

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.10.1245

维甲酸受体在小鼠胚胎造血发育中的表达

李亚梅¹, 张文君², 汪俊帮², 江凡¹, 张炎¹, 曹雨娜¹, 梁爱斌², 张虹^{1*}

1. 同济大学附属同济医院临床药理室, 上海 200065

2. 同济大学附属同济医院血液科, 上海 200065

[摘要] **目的** 检测小鼠胚胎造血发育中维甲酸(retinoic acid, RA)受体(RA receptors, RARs)不同亚型 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及其合成酶视黄醛脱氢酶 1(retinal dehydrogenase 1, *Raldh1*)和 *Raldh2* 的转录水平, 探讨 RARs 不同亚型及其合成酶在胚胎造血发育中的作用。 **方法** 获取孕鼠胎龄 9.5 d(embryonic day 9.5, E9.5)卵黄囊(yolk sac, YS), E10.5、E11.5 主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区, E13.5、E14.5、E17.5 胎肝(fetal liver, FL)和成年小鼠骨髓(bone marrow, BM), 运用实时荧光定量 PCR 检测各组织中 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 、*Raldh1* 和 *Raldh2* 的转录水平。 **结果** 与其他不同阶段造血组织比较, 在 E9.5 YS、E11.5 AGM 区和 BM 中, *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 均高表达($P < 0.01$)。E11.5 AGM 区 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 表达水平高于 E10.5 AGM 区($P < 0.01$)。而 E13.5~E17.5 FL 间的 *RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 表达水平差异无统计学意义。 **结论** YS、AGM 区和 BM 中 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及其合成酶 *Raldh1* 和 *Raldh2* 表达趋势与已有研究中相应造血组织来源的红系造血祖细胞改变相一致, 反映了 RA 与小鼠个体发育中 YS、AGM 区和 BM 的造血形成密切相关, 而 RA 对 FL 的造血形成作用可能并不显著。

[关键词] 维甲酸; 维甲酸受体; 造血系统; 胚胎发育; 视黄醛脱氢酶

[中图分类号] R 321.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)10-1245-05

Expression of retinoic acid receptor in the mouse embryonic hematopoiesis

LI Ya-mei¹, ZHANG Wen-jun², WANG Jun-bang², JIANG Fan¹, ZHANG Yan¹, CAO Yu-na¹, LIANG Ai-bin², ZHANG Hong^{1*}

1. Department of Clinical Pharmacology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

2. Department of Hematology, Tongji Hospital, Tongji University, Shanghai 200065, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of retinoic acid receptors (RARs) subtypes *RAR- α* , *RAR- β* , *RAR- γ* and retinal dehydrogenases 1(*Raldh1*), *Raldh2* in the mouse embryonic hematopoiesis, so as to discuss the role of different RAR subtypes in embryonic hematopoiesis. **Methods** The yolk sac (YS) at embryonic day 9.5 (E9.5), aorta-gonad-mesonephros (AGM) region at E10.5 and E11.5, fetal liver (FL) at E13.5, E14.5 and E17.5 were harvested from the pregnant mice. The bone marrow (BM) was also harvested from adult mice. The mRNA levels of *RAR- α* , *RAR- β* , *RAR- γ* , *Raldh1* and *Raldh2* at the above four different hematopoietic sites were assessed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The mRNA levels of *RAR- α* , *RAR- β* , *RAR- γ* , *Raldh1* and *Raldh2* at E9.5 YS, E11.5 AGM regions and BM were significantly higher than those in other relevant hematopoietic tissues ($P < 0.01$). Compared with the E10.5 AGM region, E11.5 AGM region had significantly increased mRNA levels of *RAR- α* , *RAR- β* , *RAR- γ* , *Raldh1* and *Raldh2* ($P < 0.01$), but the mRNA levels of these genes in FL at E13.5-E17.5 were not significantly different. **Conclusion** The expressions of *RAR- α* , *RAR- β* , *RAR- γ* , *Raldh1* and *Raldh2* in YS, AGM regions and BM are consistent with the situation of colony forming unit erythroid (CFU-E), suggesting that retinoic acid is closely related to the formation of hematopoiesis in the YS, AGM region and BM in mouse, but has less correlation with the FL in mouse.

