

生理学报  
*Acta Physiologica Sinica*  
ISSN 0371-0874, CN 31-1352/Q

## 《生理学报》网络首发论文

题目： 哺乳动物心肌细胞再生专家共识  
作者： 李良鹏  
DOI： 10.13294/j.aps.2024.0015  
网络首发日期： 2024-03-08  
引用格式： 李良鹏. 哺乳动物心肌细胞再生专家共识[J/OL]. 生理学报.  
<https://doi.org/10.13294/j.aps.2024.0015>



**网络首发：**在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认：**纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## 专家共识

### 哺乳动物心肌细胞再生专家共识

中国生理学会整合生理专委会，老年心脑血管病教育部重点实验室

**通讯作者：**曾春雨(第三军医大学大坪医院；E-mail: chunyuze01@163.com)；杨黄恬(中国科学院上海营养与健康研究所；E-mail: htyang@sinh.ac.cn)；管又飞(大连医科大学；E-mail: guanyf@dmu.edu.cn)

**执笔：**李良鹏(第三军医大学大坪医院)

**专家组成员(按姓氏汉语拼音排序)：**宾建平(南方医科大学南方医院)，曹丰(中国人民解放军总医院第二医学中心)，曹浩(同济大学附属东方医院)，陈雄文(天津医科大学药学院)，陈静海(浙江大学转化医学研究院)，管又飞(大连医科大学)，胡新央(浙江大学医学院附属第二医院)，李良鹏(第三军医大学大坪医院)，聂宇(中国医学科学院阜外医院)，裴端卿(西湖大学)，时宇(第三军医大学大坪医院)，王利(中国医学科学院阜外医院)，王伟(第三军医大学西南医院)，王丰(第三军医大学大坪医院)，王连生(南京医科大学第一附属医院)，王志华(中国医学科学院阜外医院)，熊敬维(北京大学未来技术学院)，肖俊杰(上海大学生命科学学院)，夏雪伟(第三军医大学大坪医院)，杨黄恬(中国科学院上海营养与健康研究所)，杨中州(南京大学医学院)，余路阳(浙江大学生命科学学院)，曾春雨(第三军医大学大坪医院)，张冰(上海交通大学)，张晓燕(华东师范大学医学与健康研究院)，张玉珍(同济大学附属东方医院)，周斌(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心)，邹云增(复旦大学附属中山医院)

**摘要：**心肌梗死引起的大量心肌细胞损失导致心脏病理性重构和心力衰竭的发生，如何促进心肌再生是修复受损心脏的关键问题。心肌细胞再生主要源于原有心肌细胞的增殖已被广泛认同。近年来，该领域的快速发展加深了我们对心肌细胞再生的内源性细胞和微环境特征、外源性影响因素、分子生物学机制以及干预策略等各方面的认识。因此，我们对哺乳动物心肌细胞再生的定义、特征、评价和研究方法、调控机制以及干预措施等进行整理并形成共识，旨在明

确该领域尚需进一步阐明的重要问题，推动心肌再生研究的深化及其在临床上的应用转化。

**关键词：**心肌梗死；心力衰竭；心肌再生；心肌细胞增殖

## **Experts' consensus on mammalian cardiomyocyte regeneration**

Chinese Society of Integrative Physiology, Chinese Association for Physiological Sciences; Key Laboratory of Geriatric Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Research, Ministry of Education of China, Chongqing, China

**Corresponding authors:** ZENG Chun-Yu [Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China; E-mail: chunyu.zeng01@163.com]; YANG Huang-Tian (Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China; E-mail: htyang@sinh.ac.cn); GUAN You-Fei (Advanced Institute for Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian, China; E-mail: guanyf@dmu.edu.cn)

