

网络出版时间:2018-02-26 08:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.06.003

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20180226.0846.006.html>

IRX3 基因在秦川牛不同组织中的表达分析

宁 越¹, 吴 森¹, 张 乐¹, 咎林森^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 国家肉牛改良中心, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】【目的】研究 *IRX3*(Iroquois homeobox 3) 基因在秦川牛各组织中的表达规律, 为通过现代分子技术手段改良秦川牛肉用性状提供理论依据。【方法】根据秦川牛 *IRX3* 的 mRNA 序列设计实时定量特异性引物, 采用实时荧光定量 PCR 方法, 检测 *IRX3* 基因在秦川牛不同生长发育阶段(胎儿、6 月龄、24 月龄)不同组织(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、大肠、小肠、肌肉(背最长肌))及在 6 月龄、18 月龄、24 月龄、60 月龄秦川牛脂肪组织中的表达水平。【结果】*IRX3* 基因在秦川牛胎牛、6 月龄、24 月龄 3 个阶段均在肺部组织中表达量最高($P < 0.01$)。 *IRX3* 基因在秦川牛心脏、肝脏中的表达量随年龄的增长而极显著增加($P < 0.01$); 在背最长肌中的表达量随生长发育过程的推进而极显著减少($P < 0.01$); 在大肠、肺脏组织中的表达量从胎牛到 6 月龄逐渐降低, 从 6 月龄到 24 月龄极显著增加($P < 0.01$)。随着年龄的增长, 秦川牛脂肪组织中 *IRX3* 基因的表达量呈先升高后降低最后再升高的变化趋势, 18 月龄表达量最高, 极显著高于其他年龄段($P < 0.01$); 其次是 6 月龄, 表达量极显著高于 24~60 月龄($P < 0.01$)。【结论】*IRX3* 基因在不同阶段秦川牛的肺部组织中均有较高水平的表达; *IRX3* 基因在脂肪组织中的表达量与牛生长速度正相关, 推测 *IRX3* 基因在秦川牛发育过程中与脂肪沉积有密切联系。

【关键词】 秦川牛; *IRX3* 基因; 实时荧光定量 PCR; 脂肪; 基因表达

【中图分类号】 S823.8⁺12; Q786

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)06-0015-05

Expression of *IRX3* gene in different tissues of Qinchuan cattle

NING Yue¹, WU Sen¹, ZHANG Le¹, ZAN Linsen^{1,2}

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Beef Cattle Improvement Center, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the expression patterns of *IRX3* (Iroquois homeobox 3) gene in Qinchuan cattle tissues to provide basis for meat trait improvement through modern molecular technology. 【Method】 Real-time quantitative specific primers were designed based on the mRNA sequence of *IRX3* gene, and SYBR green reaction system of real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect the expression level of *IRX3* gene in different tissues (heart, liver, spleen, lung, kidney, large intestine, small intestine, and muscle (longissimus dorsi muscle)) in different growth stages (fetal bovine, 6-month, and 24-month) and in fat tissues at four periods (6-month, 18-month, 24-month, and 60-month). 【Result】 The expression of *IRX3* gene in lung was much higher than in other tissues in fetal bovine, 6-month and 24-month Qinchuan cattle ($P < 0.01$). The expressions of *IRX3* in heart and liver were low initially and then increased persistently ($P < 0.01$). The expression in muscle decreased with the process of growth ($P < 0.01$). The expressions of *IRX3* in large intestine and lung decreased gradually from fetal bovine to 6-

【收稿日期】 2017-03-30

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(2015BAD03B04); 国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-38); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(2014KTZB02-02)

【作者简介】 宁 越(1994-), 女, 陕西咸阳人, 在读博士, 主要从事动物生物技术研究。E-mail: ningyueny@163.com

【通信作者】 咎林森(1963-), 男, 陕西扶风人, 教授, 博士生导师, 主要从事牛遗传改良、健康养殖与动物生长发育调控研究。E-mail: zanlinsen@163.com

month Qinchuan cattle ($P < 0.01$), and increased significantly from 6-month to 24-month ($P < 0.01$). With the increase of age, the expression of *IRX3* gene in Qinchuan cattle in adipose increased firstly and then decreased before final increase. The highest expression was in 18-month ($P < 0.01$), followed by in 6-month ($P < 0.01$). **【Conclusion】** The *IRX3* gene had high expression in lung in different periods and its expression in fat was proportional to the growth rate of Qinchuan cattle. Thus, *IRX3* gene had close connection with fat deposition during the development of Qinchuan cattle.

