

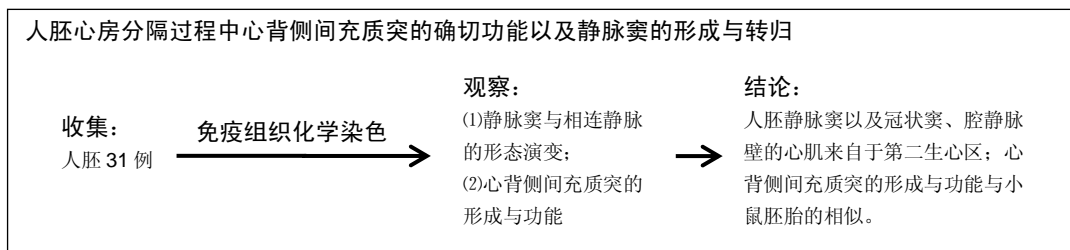
人胚静脉窦与心背侧间充质突的形成与重塑

杨艳萍, 李海荣, 曹锡梅, 景雅, 崔慧林, 张涛(山西医科大学组织胚胎学教研室, 山西省太原市 030001)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0293

ORCID: 0000-0003-4134-4427(杨艳萍)

文章快速阅读:



杨艳萍, 女, 1976 年生, 汉族, 山西省稷山县人, 2009 年山西医科大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事胚胎心脏发育的研究。

通讯作者: 景雅, 博士, 教授, 山西医科大学组织胚胎学教研室, 山西省太原市 030001

中图分类号:R318

文献标识码:A

稿件接受: 2018-04-11



文题释义:

心背侧间充质突(dorsal mesenchymal protrusion, DMP): 是前肠腹侧与心背系膜之间的间充质细胞向心房背侧壁迁移形成的楔状突起。研究显示有的房室隔缺损病例房室管心内膜垫、原发隔形态正常, 而心背侧间充质突体积较小, 导致心原发孔不能正常闭合。由此说明在小鼠胚胎、人胚, DMP 对心房分隔具有重要作用。

第二生心区(second heart field, SHF): 分布于前肠腹侧间充质、心包腔背侧壁的脏壁中胚层等部位, 其作用在于参与形成心房大部、右心室和流出道心肌、主、肺动脉壁的部分平滑肌等, 其发育异常可导致永存动脉干等先天性心脏畸形的发生。

摘要

背景: 有关人胚心脏静脉窦的形成与重塑以及心背侧间充质突的功能尚存在争议。

目的: 探讨人胚心房分隔过程中心背侧间充质突的确切功能以及静脉窦的形成与转归。

方法: 收集的人胚胎立即固定 24 h 后, 体视显微镜下依据 Carnegie 分期法进行分期, 分为 Carnegie stage 10(CS10)-CS17。对人胚心脏切片进行免疫组织化学染色。

结果与结论: ①CS10-CS12, 胚胎原始咽腹侧间充质与心包背侧壁的 isl1 阳性细胞延续至静脉窦壁参与其心肌形成; ②自 CS13 始, 冠状窦和腔静脉壁开始表达 isl1, 并逐渐有心肌细胞形成。同时, isl1 阳性细胞参与心背侧间充质突形成; ③CS15, 心背侧间充质突参与心房分隔并逐渐心肌化; ④结果表明, 人胚静脉窦以及冠状窦、腔静脉壁的心肌来自于第二生心区的 isl1 阳性细胞的分化; 人胚心背侧间充质突的形成与功能与小鼠胚胎的相似。

关键词:

静脉窦; 心背侧间充质突; 人胚心脏; 免疫组织化学; 组织构建

主题词:

腔静脉; 冠状窦; 间质细胞; 免疫组织化学; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(31200899)

Formation and remodeling of the sinus venosus and the dorsal mesenchymal protrusion in human embryo

Yang Yan-ping, Li Hai-rong, Cao Xi-mei, Jing Ya, Cui Hui-lin, Zhang Tao (Department of Histology and Embryology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Formation and remodeling of sinus venosus and the function of the dorsal mesenchymal protrusion (DMP) in human embryonic heart remain controversial.

OBJECTIVE: To explore the function of DMP and the sinus venosus development in the process of human embryo atrial separation.

METHODS: The human embryos were fixed for 24 hours immediately after harvesting, followed by staged based on Carnegie stage (CS10-CS17) under stereo microscope. Serial sections of human embryos were stained immunohistochemically.

RESULTS AND CONCLUSION: During CS10-CS12, the isl1 positive cells of the pharyngeal ventral mesenchyme and the dorsal pericardial wall extended to the sinus venosus wall to contribute to myocardium formation. From CS13, isl1 began to express in the coronary sinus and the caval vein wall and these blood vessels began to be myocardialized. Meanwhile, the isl1 positive cells participated in the formation of DMP.