**Writing expert:** LI Liang-Peng [Daping Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China]

Expert Committee (in alphabetical order by surname): BIN Jian-Ping (Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, China); CAO Feng (2nd Medical Center, Chinese PLA General Hospital, Beijing, China); CAO Hao (Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, China); CHEN Xiong-Wen (School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin, China); CHEN Jing-Hai (Institute of Translational Medicine, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, China); GUAN You-Fei (Dalian Medical University, Dalian, China); HU Xin-Yang (The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, China); LI Liang-Peng [Daping Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China]; NIE Yu (Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China); PEI Duan-Qing (Westlake University, Hangzhou, China); SHI Yu [Daping Hospital, Third

Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China]; WANG Li (Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China); WANG Wei Eric [Southwest Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China]; WANG Feng [Daping Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China]; WANG Lian-Sheng (First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing Medical University, Nanjing, China); WANG Zhi-hua (Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing, China); XIONG Jing-Wei (College of Future Technology, Peking University, Beijing, China); XIAO Jun-Jie (School of Life Science, Shanghai University, Shanghai, China); XIA Xue-Wei [Daping Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China]; YANG Huang-Tian (Shanghai Institute of Nutrition and Health, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China); YANG Zhong-Zhou (Nanjing University Medical School, Nanjing University, Nanjing, China); YU Lu-Yang (College of Life Sciences, Zhejiang University, Zhejiang, China); ZENG Chun-Yu [Daping Hospital, Third Military Medical University (Army Medical University), Chongqing, China]; ZHANG Bing (School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China); ZHANG Xiao-Yan (Health Science Center, East China Normal University, Shanghai); ZHANG Yu-Zhen (Shanghai East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, China); ZHOU Bin (Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Center for Excellence in Molecular Cell Science, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China); ZOU Yun-Zeng (Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai, China)]

**Abstract:** Myocardial infarction (MI) leads to a massive loss of cardiomyocytes, resulting in pathological cardiac remodeling and heart failure. Promoting cardiomyocyte regeneration is crucial for repairing the damaged heart. It is acknowledged that regenerative cardiomyocyte derives from the existing cardiomyocytes. In recent years, advancements in this field have updated our understanding of cardiomyocyte regeneration in many aspects, including intrinsic cell source and microenvironmental characteristics, extrinsic factors, molecular biology mechanisms, and intervention strategies. Here, we report a consensus by an expert

committee on the definition, characteristics, evaluation, research methods, regulatory mechanisms, and intervention measures related to mammalian cardiomyocyte regeneration. The aim is to clarify important unresolved issues in this field and to promote myocardial regeneration research and its clinical translation.

**Key words:** myocardial infarction; heart failure; cardiac regeneration; cardiomyocyte proliferation

## 前 言

心肌梗死(myocardial infarction, MI)引起的大量心肌细胞丢失导致心脏病理性重构和心力衰竭的发生, 如何促进心肌再生是修复受损心脏的关键问题, 也是生物医学研究的前沿和热点问题。类似的再生医学挑战同样存于其他重要领域。例如在神经科学方面, 研究人员对如何有效促进神经元和神经组织再生以治疗神经退行性疾病和神经损伤进行了积极探索。这些努力显示了再生医学在生物医学研究中的广泛应用和重要性。经过近 20 年的探索, 心肌细胞再生主要源于原有心肌细胞的增殖已经得到广泛共识。近年来该领域研究的迅猛发展使人们对心肌细胞再生有了更深入的认识。心肌细胞再生的内源性细胞和微环境特征、外源性影响因素, 以及分子生物学机制和干预策略等方面的知识在不断地更新和丰富。因此, 我们认为有必要对哺乳动物心肌细胞再生的定义、特征、评价和研究方法、调控机制和干预策略等进行梳理, 形成共识, 并明确尚需进一步阐明的重要问题, 以推动该领域研究的进一步深化和转化应用。

该共识声明重点聚焦于心肌细胞的内源性再生, 也涉及一些基于细胞疗法激活内源性心肌细胞再生的研究进展。因无法包含该领域中所有的出版物, 在本共识中主要引用了一些支撑共识的代表性研究。