Key words: Qinchuan beef cattle; *IRX3* gene; quantitative real-time PCR; fat; gene expression

秦川牛是我国著名的地方黄牛品种,具有耐粗饲、抗逆性(病)强、肉质优的特点,但生长慢、产肉量低且脂肪沉积欠佳^[1]。我国地方黄牛资源丰富,西北农林科技大学牛业团队一直致力于秦川牛肉用性状选育工作,利用常规育种手段及现代分子生物学技术,历经 20 余年,已成功选育出秦川牛肉用新品系,其生长速度、产肉性能均较秦川牛有显著提高。

IRX3 基因是 Iroquois 同源盒基因家族的成员之一,具有较高的保守性,是调节脊索动物脂肪沉积的重要基因^[2-3]。该家族的各成员在脊椎动物胚胎形成过程中参与许多调控作用^[4]。有研究发现,*IRX3* 是调控脂肪组织的重要因子,并对脂肪沉积有重要影响^[5]。另有研究发现,敲除斑马鱼 *IRX3a* 基因后,胰腺饥饿素 ϵ 细胞(pancreatic ghrelin-producing epsilon cells)数量上升,胰岛素 β 细胞数量下降(insulin-producing beta-cells),胰高血糖素 α 细胞(glucagon-producing alpha-cells)数量上升,表明胰腺中 *IRX3* 基因的功能与肥胖和 II 型糖尿病有直接关联^[6-9]。另外,人们原来一直认为人类肥胖在遗传上主要是由于 *FTO* 基因突变导致的,但实际上是由 *FTO* 基因内部的一些肥胖相关元件与位于基因组上较远位置的 *IRX3* 基因发生互作而导致的,因此 *IRX3* 很可能是一个具有肥胖功能的基因^[10-12]。而 *FTO* 基因自身似乎只对肥胖产生周边效应^[13-15]。

目前,有关 *IRX3* 基因的研究仍然较少,在非模式动物上的研究几乎没有。因此,本研究利用荧光实时定量技术,检测 *IRX3* 基因在秦川牛不同月龄不同组织中的表达情况,以揭示 *IRX3* 在秦川牛机体中的表达规律,为秦川牛的分子育种提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 供试组织与器官 供试材料包括 3 头秦川牛胎牛(妊娠 3 个月的胎儿)的心脏、肝脏、脾脏、肺

脏、肾脏、大肠、小肠、肌肉(背最长肌),3 头 6 月龄秦川牛的心脏、肝脏、肺脏、大肠、小肠、肌肉(背最长肌),3 头 24 月龄秦川牛的心脏、肝脏、肺脏、大肠、肌肉(背最长肌),以及 6 月龄、18 月龄、24 月龄、60 月龄秦川牛的脂肪组织,所有组织器官均由西北农林科技大学国家肉牛改良中心种质资源库于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.1.2 主要试剂及仪器 Trizol 试剂和总 RNA 提取试剂盒,TIANGEN[®] 公司产品;天净沙 RNase 清除剂 A 型,北京天恩泽[®] 公司产品;PrimeScript[™] RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒和 SYBR[®] Primix Ex *Taq*[™] II 试剂盒, TaKaRa 公司产品;7500 Real Time PCR 仪,ABI 公司产品。

1.2 牛组织总 RNA 的提取及反转录 PCR

用 Trizol 法提取牛组织总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测法和分光光度计检测法对所提 RNA 的品质进行检测。将品质符合要求的组织总 RNA 用 PrimeScript[™] RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒进行反转,反应得到的 cDNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.3 *IRX3* 表达量的实时荧光定量检测