[Key words] retinoic acid; retinoic acid receptors; hematopoietic system; embryonic development; retinal dehydrogenase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(10): 1245-1249]

造血(hemopoiesis)是一个非常复杂的过程,具有严格的时间和空间特异性。小鼠原始造血发生于

[收稿日期] 2016-01-11 **[接受日期]** 2016-03-09

[作者简介] 李亚梅, 硕士。E-mail: 1027377103@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-66111245, E-mail: hongzh97@tongji.edu.cn

胎龄 7.5 d(embryonic day 7.5, E7.5)卵黄囊(yolk sac, YS)血岛^[1],永久造血起源于 E10.5 主动脉-性腺-中肾(aorta-gonad-mesonephros, AGM)区^[2],随后迁移至胎肝(fetal liver, FL)、脾脏和骨髓(bone marrow, BM)^[3]。不同造血组织来源的红系造血祖细胞(colony forming unit-erythroid, CFU-E)能分化为成熟的血细胞,维持正常的血液循环系统,从而反映造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)数量的变化,对于理解小鼠个体发育中造血系统的形成具有重要的借鉴作用^[4]。

造血与造血微环境和信号通路密切相关。维甲酸(retinoic acid, RA)信号通路在胚胎发育、细胞分化及免疫中具有重要作用^[5],有研究表明 RA 参与调控小鼠胚胎 YS 造血发育和 AGM 区造血的形成^[6-7]。本实验以小鼠胚胎 YS、AGM 区、FL 和成年小鼠 BM 为研究对象,检测 RA 受体(RA receptors, RARs)及其合成酶在小鼠胚胎造血不同阶段、不同造血位点的转录水平,以期小鼠胚胎造血发育中 RA 信号分子机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验小鼠 6~8 周龄雌、雄性清洁级 ICR 小鼠,体质量 28~35 g,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[动物生产许可证号:SCXK(沪)2013-0016;使用许可证号:SYXK(沪)2012-0031],饲养于同济大学附属同济医院实验动物中心。开展的所有实验动物研究均符合 2006 年国家科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》的要求。

1.2 试剂与实验器材 磷酸盐缓冲液(PBS)、4%多聚甲醛(PFA)、0.25%胰酶、胎牛血清(FBS)、红细胞裂解液、H-E 染料、分析天平、70 目尼龙过滤网、眼科剪 2 把、眼科镊子 2 把、胰岛素针 2 支、35 mm 和 100 mm 培养皿、15 mL 离心管。解剖显微镜、光学显微镜、切片机、ABI 7900HT 实时定量 PCR 仪、Eppendorf 5702R 低温离心机。

1.3 方法

1.3.1 孕鼠胚胎造血部位及成年小鼠 BM 的获取 于傍晚将 ICR 雌、雄小鼠按 3:1 比例合笼过夜,次日清晨将观察到有阴道栓的雌鼠予以分笼喂养,记为 E0.5。分别于 E9.5 取出 YS, E10.5 和 E11.5 取出 AGM 区, E13.5、E14.5 和 E17.5 取出 FL。孕鼠胚胎造血部位获取方法:颈椎脱臼处死妊

娠小鼠,立即用 75%乙醇喷洒腹部,剪开腹腔,定位 2 个子宫角,剪断子宫颈,剪下子宫系膜,用镊子将子宫拉出体腔,立即放入含 10% FBS 的 PBS 培养皿中。在解剖显微镜下分别剥除胎膜和胎盘,取 E9.5 YS;截取胎鼠前、后肢芽中间部分,去除背部体节和肠系膜等,分离获取 E10.5 和 E11.5 AGM 区;打开胎鼠胸腔,暴露内脏,小心分离 E13.5、E14.5 和 E17.5 FL。成年小鼠 BM 获取方法:颈椎脱臼处死 6 周龄雌鼠,立即置于 75%乙醇中浸泡 3~5 min,使用眼科剪去除双下肢皮毛及软组织,截取双下肢股骨及胫骨,剪开骨骼两端后使用含 10% FBS 的 PBS 冲洗骨髓腔,收集冲洗液。