Yang Yan-ping, M.D., Associate professor, Department of Histology and Embryology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: Jing Ya, Ph.D., Professor, Department of Histology and Embryology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

At CS15, the DMP contributed to the atrial separation and was myocardialized gradually. These data suggest that in human embryo, the sinus venosus is formed and the myocardium of the venous tributaries is derived from the *Isl1* positive cells of second heart field. The formation and function of the DMP in human embryo are similar to those of the mouse embryo.

Subject headings: Venae Cavae; Coronary Sinus; Stromal Cells; Immunohistochemistry; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31200899

0 引言 Introduction

部分先天性心脏畸形例如肺静脉连接异常、心房分隔异常等均由于胚胎心脏静脉端异常发育所导致,因此,大量研究侧重于探讨心脏静脉端的发育。已知随发育,胚胎原始心房将分隔为左、右两部分。现有研究证实小鼠胚胎心背侧间充质突(dorsal mesenchymal protrusion, DMP)对心房分隔至关重要。心背侧间充质突发育缺陷将导致心房分隔缺损^[1-2]。但人胚心背侧间充质突是否有相似功能尚有待阐明。因此,该研究将观察人胚心背侧间充质突的形成、功能及其肌化过程。伴随心房分隔,胚胎发育早期的静脉窦也进行重塑,静脉窦最初由窦房结、双侧静脉瓣的静脉面和左、右静脉窦角组成^[3-4],经过复杂的形态演变,腔静脉、冠状窦和肺静脉形成并分别通入右、左心房^[5-6]。目前,有关静脉窦的发育过程仍存在争议:首先是静脉窦这一结构是否形成;其次,来自静脉窦角的腔静脉和冠状窦的心肌的来源^[7]。有研究证实腔静脉心肌来自第二生心区(second heart field, SHF)^[7],但基因追踪实验和染料标记实验揭示腔静脉心肌来自于第三生心区^[8-9];此外,肺静脉发育也是研究焦点之一,包括肺静脉的初始位置及其心肌来源。因此,该研究对静脉窦的重塑与腔静脉、冠状窦和肺静脉心肌形成进行系统观察,为探讨心脏静脉端相关畸形的发生原因提供形态学依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2015年9月至2017年6月在山西医科大学组胚教研室完成。

1.3 材料

胚胎: 于山西省太原市中心医院、山西省妇幼保健院妇产科收集药流后胚胎共31例(该研究经山西医科大学医学伦理委员会批准)。

实验用试剂及仪器: 兔抗胰岛素增强子结合蛋白1抗体(*Isl1*, Developmental Studies Hybridoma Bank, USA)、小鼠抗肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)抗体(A4.1025, upstate, USA)、小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(Sigma, USA)、兔抗GATA4 抗体(博士德生物技术有限公司,武汉,中国)、兔抗小鼠IgG及羊抗兔IgG(Lamers WH教授赠送)、兔过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物(Nordic)。电热恒温培养箱(上海智城)、全自动扫描显微镜及照相系统(日本奥林巴斯)。

1.4 实验方法

1.4.1 标本制备 收集的胚胎立即固定(固定液:甲醇:丙酮:水=2:2:1)24 h后,体视显微镜下依据Carnegie分期

法进行分期^[10],分为Carnegie stage 10(CS10)-CS17。经梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋,制作7 μ m连续石蜡切片。

1.4.2 免疫组织化学染色 胚胎心脏切片浸入体积分数3% H_2O_2 溶液预处理, TENG-T(150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA, 0.25% gelatin, 0.05% Tween-20, pH 8.0)封闭40 min后,分别用下列一抗室温下孵育过夜:兔抗胰岛素增强子结合蛋白1抗体(1:100)、小鼠抗肌球蛋白重链(MHC, 1:1000)、小鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA, 1:1000, IMM-H2),兔抗GATA4 (1:50)。阴性对照用PBS(pH 7.40)取代一抗。PBS冲洗后,鼠源性一抗孵育后的切片用兔抗小鼠IgG(1:7500),羊抗兔IgG(1:250)分别孵育2 h,兔过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物(1:750)孵育1.5 h;兔源性一抗孵育的切片略去兔抗小鼠IgG孵育步骤。染色后显微镜下观察并摄片。

1.5 主要观察指标 CS10-CS17人胚心脏切片免疫组织化学染色观察。

2 结果 Results

2.1 CS10人胚心脏切片观察结果 人胚心脏已成襻,定位于原始心房和左心室之间的房室管内尚无心内膜垫形成(图1A)。胚胎心脏静脉端由原始心房和静脉窦组成。二者背侧壁均可见心背系膜折返为心包腔背侧壁(图1B)。此期心背系膜由立方上皮和内皮组成,双侧对称(图1C)。而心包腔背侧壁与原始咽之间缺乏间充质细胞分布(图1C,星号)。Isl1表达见于心包腔背侧壁以及与其相连的心背系膜和静脉窦背侧壁,尤其是静脉窦右角, *Isl1*表达由其背侧壁延续至腹侧壁(图1B, C, 箭头),该部位用于标记早期分化心肌细胞的 α -SMA和GATA4以及标记已分化心肌细胞的MHC染色较弱(图1D-F, 箭头)。提示静脉窦壁开始有心肌形成。