### 一、心肌细胞再生研究变迁

传统观点认为, 成年哺乳动物的心肌细胞是终末分化细胞, 不具有增殖或自我更新的能力, 个体成熟后心肌细胞数量保持不变。因此, MI 发生后, 心肌

难以自我修复。

为了找到替代损失心肌细胞的方法，研究者开始探索成体干细胞/心脏前体细胞移植的可能性。这些细胞类型因其独特的定向分化潜能，被广泛认为是新生心肌细胞的理想来源。然而，尽管在动物模型和初步的临床试验中观察到了心功能的改善，但进一步研究显示，这些细胞并不能直接分化为心肌细胞，而主要是通过旁分泌机制促进血管新生和抗心肌细胞死亡等方式对心脏产生有益效应<sup>[1, 2]</sup>。基于这一认识，研究者尝试将具有高分化潜力的多能干细胞——包括胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)和诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)在体外诱导分化成为心肌细胞，再移植到受损的心脏中。实验结果显示由多能干细胞分化的心肌细胞可以与受体心脏心肌细胞实现一定的功能整合，但其在移植后难以长期驻留，并存在发生心律失常的风险<sup>[3]</sup>。

在 20 世纪 50 年代到 60 年代，由于核武器试验，试验区域大气中的碳-14 (<sup>14</sup>C)水平急剧增加，这些 <sup>14</sup>C 被植物吸收并通过食物链进入人体，整合到新形成的 DNA 中。随着核试验停止，大气中的 <sup>14</sup>C 水平逐渐下降。利用这一现象，2009 年 Bergmann 等研究者通过测量不同出生年份的人心肌细胞中的 <sup>14</sup>C 水平，来估计这些细胞的形成时间。研究结果令人惊讶地发现，心肌细胞在成年后存在更新和再生的可能性，尽管这一增殖率随着年龄逐渐降低：25 岁的人每年大约有 1%的心肌细胞得到更新，到 75 岁则降低到 0.45%<sup>[4]</sup>。这一发现挑战了心肌细胞是不再增殖的终末分化细胞这一传统观点，证明了人终身均存在心肌细胞更新的可能性，从而为心肌再生研究提供了重要依据。

低等动物，如斑马鱼和两栖类动物在其一生中具有强大的心脏再生能力。在这些非哺乳动物物种中，较低的循环氧浓度<sup>[5]</sup>和体温<sup>[6]</sup>等潜在因素可能与其心脏再生能力有关。新生心肌细胞主要来源于原有心肌细胞去分化和增殖<sup>[7]</sup>。然而，哺乳动物与非哺乳动物在心脏再生方面的差异机制仍不完全清楚。

2011 年，Porrello 等<sup>[8]</sup>报道了哺乳动物在出生后特定时间窗内短暂具有心肌再生能力。他们对出生 1 天的小鼠进行了部分心尖切除，以模拟心脏损伤。随后的观察显示，这些小鼠的心脏发生了明显的再生现象，损伤部分被新生的心肌细胞所替代。更为重要的是，谱系示踪表明这些新的心肌细胞是由原有的心肌细胞增殖而来的。这种心肌的再生能力随着小鼠的年龄增长而迅速减退，在

出生第 7 天后, 小鼠的心脏再生能力显著降低, 不足以修复损伤心肌<sup>[8]</sup>。“哺乳动物心肌再生的主要来源为原有心肌细胞”这一结论随后被多同位素成像质谱 (multi-isotope imaging mass spectrometry, MIMS)<sup>[9]</sup>, 以及多种谱系示踪工具所证实<sup>[10]</sup>。这一结论随后在大动物实验模型中被进一步证实: 新生猪在出生 2 天内进行 MI 手术, 可在术后 30 天观察到显著的心肌细胞再生与心肌修复<sup>[11]</sup>。这些研究为心肌再生和心脏修复领域开辟了新的方向, 吸引了全球研究者对原位心肌细胞再生调控的深入探讨。