1.3.2 BM 红细胞的去除 取新鲜 BM 于 4 °C 500×g 离心 5 min,弃上清。加入 1 mL 红细胞裂解液,轻轻吹打混匀,冰上裂解 10 min。500×g 离心 5 min,弃红色上清,加入 1 mL PBS 重悬细胞沉淀。

1.3.3 E11.5 胎鼠 AGM 区的 H-E 染色 将 E11.5 小鼠前、后肢芽中间部分用 4% PFA 固定,6 h 后换 15%蔗糖溶液脱水,12 h 后换 30%蔗糖溶液继续脱水,24 h 后进行标本横断面冰冻切片,行 H-E 染色。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测 RARs 相关基因的表达 使用 TRIzol[®]试剂(美国生命技术公司)分别提取不同时间点小鼠胚胎 YS、AGM 区、FL 和成年小鼠 BM 的总 RNA,用分光光度计测量 RNA 浓度。使用 PrimeScript[™] RT 试剂盒(RR047A, TaKaRa 公司)进行 RNA 反转录,具体步骤如下:400 ng RNA,加入 2.0 μL 5×gDNA Eraser Buffer, 1.0 μL gDNA Eraser,用 RNase-free 水补齐至 10 μL。42 °C 反应 2 min 后立即放置冰上。在上一步反应完成的 10 μL 体系基础上,加入 1.0 μL PrimeScript[™] RT Enzyme Mix, 1.0 μL RT Primer Mix, 4.0 μL 5×PrimeScript[™] Buffer,用 4.0 μL 的 RNase-free 水补齐至 20 μL。37 °C 反应 15 min, 85 °C 反应 5 s, 4 °C 终止反应。

采用上海翊圣生物科技有限公司销售的 Hieff[™] qPCR SYBR[®] Green Master Mix(High Rox Plus)行实时荧光定量 PCR,检测 RARs 不同亚型 RAR-α、RAR-β、RAR-γ 及其合成酶视黄醛脱氢酶 1(retinal dehydrogenase 1, *Raldh1*)和 *Raldh2* 的表达。具体反应体系如下: Master Mix(High Rox Plus) 5 μL,上游引物 0.2 μL,下游引物 0.2 μL, cDNA 50 ng,用 RNase-free 水补齐至 10 μL。应用

ABI 7900HT PCR 仪进行反应: 95 °C 5 min 预变性; 95 °C 解链 10 s, 60 °C 反应 30 s, 40 个循环。以 *GAPDH* 作为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各基因的相对表达量。各基因引物序列见表 1。每个样本 (YS、AGM 区、FL 和 BM) 均取 3 只孕鼠/成年小鼠, 每只孕鼠取 7 个胚胎的 YS、AGM 区和 FL。实验重复 3 次。

表 1 各基因引物序列

Tab 1 List of primers used for quantitative real-time PCR

Gene	Primer sequence (5'-3')
<i>GAPDH</i>	Forward: AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG
	Reverse: TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA
<i>RAR-α</i>	Forward: TTC TTT CCC CCT ATG CTG GGT
	Reverse: GGG AGG GCT GGG TAC TAT CTC
<i>RAR-β</i>	Forward: GCA GTG CGT GGA CAC ATG A
	Reverse: GGT AGA AGC TGC AAA CTG ACT
<i>RAR-γ</i>	Forward: GGA GCA GGC TTC CCA TTC G
	Reverse: CAT GGC TTA TAG ACC CGA GGA
<i>Raldh1</i>	Forward: CAG AGA GTG GGA GAG TGT TCC
	Reverse: CAC ACA GAA CCA AGA GAG AAG G
<i>Raldh2</i>	Forward: ATA CTT GTC GGA TTT AGG AGG CT
	Reverse: GGG CCT ATC TTC CAA ATG AAC A

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *RAR*: Retinoic acid receptor; *Raldh*: Retinal dehydrogenase