2.2 CS11-CS12人胚心脏切片观察结果 心房与静脉窦向外扩张,但原始心房尚未分隔(图2A)。房室内开始能观察到心内膜垫(图2B)。此期心包腔背侧壁及其相连的心背系膜和静脉窦壁仍可见*Isl1*的连续表达(图2C,粗、细箭头),此外,咽腹侧开始散在分布有*Isl1*阳性细胞(图2C,星号)。 α -SMA、GATA4和MHC在静脉窦背侧壁尚未表达(图2D-F, 箭头),但在其与心房相延续处,3种抗体均呈阳性(图2D-F,粗箭头)。提示静脉窦大部尚未心肌化。值得注意的是,在CS11,静脉窦已定位于原始心房的右侧(图2G),它与心房在外表面的皱褶明显可见,可作为二者的分界标志(图2B,粗箭头)。两侧总主静脉分别通入相应的静脉窦(图2H, I)。GATA4表达可见于左侧总主静脉近端(图2J,

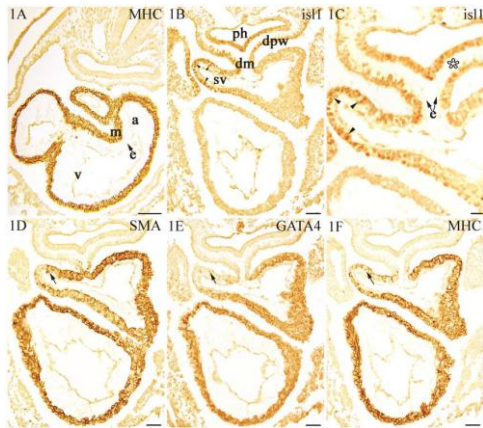


图1 人胚CS10的原始心房与静脉窦
Figure 1 Primitive atrium and sinus venosus in human embryo at CS10

图注: A, F 示 MHC; B, C 示 isI1; D, E 分别示 α -SMA、GATA4 免疫组织化学染色; C 为 B 的局部放大; A 标尺=100 μ m; B, D-F 标尺=50 μ m; C 标尺=20 μ m。提示静脉窦壁开始有心肌形成。图中缩写: m, 心肌; a, 心房; v, 心室; e, 内皮; ph, 原始咽; dpw, 心包腔背侧壁; dm, 心背系膜; sv, 静脉窦; avc, 房室管内膜垫; rccv, 右总主静脉; lccv, 左总主静脉; pas, 原发隔; vv, 静脉瓣; rscv, 右上腔静脉; lscv, 左上腔静脉; lb, 肺芽; cs, 冠状窦; la, 左心房; ra, 右心房; dmp, 心背侧间充质突; pv, 肺静脉; icv, 下腔静脉; lvv, 左静脉瓣; rvv, 右静脉瓣; t, 气管。

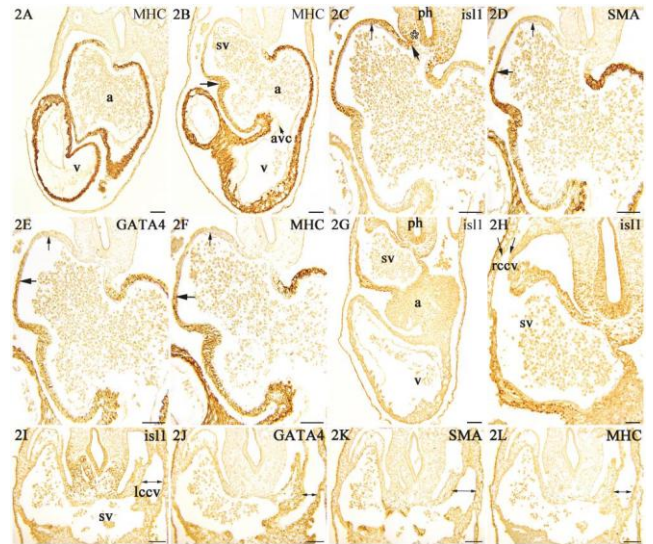


图2 人胚CS11的原始心房与静脉窦
Figure 2 Primitive atrium and sinus venosus in human embryo at CS11

图注: A, B, F, L 示 MHC; C, G-I 示 isI1; D, K 示 α -SMA; E, J 示 GATA4 免疫组织化学染色; F, H 分别为 B, G 的局部放大; A-G, I-L 标尺=100 μ m; H 标尺=50 μ m。提示静脉窦壁尚未肌性化。图中缩写同图1。