1.3.1 引物设计 选用 *GAPDH*、 β -actin、*B2M*、*Ubiquitin* 和 18S rRNA 为内参基因,检测其在各待测组织中的表达情况,利用 NormFinder 和 geNorm 进行分析,通过计算稳定值来确定最适内参数量及最佳内参,结果显示 *GAPDH* 为最佳内参基因,因此选用 *GAPDH* 为内参进行试验。根据秦川牛 *IRX3* 的 mRNA 序列设计实时定量特异性引物,交由 TaKaRa[®] 公司合成;*GAPDH* 引物由本实验室保存。引物相关信息见表 1。

1.3.2 实时荧光定量技术 用 SYBR[®] Primix Ex *Taq*[™] II 试剂盒进行实时定量 PCR,反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$,其中 SYBR[®] Primix Ex *Taq* II $10\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物各 $0.8\text{ }\mu\text{L}$,ROX Reference Dye II $0.4\text{ }\mu\text{L}$,cDNA 模板 $2\text{ }\mu\text{L}$,dH₂O $6\text{ }\mu\text{L}$ 。反应在 7500 Real Time PCR 仪(ABI 公司产品)上进行,具体循环参

数为:95 °C 预变性 30 s;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 34 min,95 °C 15 s。每个样品进行 3 次重复试验。s,循环 40 次。熔解曲线程序为:95 °C 15 s,60 °C 1

表 1 IRX3 和 GAPDH 的 qRT-PCR 引物

Table 1 Primers of qRT-PCR of IRX3 and GAPDH

基因 Genes	引物序列 Primer sequences	退火温度/°C T _m	产物长度/bp Length
IRX3	F:5'-GCTGTAGTGCCTTGGGAAGTGGAG-3'	60	98
	R:5'-TAAGACCAGAGCGGCATCCAG-3'		
GAPDH	F:5'-CCAACGTGTCTGTTGTGGAT-3'	60	80
	R:5'-CTGCTCACACCTTCTTGA-3'		

1.4 数据处理

用待测基因的 C_t 值减去对应的内参基因 GAPDH 的 C_t 值,即可得到每种组织的 ΔC_t 值,在待测组织中选择一种组织作为参照(其表达量设定为 1),采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理数据并分析相对表达量^[16-17],结果以“平均值±标准误”表示。

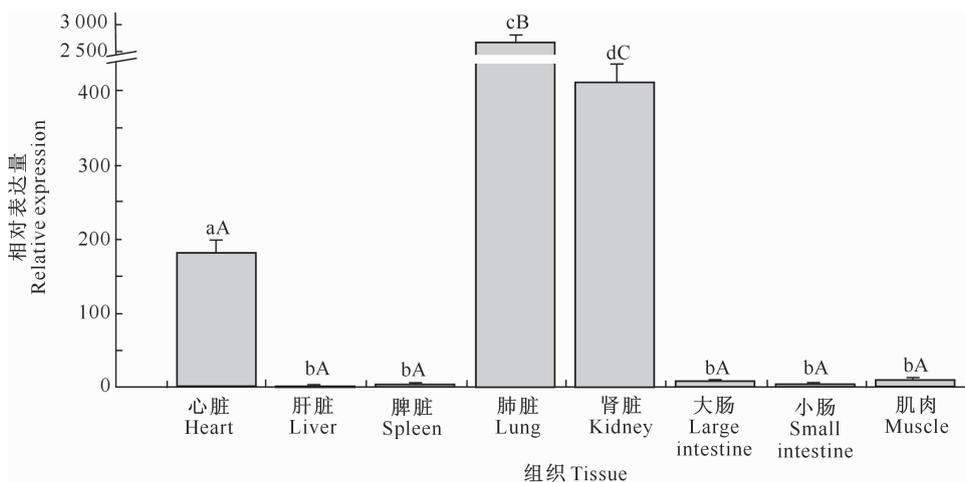
相对表达量用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差

分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 秦川牛胎牛 IRX3 基因的组织表达规律

以 IRX3 基因在肝脏中的表达量为参照,其在秦川牛胎牛 8 个不同组织中的相对表达量见图 1。



图柱上标不同小写字母表示组织间差异显著($P < 0.05$),标不同大写字母表示组织间差异极显著($P < 0.01$)。图 2,3 同

Different lowercase letters mean significant difference among tissues at $P < 0.05$, different capital letters mean extremely significant difference at $P < 0.01$. The same for Fig. 2 and Fig. 3