1.4 统计学处理 应用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各时间点不同造血部位基因表达量的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 E11.5 胎鼠 AGM 区的解剖过程 腹腔可见“Y”字形串珠状子宫, 约 8~12 枚。显微镜下可见此时的胚胎血液循环已经建立。子宫与胎盘相连, YS 包裹与卵黄动脉、脐带相连的胚体。AGM 区为去除背侧神经管后的下方条形组织, 中空结构, 背主动脉明显。见图 1。

2.2 E11.5 胎鼠 AGM 区 H-E 染色结果 E11.5 胎鼠前后肢芽中间部分横断面切片中可分辨出明显的神经管顶板、背主动脉、中肾管 (Wolffian 管) 及中肾旁管 (Müllerian 管), 背主动脉腔内可见较多的造血细胞, 且主动脉血管内皮细胞连接造血细胞 (图 2)。

2.3 *RARs* 相关基因在胎鼠 YS、AGM 区、FL 和成年小鼠 BM 中的表达 运用实时荧光定量 PCR 技术分析小鼠胚胎 YS、AGM 区、FL 和成年小鼠 BM 中 *RARs* 不同亚型及其合成酶在时间和空间上的表

达差异, 结果 (图 3) 显示 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 、*Raldh1* 和 *Raldh2* 在这 4 种造血组织中均有表达。

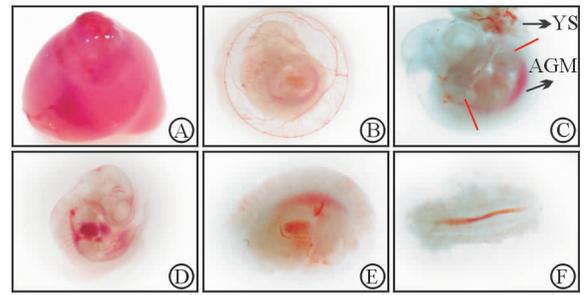


图 1 E11.5 胎鼠 AGM 区的解剖示意图

Fig 1 Image of anatomy E11.5 mouse AGM region

A: A uterus from a pregnant female mouse at 11.5 days (E11.5) post conception; B: An embryo encased in the YS; C: An embryo-encased YS was cut away from the vitelline arteries and umbilical cord; D: The overall view of an embryo; E: The upper and lower portions of the embryo were removed by cutting above the forelimbs and below the hindlimbs as indicated by the red line in image C; F: The dorsal portion and abdominal tissues close to the aorta of the embryo was removed, and the AGM region was isolated. YS: Yolk sac; AGM: Aorta-gonad-mesonephros. Original magnification: $\times 1\ 000$

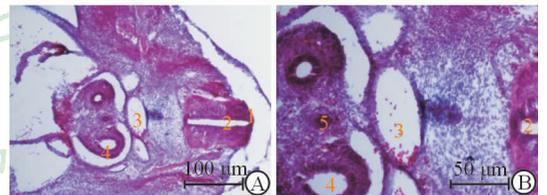


图 2 E11.5 小鼠 AGM 区 H-E 染色结果

Fig 2 H-E staining of E11.5 mouse AGM region

A: The upper and lower portions of the embryo were removed by cutting above the forelimbs and below the hindlimbs; B: The AGM region. 1: The roof plate of neural tube; 2: The central canal; 3: The aorta; 4: The Wolffian tube; 5: The Müllerian tube. AGM: Aorta-gonad-mesonephros; E11.5: Embryonic day 11.5

E10.5 AGM 区中 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 的表达水平低于 E9.5 YS 组 ($P < 0.01$); E11.5 AGM 区中 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 的表达较 E10.5 AGM 区升高 ($P < 0.01$)。

E13.5~E17.5 FL 内 *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 的表达水平低于 E11.5 AGM 区 ($P < 0.01$)。E13.5~E17.5 FL 内 *RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 的表达水平比较差异无统计学意义。*RAR- α* 在 E14.5 FL 中的表达高于 E13.5 FL ($P < 0.01$) 和 E17.5 FL ($P < 0.05$)。在成年小鼠 BM 中, *RAR- α* 、*RAR- β* 、*RAR- γ* 及 *Raldh1*、*Raldh2* 的表达水平均高于 E17.5 FL ($P < 0.01$)。

