能. 这为更好地建立体内和体外示踪心脏疾病模型、药物开发、治疗性细胞自体移植, 乃至阐明相关先天性心脏病及获得性心脏疾病的发病机理具有重要意义.

参 考 文 献

- [1] Chien K R, Domian I J, Parker K K. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science*, 2008, **322**(5907): 1494-1497
- [2] Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, *et al.* Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature*, 2009, **460**(7251): 113-117
- [3] Domian I J, Chiravuri M, van der Meer P, *et al.* Generation of functional ventricular heart muscle from mouse ventricular progenitor cells. *Science*, 2009, **326**(5951): 426-429
- [4] 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
- [5] Cai C L, Martin J C, Sun Y, *et al.* A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature*, 2008, **454**(7200): 104-108
- [6] Christoffels V M, Grieskamp T, Norden J, *et al.* Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature*, 2009, **458**(7240): E8-9
- [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 reporter strain. *Nature Genet*, 1999, **21**(1): 70-71
- [9] Liu J, Stainier D Y. Tbx5 and Bmp signaling are essential for proepicardium specification in zebrafish. *Circ Res*, 2010, **106**(12): 1818-1828
- [10] 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
- [11] Lepilina A, Coon A N, Kikuchi K, *et al.* A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 2006, **127**(3): 607-619
- [12] Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech Dev*, 2001, **100**(1): 83-86
- [13] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, *et al.* Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 2008, **118**(5): 498-506
- [14] Moretti A, Bellin M, Jung C B, *et al.* Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1⁺ cardiovascular progenitors. *FASEB J*, 2010, **24**(3): 700-711
- [15] Moretti A, Caron L, Nakano A, *et al.* Multipotent embryonic Isl1⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell*, 2006, **127**(6): 1151-1165

Genetic Fate Mapping Reveals The Differentiation Potential of Tbx18⁺ Cardiac Progenitors Into Cardiomyocyte Lineages in The Mouse Heart*

DU Jian-Lin**, ZHANG Jin**, PU Di, GAO Er-Zhi, YANG Jing-Tao,

GAO Ling-Zhi, XIA Shuang, DENG Song-Bai, SHE Qiang***

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract The study of cardiac progenitor cells (CPCs) is important for understanding the pathogenesis of congenital heart diseases and treating cardiovascular diseases. The mammalian heart is derived from distinct sets of CPCs. T-box transcription factor Tbx18 is expressed in the developing epicardium of the heart and play key roles in heart developing. In order to monitor and elucidate the differentiation potential of Tbx18⁺ CPCs in tissues and living cells, Tbx18 genetic fate-mapping model, Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP and Tbx18-Cre/Rosa26R-LacZ double-heterozygous mice, were founded by Cre-LoxP system. These double-heterozygous mice were useful in monitoring the fate of Tbx18⁺ cells by Cre expression, and tracing the lineage of the cells in embryos and adult mice. YFP⁺ cells can be easily isolated from heart of Tbx18-Cre/Rosa26R-EYFP double-heterozygous mice by fluorescence activated cell sorter(FACS) and be monitored under an inverted confocal microscope. X-gal staining of genetic fate-mapping model revealed that atria, ventricular septum, ventricular wall, coronary vascular and atrioventricular valves can be generated from Tbx18 lineages. Here it was showed that Tbx18⁺ CPCs can differentiate into antiscardiac troponin T(cTNT) positive cardiomyocytes and anti-smooth muscle myosin heavy chain11 positive smooth muscle cells *in vivo* by immunofluorescence. The heart is a complex organ composed of a diverse set of muscle and non-muscle cells. It was speculated that Tbx18 may play an important role in regulating the signal pathway of progenitor cells differentiating into myogenic cell lineages. These results identify Tbx18 as a marker of cardiac progenitors cells by Tbx18 genetic fate mapping mice, and lay the foundation for researching the differentiation potential of cardiac progenitors into cardiomyocyte lineages in the field of cardiac regeneration and repair.

Key words T-box transcription factor Tbx18, cardiac progenitor cells, genetic fate-mapping, cardiomyocytes

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00616

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30971213), The Important Project of Chongqing Health Administration (2009-1-13) and The 2010 Key Projects of Chongqing Medical University Foundation (XBZD.201010).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-23-63693752, E-mail: qshe98@hotmail.com

Received: November 27, 2010 Accepted: January 12, 2011