图 1 秦川牛胎牛 IRX3 基因的组织表达规律

Fig. 1 mRNA expression of IRX3 gene in different tissues of Qinchuan fetal bovine

由图 1 可知,在所检测的组织中,肺脏 IRX3 基因的表达量最高,极显著高于其他组织($P < 0.01$);其次是肾脏,其 IRX3 基因的表达量极显著高于除肺脏外的其他组织($P < 0.01$);再次是心脏,其 IRX3 基因的表达量显著高于除肺脏、肾脏外的其他组织($P < 0.05$);肝脏、脾脏、大肠、小肠和肌肉等组织中 IRX3 基因表达量极低。表明 IRX3 基因在秦川牛胎牛时期与肺脏和肾脏发育紧密相关。

2.2 6 月龄秦川牛 IRX3 基因的组织表达规律

以 IRX3 基因在大肠中的表达量为参照,其在 6 月龄秦川牛 6 个不同组织中的相对表达量如图 2 所示。由图 2 可知,在所检测的组织中,肺脏 IRX3

基因的表达量最高,极显著高于其他组织($P < 0.01$);其次是心脏,IRX3 基因表达量显著高于除肺脏外的其他组织($P < 0.05$);肝脏、大肠、小肠和肌肉中 IRX3 表达量很低。表明 IRX3 基因在秦川牛 6 月龄时对肺脏和心脏的发育有一定影响。

2.3 24 月龄秦川牛 IRX3 基因的组织表达规律

以 IRX3 基因在肌肉中的表达量为参照,其在 24 月龄秦川牛 5 个不同组织中的相对表达量见图 3。由图 3 可知,在所检测的组织中,肺脏中 IRX3 基因表达量最高,极显著高于其他组织($P < 0.01$);其次是心脏和肝脏,其 IRX3 基因表达量均处于较高水平;大肠和肌肉中 IRX3 基因表达量很低。

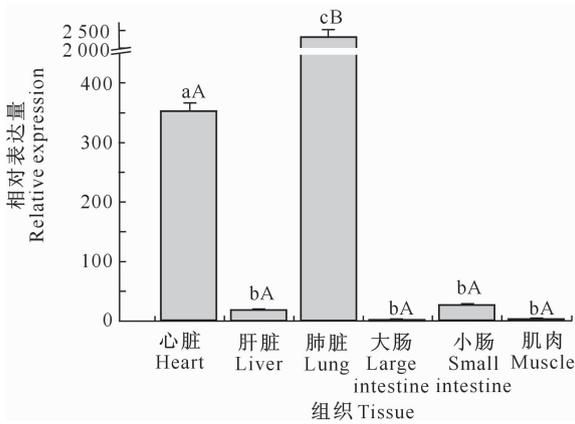


图 2 秦川牛 6 月龄犊牛 *IRX3* 基因的组织表达规律

Fig. 2 mRNA expression of *IRX3* gene in different tissues of 6-month Qinchuan cattle