## 二、心肌细胞再生定义

**内源性心肌细胞增殖是哺乳动物心肌再生的主要方式。**多项研究表明, 哺乳动物成年心脏的心肌细胞更新来源于原有心肌细胞有限的有丝分裂<sup>[9, 12, 13]</sup>。通过预先对心肌细胞进行 LacZ 标记, 再对新生小鼠进行心尖切除, 发现在心尖区的新生心肌组织中, 绝大部分心肌细胞表达 LacZ, 表明新生的心肌细胞来源于原有心肌细胞的增殖<sup>[8]</sup>。MIMS 同样揭示, MI 后 8 周内, 梗死边缘区 23% 的心肌细胞发生 DNA 复制, 3.2% 的心肌细胞最终完成增殖<sup>[9]</sup>。成体干细胞不参与成年心肌细胞再生<sup>[14, 15]</sup>。

在本共识声明中, “**心肌细胞再生**”定义为“**通过原有心肌细胞增殖, 产生新的心肌细胞并获得成熟心肌细胞功能, 以补充已损失心肌细胞**”的过程。值得注意的是, 该过程不同于心肌细胞的多核化(细胞核发生复制但未发生细胞分裂), 以及多倍体化(单个心肌细胞核含有超过两套染色体)。

成年心肌细胞再生经历一系列特征性步骤, 即去分化、增殖和再分化<sup>[8]</sup>, 整个过程涉及到结构、功能及基因表达的动态变化。去分化是指相对成熟心肌细胞在形态、细胞结构、表达谱及功能等方面向幼稚阶段心肌细胞转变, 表现为肌小节结构的解聚、线粒体的排出或减少、兴奋-收缩解耦联, 以及呈现接近于胚胎期未成熟心肌细胞的表达谱, 例如重新表达 *Runx1*、 *$\alpha$ -SMA*、*Dab2*、*Gata4*、*Nkx2.5* 等胚胎期基因<sup>[16, 17]</sup>。去分化被认为是成年心肌细胞发生增殖的必经步骤, 为心肌细胞增殖提供全方位的准备。

心肌细胞增殖过程指心肌细胞重新进入细胞周期, 经历有丝分裂并最终形成新的子代心肌细胞。尽管成年心肌细胞可重新进入细胞周期, 但最终完成有丝分裂的比例却极低, 多数细胞代之以“多核化”或“多倍体化”, 即细胞核复

制但不发生胞质分裂，或仅发生 DNA 复制。增殖后的子代心肌细胞由于各方面仍处于相对幼稚状态，尚不能与周围成熟心肌整合并参与收缩。

再分化过程指增殖后的子代心肌细胞，在基因表达、形态和功能上由相对幼稚状态重新向成熟心肌细胞分化，最终重新获得肌小节结构，与周围成熟心肌细胞建立细胞间连接，恢复兴奋-收缩耦联及正常收缩功能的过程。心肌细胞的去分化、增殖及再分化是心肌细胞再生所必经的动态过程，全面认识该过程有助于推动心肌细胞再生研究及应用转化。

### 三、增殖心肌细胞的特征及研究方法

具有增殖能力，或正在发生增殖的心肌细胞相较非增殖心肌细胞在细胞形态、结构、电生理、基因表达谱和代谢方式等方面表现出明显的特征。通过对这些特征进行深入研究和干预，有望寻找到促进心肌细胞增殖的关键靶点和方法。