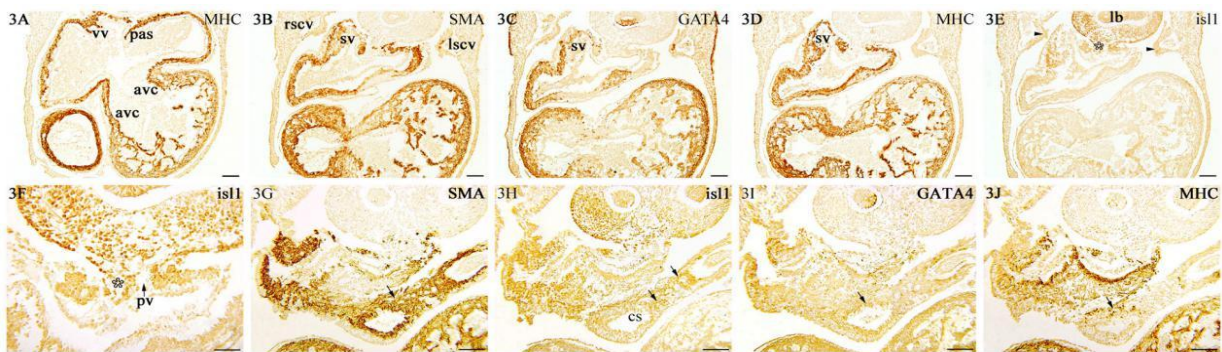


图3 人胚CS13、正在分隔的原始心房与静脉窦
Figure 3 The separated atrium and sinus venosus in human embryo at CS13

图注: A, D, J 示 MHC; B, G 示 α -SMA; C, I 示 GATA4; E, F, H 示 isI1 免疫组织化学染色; F 为 E 的局部放大; A-E, G-J 标尺=100 μ m; F 标尺=50 μ m。原发隔的形成提示原始心房分隔的开始。图中缩写同图1。

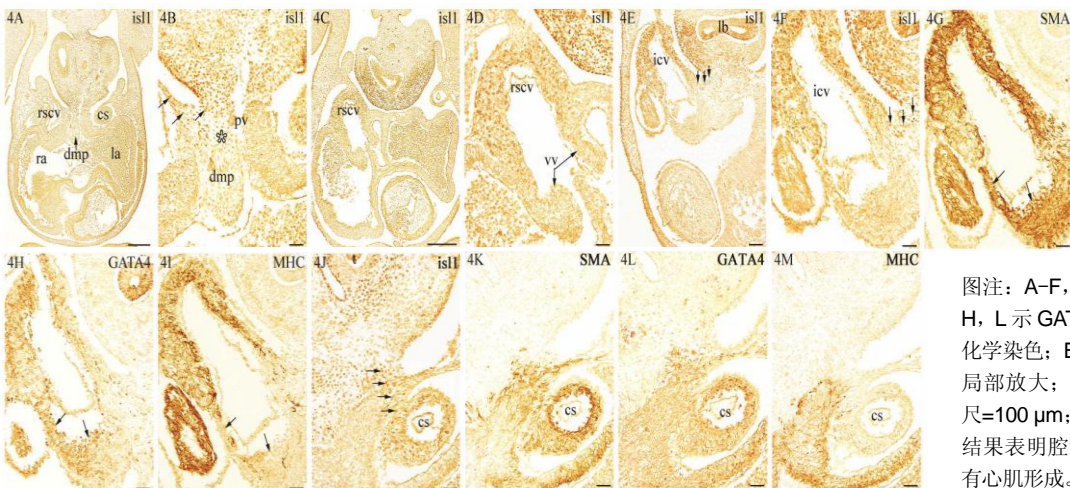


图4 人胚CS14的心房与静脉
Figure 4 Atrium and venous tributaries in human embryo at CS14

图注: A-F, J 示 isI1; G, K 示 α -SMA; H, L 示 GATA4; I, M 示 MHC 免疫组织化学染色; B, D, F 分别为 A, C, E 的局部放大; A, C 标尺=500 μ m; E 标尺=100 μ m; B, D, F-M 标尺=50 μ m。结果表明腔静脉和冠状窦壁在此期开始有心肌形成。图中缩写同图1。