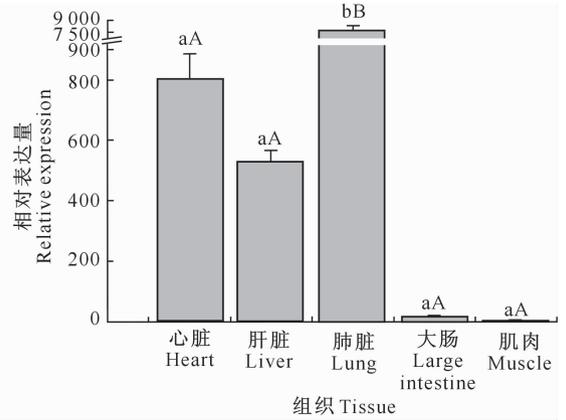


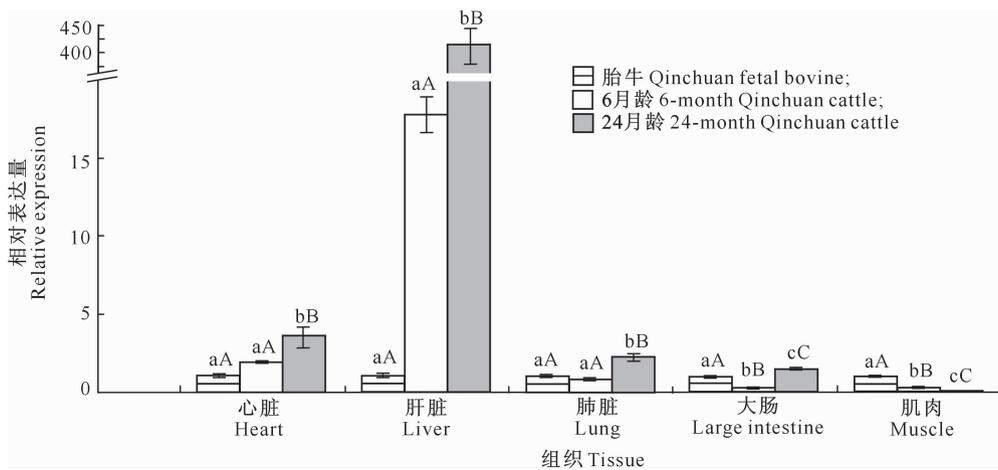
图 3 24 月龄秦川牛 *IRX3* 基因的组织表达规律

Fig. 3 mRNA expression of *IRX3* gene in different tissues of 24-month Qinchuan cattle

2.4 不同年龄秦川牛 *IRX3* 基因在相同组织中的表达规律

以 *IRX3* 基因在胎牛时期各组织中的表达量为参照,其在秦川牛不同发育阶段同一组织中的相对表达量如图 4 所示。由图 4 可知,在心脏和肝脏组织中,*IRX3* 基因的表达量随着年龄的增长而持续增高,其中以肝脏的增长幅度最大,并且 24 月龄时的表达量极显著高于胎牛和 6 月龄时期 ($P < 0.01$)。对肺脏和大肠而言,*IRX3* 基因在胎牛中的表达量

较高,出生后在肺部的表达量有所下降但差异未达显著水平 ($P > 0.05$),而在大肠中的表达量极显著降低 ($P < 0.01$);之后随着年龄的增长,*IRX3* 基因表达量在 24 月龄达到最高,极显著高于胎牛和 6 月龄时期 ($P < 0.01$)。各组织中只有肌肉组织 *IRX3* 基因在胎牛中的表达量最高,出生后表达量随着生长发育而极显著降低 ($P < 0.01$)。可见,*IRX3* 基因在不同时期秦川牛同一组织中的表达量均有显著差异,推测其在秦川牛生长发育中有较为活跃的功能。



同一组织不同年龄阶段相比,图柱上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),标不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Different lowercase letters mean significant difference among age groups at $P < 0.05$, and different capital letters mean extremely significant difference at $P < 0.01$

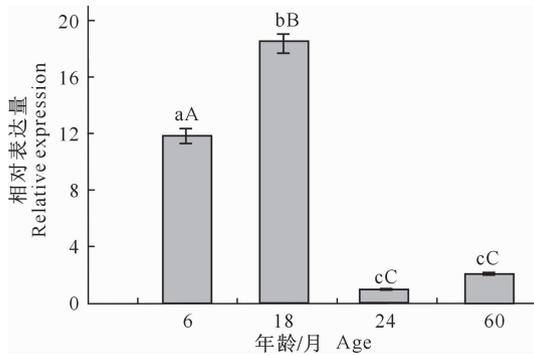
图 4 秦川牛 *IRX3* 基因在 3 个时期的组织表达规律

Fig. 4 mRNA expression of *IRX3* gene in three periods of Qinchuan cattle

2.5 *IRX3* 基因在不同时期秦川牛脂肪组织中的表达规律

以 24 月龄脂肪组织中 *IRX3* 的表达量为参照,其他年龄段脂肪组织中 *IRX3* 基因的表达情况如图 5 所示。由图 5 可以看出,随着年龄的增长,秦川牛