#### 1 增殖心肌细胞的特征

##### 1.1 结构特征

###### 1.1.1 肌小节/细胞骨架蛋白

从哺乳动物胚胎期、出生后到成年阶段，伴随着心肌增殖能力的减退，心肌细胞的肌小节结构逐渐成熟，其特征为肌纤维数量和密度的增加，肌小节排列更加有序，肌小节结构蛋白的构成更加复杂。相反，新生个体心肌细胞通常体积较小，肌小节等内部结构缺乏有序排列。肌小节结构的解聚是心肌细胞发生增殖的前提，所有观察到的正在进行有丝分裂的心肌细胞都显示出肌纤维排列的紊乱，肌小节结构的消失，该过程涉及一系列肌动蛋白的解聚<sup>[18]</sup>。这些结构改变究竟是心肌细胞增殖的诱因，还是仅为心肌细胞增殖的固有步骤，尚有待进一步阐明。有研究报道，干预肌动蛋白的聚合调控心肌细胞增殖：增殖心肌细胞与非增殖心肌细胞相比，单体形式的 G-actin 水平升高而聚合形式的 F-actin 水平减少，抑制 G-actin 聚合为 F-actin，可促进心肌细胞的去分化-增殖-再分化<sup>[19]</sup>。针对其他骨架蛋白/肌动蛋白的干预研究有助于进一步探索细胞结构变化与心肌细胞增殖的关系。

### 1.1.2 核型/多倍体型

哺乳动物出生后心肌细胞增殖能力的减退伴随着多核化与多倍体化的发生, 单核、2 倍体心肌细胞(mononuclear diploid cardiomyocytes, MNDCMs)被认为拥有较强的增殖能力; 相反, 多核/多倍体心肌细胞的增殖能力较弱。通过基因工程诱导的“多倍体”斑马鱼心肌在损伤后不能再生<sup>[20]</sup>。通过对 120 个小鼠近交系进行研究, 发现成年 MNDCMs 的频率在各品系差异显著(可超过 7 倍)。MI 后心肌细胞的增殖和心脏功能恢复都与 MNDCMs 含量相关。全基因组关联分析揭示了 *Tnni3k* 是影响这种组成变化的基因之一, 敲除 *Tnni3k* 导致 MNDCMs 含量升高和 MI 后心肌细胞增殖增加。相反, 斑马鱼中 *Tnni3k* 的过度表达促进了心肌细胞的多倍体化并损害了心脏再生<sup>[21]</sup>。然而, 在不同的实验模型中也观察到小鼠双核心肌细胞具有与单核心肌细胞相当的增殖能力<sup>[16]</sup>。利用更加先进的检测工具, 在更多实验模型进行探索有助于进一步阐明该问题。

### 1.1.3 线粒体结构与功能

具有再生能力的斑马鱼与新生小鼠心肌都表现出极少的线粒体含量和更少的线粒体嵴, 这些结构特征导致了线粒体氧化磷酸化和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的减少<sup>[22]</sup>。此外, 线粒体还可通过与细胞核“通讯”, 以不依赖于 ROS 的方式调控心肌增殖。线粒体蛋白翻译被抑制引起的适度线粒体应激, 可通过 eIF2 $\alpha$  激活转录因子 Atf4, 后者进入细胞核后上调胞质分裂相关基因 *Kn1l* 表达, 促进心肌细胞再生<sup>[23]</sup>。

## 1.2 基因表达谱特征

多项针对心肌组织的 RNA 测序研究发现, 与出生后 1 天(post-natal day 1, P1, 依次类推)小鼠相比, P7 小鼠心肌组织的细胞周期基因、糖酵解相关基因显著下调; 相反, 脂肪酸代谢、氧化磷酸化相关基因则表达上调<sup>[24, 25]</sup>。Porrello 等进一步将小鼠心肌细胞分离纯化后进行测序证实, P1 与 P56 心肌细胞表达谱的差异表达基因主要富集在细胞周期、线粒体、细胞代谢、转录因子、心肌收缩/细胞骨架等通路。在 MI 后, P1 与 P56 小鼠心肌细胞之间表达谱的主要差异表现在 Wnt 信号通路、细胞周期相关 E2F、Foxm1 转录调控网络以及自噬相关基因。MI 并不能刺激 P56 心肌细胞获得类似于 P1 心肌细胞“幼稚状态”的表达谱。分离心肌细胞的 ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with

high throughput sequencing)揭示, P56 与 P1 心肌细胞相比, 细胞周期、炎症反应、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相关基因的染色质可及性降低, 而有氧代谢、心肌成熟与收缩相关基因的染色质开放, 是上述现象的可能机制<sup>[26]</sup>。