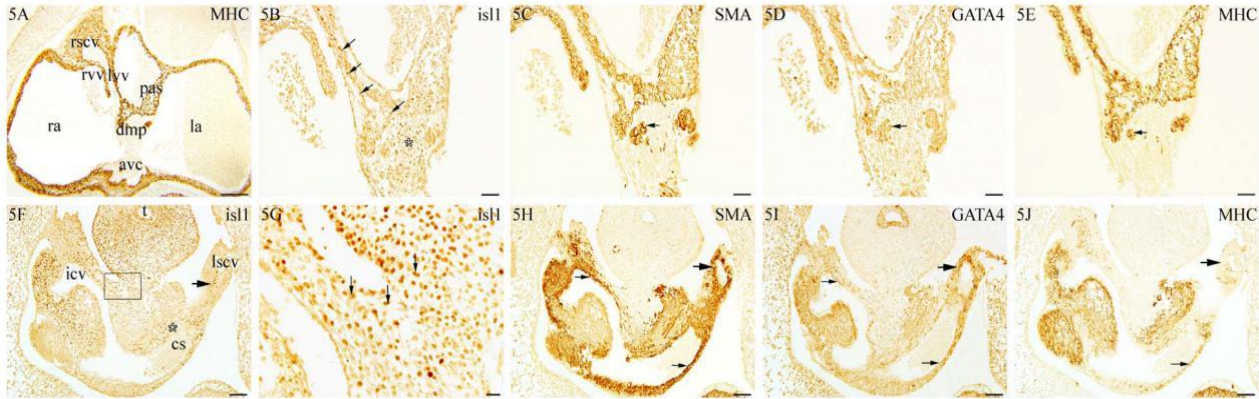


图5 人胚CS15的心背侧间充质突与静脉

Figure 5 Dorsal mesenchymal protrusion and venous tributaries in human embryo at CS15

图注: A, E, J 示 MHC; B, F, G 示 isI1; C, H 示 α -SMA; D, I 示 GATA4 免疫组织化学染色; E, G 分别为 A, F 的局部放大; A 标尺示 200 μ m; F, H-J 标尺=100 μ m; B-E 标尺=50 μ m; G 标尺=20 μ m。心背侧间充质突位于原发隔和房室管心内膜垫之间并与二者融合以封闭原发孔。图中缩写同图1。

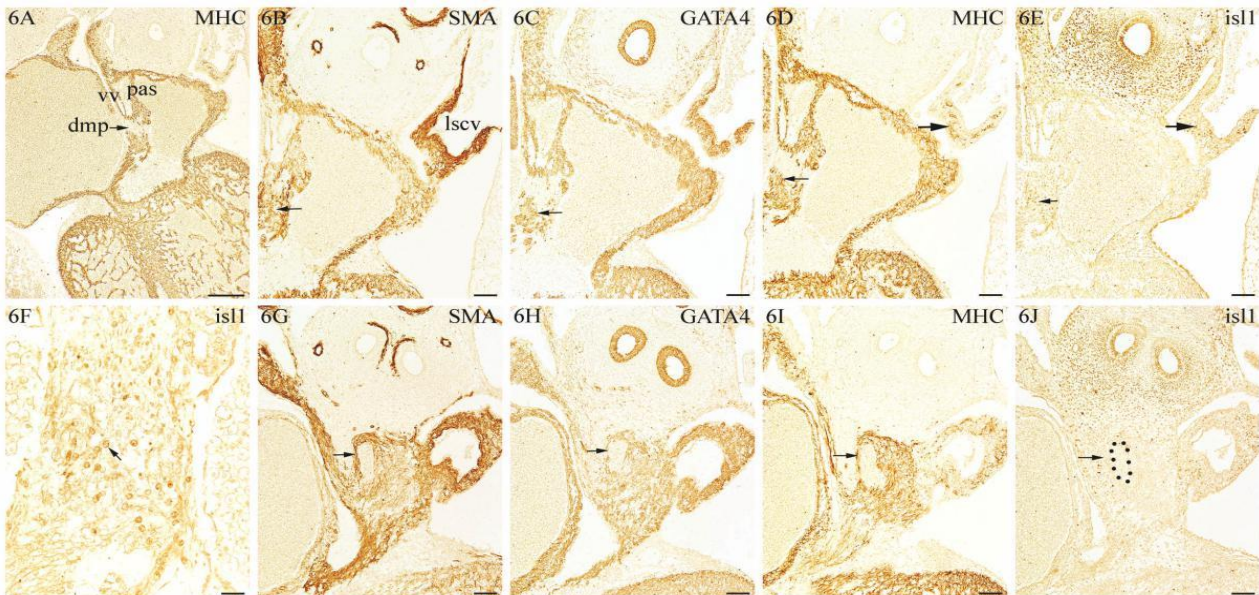


图6 人胚CS17的心背侧间充质突与静脉

Figure 6 Dorsal mesenchymal protrusion and venous tributaries in human embryo at CS17

图注: A, D, I 示 MHC; B, G 示 α -SMA; C, H 示 GATA4; E, F, J 示 isI1 免疫组织化学染色; D, F 分别为 A, E 的局部放大; A 标尺=500 μ m; B-E, G-J 标尺=100 μ m; F 标尺=50 μ m。肺静脉壁开始表达 α -SMA、GATA4 或 MHC 提示其肌性化的启动。图中缩写同图1。