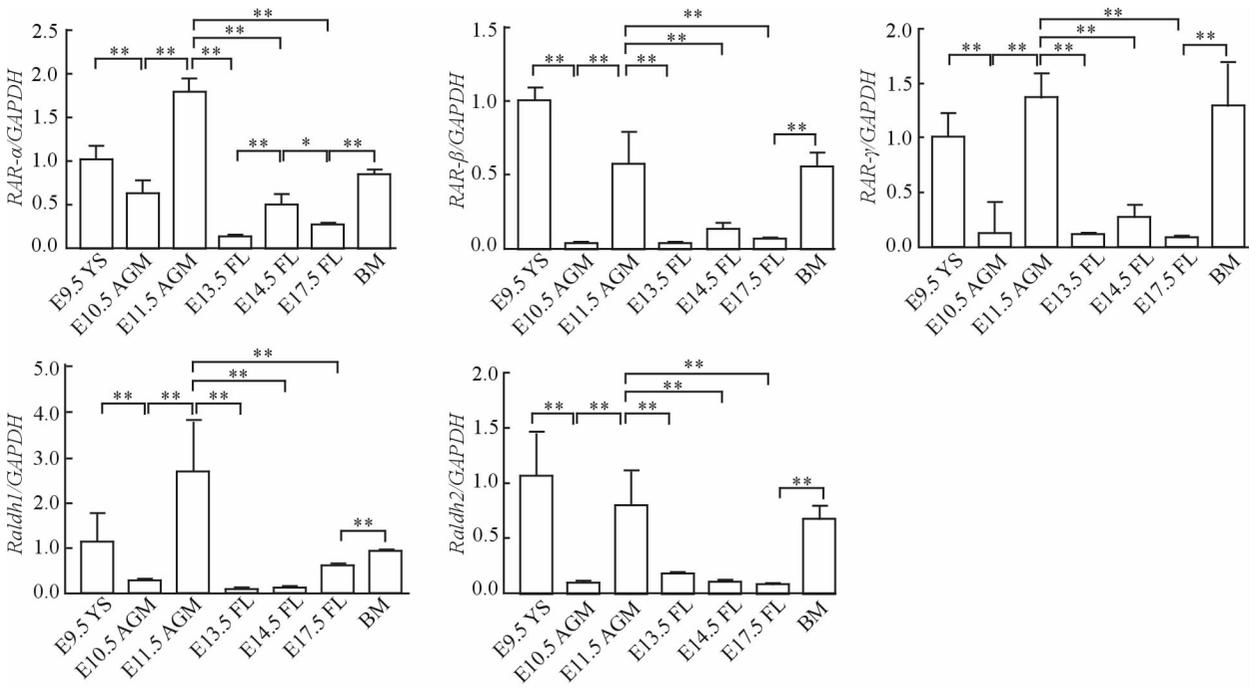


图3 实时荧光定量PCR检测RARs不同亚型及其合成酶的表达

Fig 3 The expression of RARs and its synthetase were assessed by quantitative RT-PCR

RAR; Retinoic acid receptor; Raldh; Retinal dehydrogenase; GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; YS; Yolk sac; AGM; Aorta-gonad-mesonephros; FL; Fetal liver; BM; Bone marrow; E9.5-E17.5; Embryonic day 9.5-17.5, respectively. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. $n=3$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

RA 是一类氧化代谢产物,在胚胎发育、器官形成、细胞分化及免疫效应中发挥着重要的作用^[5]。而RA对胚胎造血具体机制的深入研究或许可促进血液病学临床治疗方面的重大进展。RA主要通过其细胞核受体来发挥作用,目前共发现RARs和维甲酸X受体(RXR)两大类子受体家族,每类受体家族均包括 α 、 β 和 γ 3种亚型及多种异构体^[8]。Raldh1、Raldh2和Raldh3是小鼠胚胎发育时期的RA合成酶,其中Raldh2是RA合成的关键酶^[9]。在小鸡和小鼠视网膜发育过程中,Raldh2和Raldh3在视网膜色素上皮细胞和腹侧神经视网膜中均有表达;其中,Raldh3主要分布于小鼠早期胚胎头部神经节隆起部位,在上皮细胞中高表达,而与胚胎造血没有直接关系^[10]。