脂肪组织中 *IRX3* 基因的表达量呈先升高后降低最后再升高的变化趋势,18 月龄时表达量最高,极显著高于其他年龄段 ($P < 0.01$);其次是 6 月龄,*IRX3* 表达量极显著高于 24~60 月龄 ($P < 0.01$)。



不同年龄相比,图柱上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),标不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)

Different lowercase letters mean significant difference among age groups at $P < 0.05$, and different capital letters mean extremely significant difference at $P < 0.01$

图 5 秦川牛 *IRX3* 基因在脂肪组织中的表达规律

Fig. 5 mRNA expression of *IRX3* gene in fat tissue of Qinchuan cattle

3 讨论

我国地方黄牛资源丰富,但多为役肉或肉役兼用型,产肉量较低,脂肪沉积欠佳^[1]。如何依靠地方品种资源和生物技术手段加快黄牛遗传改良,积极培育优质高产肉牛品种,是我国肉牛产业和广大科技工作者面临的重要课题。研究发现,*IRX3* 基因在调节脊索动物生长发育、脂肪沉积等方面有重要作用^[2-3]。因此,研究 *IRX3* 基因在秦川牛组织中的表达情况,对利用现代分子育种方法进行肉脂品质改良有重要的指导意义。

IRX3 基因作为 Iroquois 同源盒基因家族的成员之一,具有较高的保守性。该家族的各成员在脊椎动物胚胎的形成模式中参与许多调控作用^[4]。Dankel 等^[18]对通过外科手术去脂(腹部脂肪)的肥胖患者术前和 1 年后及正常偏瘦人的相关基因进行检测后发现,手术后 *IRX3*、*IRX5* 等基因显著上调,从而发现 *IRX3* 是调控脂肪组织的重要因子。

本研究发现,在秦川牛胎牛、6 月龄、24 月龄时,*IRX3* 基因在肺脏组织中的表达量始终最高,并在成年牛时期达到最高;心脏组织的 *IRX3* 表达量也处于较高水平,并随牛生长发育阶段的推进而增大,因此推测该基因与心脏的发育有着密切联系,这点与已有的研究结果即 *IRX3* 可以影响心脏功能相一致^[19-23]。*IRX3* 基因在秦川牛肝脏、脾脏、大肠、小肠和肌肉中的表达量都处于较低水平。

在脂肪组织中,*IRX3* 基因的表达情况与生长发育情况一致,在 6 到 18 月秦川牛快速生长期极

显著高于其他时期,并且表达量随年龄增加而增长;而在 18~24 月龄秦川牛生长变得缓慢,*IRX3* 基因表达量也显著降低。分析发现,*IRX3* 基因在脂肪组织中的表达量与牛生长速度正相关,表明 *IRX3* 基因在秦川牛发育过程中与脂肪沉积有密切联系。

[参考文献]