箭头), 而静脉壁大部仍由内皮组成, 缺乏 isI1、 α -SMA 和 MHC 的表达(图2H, I, K, L, 箭头), 提示静脉壁尚未肌性化。

2.3 CS13人胚心脏切片观察结果 原发隔的形成提示原始心房分隔的开始。双侧房室管心内膜垫增大, 但未融合(图3A)。与CS11、CS12相比, 静脉窦壁 α -SMA、GATA4和MHC表达上调(图3B-D), 提示此期该结构的心肌化。在肺芽腹侧的间充质内仍有 isI1 阳性细胞延伸入心背系膜(图3E, F, 星号)。而该部位肺静脉的形成使 isI1 阳性细胞分布变得左右不对称(图3F)。此期, 源于左静脉窦角的冠状窦已通入右心房, 其管壁 α -SMA表达明显, 而 isI1、GATA4、MHC呈散在表达(图3G-J, 箭头)。源于总主静脉的上腔静

脉则缺乏 isI1 和 α -SMA 表达(图3B, E)。

2.4 CS14人胚心脏切片观察结果 心背系膜内的肺静脉更加明显可辨, 并直接通入左心房(图4A, B)。肺静脉右侧可见较多 isI1 阳性细胞形成心背侧间充质突(图4B, 星号), 而其左侧几乎观察不到间充质(图4B)。同时, 肺芽腹侧间充质内的 isI1 阳性细胞经心背系膜延续至右上腔静脉和右下腔静脉壁根部(图4B, E, F, 箭头), 因此, 腔静脉壁有大量 isI1 阳性细胞分布(图4C-F), 也广泛表达 α -SMA、GATA4, 而 MHC 在局部管壁尚未表达(图4G-I, 箭头)。此期静脉瓣未见 isI1 的表达(图4C, D)。冠状窦的表达模式与腔静脉相似(图4J-M)。这些结果表明腔静脉和冠状窦壁在此期开始有心肌形成。

2.5 CS15至CS16人胚心脏切片观察结果 心背侧间充质突位于原发隔和房室管心内膜垫之间并与二者融合以封闭原发孔。两侧腔静脉瓣增长, 左侧瓣与心背侧间充质突相连(图5A, B)。此期左侧腔静脉瓣内可见*isl1*阳性细胞并与心背侧间充质突内的阳性细胞相连续(图5B, 箭头)。相邻切片染色显示心背侧间充质突内 α -SMA、GATA4和MHC散在表达(图5C-E, 箭头)揭示心肌细胞分化的开始。肺静脉内皮邻近处可观察到少量*isl1*阳性细胞, 但 α -SMA、GATA4和MHC的表达呈阴性提示该部位尚无心肌细胞形成(data not shown)。自CS15始, 心房水平的心背系膜已消失, 该结构仅存在于气管腹侧间充质与腔静脉和冠状窦之间。而气管腹侧的*isl1*阳性细胞仍经心背系膜延续至静脉壁(图5F, G)。静脉壁 α -SMA、GATA4的表达与CS14相似(图5H, I, 箭头), 而MHC在冠状窦的表达上调(图5J, 箭头)。左上腔静脉与冠状窦相连, 但与心背系膜缺乏联系, 其管壁内含少量*isl1*阳性细胞, 表达 α -SMA、GATA4, 而MHC呈阴性(图5F, H-J, 粗箭头), 说明该静脉壁尚无成熟心肌细胞形成。

2.6 CS17人胚心脏切片观察结果 心背侧间充质突内 α -SMA、GATA4或MHC阳性细胞数量增加说明心背侧间充质突大部肌性化(图6A-D, 箭头), 同时仍可观察到*isl1*的表达(图6E, F, 箭头)。肺静脉壁开始表达 α -SMA、GATA4或MHC提示其肌性化的启动(图6G-I, 箭头), 而*isl1*表达转为阴性(图6J, 箭头)。此期, 左上腔静脉壁MHC表达变得明显(图6D, 粗箭头), 同时仍可见*isl1*阳性细胞的分布(图6E, 粗箭头)。

3 讨论 Discussion

3.1 人胚静脉窦的形成与演变 静脉窦是胚胎心脏的一过性结构, 有学者指出在静脉窦存在于低等脊椎动物如鱼类, 而哺乳类动物缺乏此结构的形成^[11]。另有研究认为小鼠胚胎无静脉窦, 但人胚可见其形成^[12]。因此, 现有研究对此结构是否确实形成仍存在争议。该研究观察到在人胚CS10, 静脉窦确实形成于原始心房的尾端。自此期始, 咽腹侧和心包腔背侧壁的*isl1*阳性细胞经心背系膜延续至静脉窦壁。大量研究选用*isl1*作为第二生心区的标记物, 而咽腹侧间充质和心包腔背侧壁是第二生心区的构成部分^[13-14], 因此此次结果说明静脉窦壁分布有第二生心区前体细胞。静脉窦壁同时表达心肌细胞的标记物 α -SMA、GATA4和MHC, 说明第二生心区来源的细胞在静脉窦壁分化为心肌细胞, 即人胚静脉窦心肌细胞来源于第二生心区。在静脉窦肌性化的同时, 其形态进行了重塑。有研究指出人胚CS14, 静脉窦右移, 此次实验观察到早在CS11, 该结构已定位于胚体中线的右侧。CS13, 静脉窦右角并入右心房, 静脉窦左角根部则形成冠状窦。