小鼠胚胎造血发育表现为不同造血位点在不同发育阶段连续发生的过程。HSC是存在于不同造血组织中的始祖细胞,能增殖、分化为各系造血祖细胞,如CFU-E等,再进一步分化为成熟的血细胞,维持正常的血液循环系统。文献报道,不同造血组织来源的CFU-E反映了HSC数量的变化,以便我们更好地理解小鼠个体发育中造血系统的形成^[4,11]。因此,本研究以既往报道的CFU-E、原始红细胞集落形成单位(primitive erythroid colony forming cells, EryP-CFC)以及脾集落形成单位(colony

forming unit-spleen, CFU-S)等来解释RA与胚胎造血的相关性。近年来,研究发现RA除参与调节胚胎发育外,还能够调控胎鼠E10.5和E11.5 AGM区造血的形成^[12],但目前有关RARs不同亚型及其合成酶在小鼠胚胎造血发育中的表达水平变化规律的研究并不完整,因此,本实验进一步探讨小鼠胚胎造血发育不同阶段RAR- α 、RAR- β 、RAR- γ 、Raldh1和Raldh2的表达规律。

Goldie等^[6]研究发现Raldh2基因敲除导致小鼠E9.5 YS血管缺陷。Palis等^[1]将E7 YS来源的造血细胞接种至甲基纤维素造血分化培养基上进行造血集落培养,收集到首个表达胚胎和成体珠蛋白的EryP-CFC, EryP-CFC产生的集落由大量有核原始红细胞组成。EryP-CFC仅局限于YS,到E8.25时数量达到高峰,而CFU-E产生的集落仅由少量永久红细胞组成,到E9.5时数量达到高峰^[1]。由此说明YS短暂地参与永久造血。在本实验中,RARs在胎鼠E9.5 YS中相对高表达,与Palis等^[1]研究中的造血发育中E9.5 YS来源的CFU-E数量峰值重叠,推测RA与原始造血相关,且短暂参与永久红细胞的形成。

到E10.5和E11.5时,YS中的CFU-E数量明显降低,永久造血祖细胞逐渐迁移至AGM区并大量增殖、分化。11 d后,CFU-S11数量不断增加,E11.0 AGM区来源的CFU-S11对永久造血的贡献最大,是

迁移至循环系统中造血细胞最主要的来源^[13]。在本实验中, E11. 5 AGM 区中 *RAR-α*、*RAR-β*、*RAR-γ*、*Raldh1* 和 *Raldh2* 基因一致高表达, 且表达比较稳定。此外, 其在 E11. 5 AGM 区的表达量较 E10. 5 AGM 区升高, 与文献报道的 E11. 0 AGM 区来源的 CFU-S11 对永久造血具有最大贡献^[13] 相符合。这也进一步验证了 RA 与胚胎早期造血密切相关, 并在原始造血和永久造血中具有重要作用。

研究发现小鼠胚胎 E18. 0 BM 中集落形成细胞 (colony forming cells, CFCs) 数量非常少, 共约有 10^3 , 小鼠出生 4 d 后, CFCs 数量也仅约 10^4 , 随后 CFCs 数量急剧上升, 直至成年小鼠水平。而小鼠胚胎 E18. 0 FL 中 95% 为 CFCs, 从出生开始, FL 中 CFCs 逐渐减少, 直至不再出现。提示造血祖细胞的扩增是有限的, CFCs 并非完全从 FL 向 BM 迁移^[14]。Huang 等^[15] 研究发现 RA 信号通路主要成员 (包括 RARs、RXRs、*Raldh1* 和 *Raldh2*) 在小鼠肝脏发育不同时期表达, 其中 *RAR-α* 在 E14. 5 FL 中高表达, *RAR-β* 在围产期表达很低, *RAR-γ* 在胚胎期几乎检测不到, 出生后表达逐渐增加。本实验 E13. 5 FL 中 *RAR-α*、*RAR-β*、*RAR-γ*、*Raldh1* 和 *Raldh2* 基因表达量降低, 且在 E13. 5~E17. 5 FL 中 *RAR-β*、*RAR-γ*、*Raldh1* 和 *Raldh2* 基因均低表达, 样本间表达量差异无统计学意义, 到成年小鼠时 BM 中的 RA 信号相关基因上调。因此, 推测 RA 对 FL 的造血形成作用较小, 且 RA 并非完全影响从 FL 向 BM 迁移的造血过程。此外, E14. 5 FL 中 *RAR-α* 表达上调, 到 E17. 5 时表达下调, 这正说明了 *RAR-α* 对 FL 永久造血作用的重要性。