- [1] 笄林森. 牛生产学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
Zan L S. Cattle production [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2007.
- [2] Kudoh T, Dawid I B. Role of the iroquois3 homeobox gene in organizer formation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (14): 7852-7857.
- [3] Li D, Sakuma R, Vakili N A, et al. Formation of proximal and anterior limb skeleton requires early function of *Irx3* and *Irx5* and is negatively regulated by Shh signaling [J]. Dev Cell, 2014, 29(2): 233-240.
- [4] Lewis M T, Ross S, Strickland P A, et al. Regulated expression patterns of *IRX-2*, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast [J]. Cell Tissue Res, 1999, 296(3): 549-554.
- [5] Houweling A C, Dildrop R, Peters T, et al. Gene and cluster-specific expression of the Iroquois family members during mouse development [J]. Mech Dev, 2001, 107(1/2): 169-174.
- [6] Ragvin A, Moro E, Fredman D, et al. Long-range gene regulation links genomic type 2 diabetes and obesity risk regions to *HHEX*, *SOX4*, and *IRX3* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(2): 775-780.
- [7] Doria A, Patti M E, Kahn C R. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes [J]. Cell Metab, 2008, 8(3): 186-200.
- [8] Wendik B, Maier E, Meyer D. Zebrafish *mxn* genes in endocrine and exocrine pancreas formation [J]. Dev Biol, 2004, 268(2): 372-383.
- [9] Boissel S, Reish O, Proulx K, et al. Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding *FTO* gene causes severe growth retardation and multiple malformations [J]. Am J Hum Genet, 2009, 85(1): 106-111.
- [10] Smemo S, Tena J J, Kim K H, et al. Obesity-associated variants within *FTO* form long-range functional connections with *IRX3* [J]. Nature, 2014, 507(7492): 371-375.
- [11] Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity [J]. Nat Genet, 2007, 39(6): 724-726.
- [12] Gao X, Shin Y H, Li M, et al. The fat mass and obesity associated gene *FTO* functions in the brain to regulate postnatal growth in mice [J]. PLoS One, 2010, 5(11): e14005.
- [13] Cedernaes J, Benedict C. Human obesity: *FTO*, *IRX3*, or both? [J]. Mol Metab, 2014, 3(5): 505-506.
- [14] Hess M E, Bruning J C. The fat mass and obesity-associated (*FTO*) gene: Obesity and beyond? [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(10): 2039-2047.

- 关系的研究 [J]. 西北林学院学报, 2009, 24(4): 1-4.
- Peng H, Li K, Sun Y Y. Relationship between leaf temperature and transpiration of 4 tree species in dry-hot valley in Yunnan [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(4): 1-4.
- [28] 许冰洋, 朱文魁, 潘广乐, 等. 基于收缩特性分析的叶丝快速对流干燥动力学模型 [J]. 烟草科技, 2015, 48(9): 69-74.
- Xu B Y, Zhu W K, Pan G L, et al. Kinetic model for rapid convective drying of cut strips based on shrinkage property analysis [J]. Tobacco Science & Technology, 2015, 48(9): 69-74.
- [29] 武圣江, 宋朝鹏, 贺帆, 等. 密集烘烤过程中烟叶生理指标和物理特性及细胞超微结构变化 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(1): 125-132.
- Wu S J, Song Z P, He F, et al. Changes of cell ultrastructure and some physiological indexes and physical properties of tobacco leaves during bulk flue-curing [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(1): 125-132.

(上接第 19 页)

- [15] McTaggart J S, Lee S, Iberl M, et al. *FTO* is expressed in neurons throughout the brain and its expression is unaltered by fasting [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27968.
- [16] 柳玲. 相对定量的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析 *HLA-G* 基因在子宫内膜异位症中的表达 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(9): 25-26.
- Liu L. Relative quantitative detection of *HLA-G* mRNA expression in patients with dometriosis by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. China Healthy Birth and Genetic Magazine, 2007, 15(9): 25-26.
- [17] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [18] Dankel S N, Fadnes D J, Stavrum A K, et al. Switch from stress response to homeobox transcription factors in adipose tissue after profound fat loss [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11033.
- [19] Christoffels V M, Keijsers A G, Houweling A C, et al. Patterning the embryonic heart: identification of five mouse Iroquois homeobox genes in the developing heart [J]. Dev Biol, 2000, 224(2): 263-274.
- [20] Bosse A, Stoykova A, Nieselt-Struwe K, et al. Identification of a novel mouse Iroquois homeobox gene, *Irx5*, and chromosomal localisation of all members of the mouse Iroquois gene family [J]. Dev Dyn, 2000, 218(1): 160-174.
- [21] Gaborit N, Sakuma R, Wylie J N, et al. Cooperative and antagonistic roles for *Irx3* and *Irx5* in cardiac morphogenesis and postnatal physiology [J]. Development, 2012, 139(21): 4007-4019.
- [22] Bonnard C, Strobl A C, Shboul M, et al. Mutations in *IRX5* impair craniofacial development and germ cell migration via *SDF1* [J]. Nat Genet, 2012, 44(6): 709-713.
- [23] Zhang S S, Kim K H, Rosen A, et al. Iroquois homeobox gene 3 establishes fast conduction in the cardiac His-Purkinje network [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(33): 13576-13581.