此次实验观察到右上腔静脉与下腔静脉通入右心房, 左上腔静脉通入冠状窦。胚胎发育早期, 这些静脉壁由内

皮及其相邻的间充质组成。CS13以后, α -SMA、GATA4和MHC表达开始出现在于静脉壁, 说明其肌性化的开始。有研究揭示了这些静脉壁心肌的起源与基因表达模式, 证实腔静脉心肌表达*Tbx18*, 但不表达*isl1*^[8-9]; 但另有研究证实该心肌为第二生心区来源^[7]。此次实验结果表明, 右上腔静脉、下腔静脉和冠状窦壁心肌形成过程中, 均可见*isl1*阳性细胞的存在, 这些细胞与第二生心区的*isl1*阳性细胞经心背系膜形成连续细胞带, 左上腔静脉的*isl1*阳性细胞则与冠状窦的阳性细胞保持延续性, 这些形态观察结果充分说明人胚腔静脉与冠状窦的心肌细胞起源于第二生心区, 与小鼠胚胎相似。

3.2 人胚肺静脉的发育 胚胎心脏发育畸形部分表现为静脉连接异常, 如肺静脉通入右心房^[15]。为探讨这些先天畸形的发生机制, 就需阐明胚胎肺静脉的正常发育过程。相关研究的争议在于形成的肺静脉是与静脉窦还是心房相连^[15-16], 以及肺静脉壁心肌的来源^[7, 16-17]。此次实验显示人胚CS14, 肺静脉管腔的出现使该结构明显可辨, 定位于心背系膜内。由于间充质主要分布于肺静脉的右侧, 使此静脉显得偏居心背系膜左侧, 并直接通入左心房。而且此期右静脉窦角已并入右心房, 左静脉窦角根部形成了冠状窦, 所以, 肺静脉与静脉窦并无联系。最初形成的肺静脉内皮邻近部位可观察到*isl1*阳性细胞, 至CS17, 肺静脉壁心肌形成。提示与腔静脉和冠状窦相似, 人胚第二生心区同样是肺静脉心肌的来源, 这与Gittenberger等的结论一致^[18]。

3.3 人胚心背侧间充质突 胚胎心脏静脉端由心房和静脉窦形成。随发育, 原始心房进行内部分隔。近年来基因敲除小鼠研究揭示心背侧间充质突来源于第二生心区, 在心房分隔过程中具有重要作用。心背侧间充质突发育缺陷可导致心房分隔缺损^[1, 3, 19]。但人胚心背侧间充质突的形成与功能有待阐明。此次研究观察了人胚心脏心房的分隔过程, 结果显示心背侧间充质突形成于CS14。心背侧间充质突内分布有*isl1*阳性细胞, 并与气管腹侧的*isl1*阳性细胞保持连续, 说明与小鼠胚胎相似, 人胚心背侧间充质突同样来源于第二生心区。形成的心背侧间充质突位于原发隔和房室管心内膜垫之间并与之融合, 此时心背侧间充质突内尚无心肌细胞。至CS15, 心背侧间充质突内心肌细胞标记物的表达开始出现, 提示第二生心区来源的前体细胞开始分化为心肌细胞。值得注意的是与心背侧间充质突相连的左腔静脉瓣开始分布有*isl1*阳性细胞, 提示可能腔静脉壁*isl1*阳性细胞经此瓣膜向心背侧间充质突内迁移。在人胚CS17, 心背侧间充质突已大部肌化, 但仍可见*isl1*阳性细胞。有研究揭示*isl1*在心脏传导系的表达意义在于保持心肌细胞维持其原始状态^[20], 是否心背侧间充质突内*isl1*的表达具有同样意义尚有待进一步研究。

总之, 实验结果表明人胚静脉窦以及冠状窦、腔静脉壁的心肌来自于第二生心区的*isl1*阳性细胞的分化; 人胚心背侧间充质突的形成与功能与小鼠胚胎的相似。研究揭示

了人胚心脏静脉窦及其相连静脉的正常发育过程、心背侧间充质突的形成及其在心房分隔过程中的作用,为揭示一些先天性心脏畸形例如肺静脉连接异常、心房分隔异常等的发生机制提供了形态学基础。但由于选用的是人胚,标本收集困难,且获得的标本发育时间相对集中,胚龄较小或较大的胚胎数量较少,且取材时间不确定,因此一些实验方法如原位杂交等难以实施,故此研究侧重于形态学描述,未能对发育机制进行深入探究。