本实验以 RARs 为切入点, 研究 RARs 不同亚型 *RAR-α*、*RAR-β*、*RAR-γ* 及其合成酶 *Raldh1* 和 *Raldh2* 在胚胎造血不同发育阶段的表达变化, 从时间和空间角度分析了小鼠胚胎造血发育时 RARs 对造血形成的影响, 为今后相关信号通路的分子机制研究奠定了基础。但本研究仅是建立在对胚胎组织特定基因 mRNA 表达水平上的分析, 尚需进一步进行细胞及分子水平的验证。

[参考文献]

[1] PALIS J, ROBERTSON S, KENNEDY M, WALL C, KELLER G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse[J]. *Development*, 1999, 126: 5073-5084.

[2] BRUIJN M F, SPECK N A, PEETERS M C, DZIERZA K E. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo[J]. *EMBO J*, 2000, 19: 2465-2474.

[3] YOSHIMOTO M, YODER M C. Developmental

biology: birth of the blood cell[J]. *Nature*, 2009, 457: 801-803.

[4] BARMINKO J, REINHOLT B, BARON M H. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals[J]. *Dev Comp Immunol*, 2016, 58: 18-29.

[5] EVANS T R, KAYE S B. Retinoids: present role and future potential[J]. *Br J Cancer*, 1999, 80(1/2): 1-8.

[6] GOLDIE L C, LUCITTI J L, DICKINSON M E, HIRSCHI K K. Cell signaling directing the formation and function of hemogenic endothelium during murine embryogenesis[J]. *Blood*, 2008, 112: 3194-3204.

[7] CHANDA B, DITADI A, ISCOVE N N, KELLER G. Retinoic acid signaling is essential for embryonic hematopoietic stem cell development[J]. *Cell*, 2013, 155: 15-27.

[8] MENÉNDEZ-GUTIÉRREZ M P, RÖSZER T, FUENTES L, NÚÑEZ V, ESCOLANO A, REDONDO J M, et al. Retinoid X receptors orchestrate osteoclast differentiation and postnatal bone remodeling[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125: 809-823.

[9] FITCH S R, KIMBER G M, WILSON N K, PARKER A, MIRSHEKAR-SYAHKAL B, GÖTTGENS B, et al. Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11: 554-566.

[10] LI H, WAGNER E, MCCAFFERY P, SMITH D, ANDREADIS A, DRÄGER U C. A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse[J]. *Mech Dev*, 2000, 95(1/2): 283-289.

[11] QIU C, OLIVIER E N, VELHO M, BOUHASSIRA E E. Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells[J]. *Blood*, 2008, 111: 2400-2408.

[12] RHINN M, DOLLÉ P. Retinoic acid signalling during development[J]. *Development*, 2012, 139: 843-858.

[13] MEDVINSKY A, DZIERZAK E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region[J]. *Cell*, 1996, 86: 897-906.

[14] WOLBER F M, LEONARD E, MICHAEL S, ORSCHELL-TRAYCOFF C M, YODER M C, SROUR E F. Roles of spleen and liver in development of the murine hematopoietic system[J]. *Exp Hematol*, 2002, 30: 1010-1019.

[15] HUANG J, BI Y, ZHU G H, HE Y, SU Y, HE B C, et al. Retinoic acid signalling induces the differentiation of mouse fetal liver-derived hepatic progenitor cells[J]. *Liver Int*, 2009, 29: 1569-1581.