致谢: 感谢山西省太原市中心医院、山西省妇幼保健院妇产科医护人员为收集胚胎提供的帮助。

作者贡献: 实验设计为景雅,实验实施为杨艳萍、曹锡梅、李海荣、崔慧林,胚胎收集为张涛。杨艳萍成文,景雅对文章负责。

经费支持: 文章接受了“国家自然科学基金(31200899)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程,没有因其岗位角色影响文章观点和对数据结果的报道,不存在利益冲突。

伦理问题: 实验实施方案获得学校伦理委员会批准。提供胚胎的患病个体自愿参加并完全知情同意。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审,符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Sun C, Yu D, Ye W, et al. The short stature homeobox 2 (Shox2)-bone morphogenetic protein (BMP) pathway regulates dorsal mesenchymal protrusion development and its temporary function as a pacemaker during cardiogenesis. *J Biol Chem*. 2015;290 (4): 2007-2023.
- [2] Zhang KK, Xiang M, Zhou L, et al. Gene network and familial analyses uncover a gene network involving Tbx5/Osr1/Pcsk6 interaction in the second heart field for atrial septation. *Hum Mol Genet*. 2016; 25(6):1140-1151.
- [3] Kelder TP, Vicente-Steijn R, Harryvan TJ, et al. The sinus venosus myocardium contributes to the atrioventricular canal: potential role during atrioventricular node development? *J Cell Mol Med*. 2015;19(6):1375-1389.
- [4] Ammirabile G, Tessari A, Pignataro V, et al. Pitx2 confers left morphological, molecular, and functional identity to the sinus venosus myocardium. *Cardio Res*. 2012;93(2): 291-301.
- [5] Kim JH, Hwang SE, Rodríguez-Vázquez JF, et al. Upper terminal of the inferior vena cava and development of the heart atriums: a study using human embryos. *Anat Cell Biol*. 2014;47(4):236-243.
- [6] Anderson RH, Cook AC. The structure and components of the atrial chambers. *Europace*. 2007;9 (suppl 6), vi3-vi9.
- [7] Lescroart F, Mohun T, Meilhac SM, et al. Lineage tree for the venous pole of the heart: clonal analysis clarifies controversial genealogy based on genetic tracing. *Circ Res*. 2012;111 (10): 1313-1322.
- [8] Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, 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.
- [9] Mommersteeg MT, Dominguez JN, Wiese C, et al. The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development. *Cardiovasc Res*. 2010;87 (1): 92-101.
- [10] O'Rahilly R, Müller F. *Developmental Stages in Human Embryos*[M]. Washington, DC: Carnegie Institution of Washington Publication. 1987.
- [11] Soufan AT, van den Hoff MJB, Ruijter JM, et al. Reconstruction of the patterns of gene expression in the developing mouse heart reveals an architectural arrangement that facilitates the understanding of atrial malformations and arrhythmias. *Circ Res*. 2004;95(12):1207-1215.
- [12] Sizarov A, Anderson RH, Christoffels VM, et al. Three-Dimensional and molecular analysis of the venous pole of the developing human heart. *Circulation*. 2010;122(8): 798-807.
- [13] Witzel HR, Cheedipudi S, Gao R, et al. Isl2b regulates anterior second heart field development in zebrafish. *Sci Rep*. 2017;7: 41043.
- [14] Yuan XJ, Qi H, Li X, et al. Disruption of spatiotemporal hypoxic signaling causes congenital heart disease in mice. *J Clin Invest*. 2017;127 (6):2235-2248.
- [15] van den Berg G, Moorman AFM. Development of the pulmonary vein and the systemic venous sinus: an interactive 3D overview. *PLoS One*. 2011;6(7):e22055.
- [16] Jongbloed MR, Mahtab EA, Blom NA, et al. Development of the cardiac conduction system and the possible relation to predilection sites of arrhythmogenesis. *Scientific World J*. 2008;8:239-269.
- [17] Ye W, Wang J, Song Y, et al. A common Shox2-Nkx2-5 antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Development*. 2015;142(14): 2521-2532.
- [18] Gittenberger-de Groot AC, Mahtab EA, Hahurij ND, et al. Nkx2.5-negative myocardium of the posterior heart field and its correlation with podoplanin expression in cells from the developing cardiac pacemaking and conduction system. *Anat Rec*. 2007;290 (1):115-122.
- [19] Burns T, Yang Y, Hiriart E, et al. The dorsal mesenchymal protrusion and the pathogenesis of atrioventricular septal defects. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2016;3:29.
- [20] Kelder TP, Vicente-Steijn R, Harryvan TJ, et al. The sinus venosus myocardium contributes to the atrioventricular canal: potential role during atrioventricular node development? *J Cell Mol Med*. 2015;19 (6):1375-1389.