单细胞 RNA 测序技术(single-cell RNA sequencing, scRNA-seq)为研究心肌细胞增殖提供了单细胞层面的解析精度。通过对 P1 和 P8 小鼠 MI 后的心脏进行单个心肌细胞核测序, 发现心肌细胞可分为 5 个亚群(CM1~5), 其中 CM4 亚群在 MI 后变化最为显著, 幼稚心肌细胞的特征性基因/细胞周期相关基因(如 *Mki67* 和 *CCNBI*)在该亚群高表达, 而成熟心肌细胞的特征性基因(如肌小节结构蛋白)在该亚群低表达, G2/M 期心肌细胞在 CM4 亚群显著富集。该亚群心肌细胞被认为是新生小鼠心肌损伤后心肌增殖的主要来源<sup>[27]</sup>。单细胞测序联合单细胞转座酶染色质可及性测序(single-cell assay for transposase-accessible chromatin using sequencing, scATAC-seq)分析发现, 增殖心肌细胞基因组的 *Tead3*、*MycN* 以及 *Gli1* 等转录因子的染色质可及性增加, 帮助揭示了增殖心肌细胞转录组变化的深层机制。基于单细胞测序结果的细胞互作分析还揭示了调控心肌增殖的细胞间信号网络, 例如心外膜、心内膜、巨噬细胞来源的分泌因子参与心肌损伤后的修复<sup>[28]</sup>。

scRNA-seq 同样运用于研究大动物心肌再生。通过对 P1 心尖切除的猪心肌组织进行单个细胞核测序, 分析得到了 6 个不同的心肌细胞亚群。其中两个心肌细胞亚群(CM4 和 CM5)的细胞周期基因的表达和心肌细胞增殖能力显著增加, 参与心肌损伤后的再生。受限于细胞体积的限制, 该结果未包含细胞质 RNA 数据<sup>[29]</sup>。

### 1.3 电生理特性

增殖和非增殖心肌细胞之间的电生理特性存在明显差异。新生心肌细胞通常具有更长的复极化时间和动作电位时程。从 P1 到成年心肌, 外向  $K^+$  电流和快  $Na^+$  电流幅度逐渐增加, 导致复极化时间缩短<sup>[30]</sup>。目前尚不清楚这些电生理特性是否参与调控心肌增殖, 以及增殖心肌细胞的以上电生理特征是否直接导致心律失常的发生。

增殖心肌细胞与非增殖心肌细胞的钙电流特征也具有显著差异。与成年、未受损斑马鱼心肌相比, 胚胎期及损伤边缘区的斑马鱼心肌的 L 型钙电流( $I_{Ca-L}$ )

密度减弱, 钙内流时间延长而外流时程缩短, 最终导致动作电位时程增加。富含亮氨酸重复序列蛋白 10 (leucine-rich repeat containing 10, LRRC10) 下调导致的 L 型钙通道(L-type calcium channel, LTCC)从 Z 盘解离是导致该现象的内在机制。LRRC10 水平的降低以及  $I_{Ca-L}$  的减弱有利于心肌细胞增殖, 相反, 较高水平的 LRRC10 和  $I_{Ca-L}$  则促进心肌的成熟与分化<sup>[31]</sup>。

#### 1.4 代谢特征

心肌收缩功能的维持需要大量能量供给, 其能量来源具有“底物灵活性 (substrate flexibility)”: 心肌细胞可根据供能需求、环境氧浓度、可用底物的变化来调整其能量代谢途径, 而这些代谢途径显示出对心肌细胞增殖差异化调控作用。在胚胎期/新生个体心脏, 心肌以耗氧较少, 但有利于心肌细胞增殖的糖代谢为主<sup>[25, 32]</sup>, 敲除心肌糖代谢关键酶 Pkm2 可抑制新生小鼠的心肌再生能力<sup>[33]</sup>; 在出生后, 小鼠心肌代谢则以耗氧较多、产能较高, 但同时阻碍心肌细胞增殖的脂肪酸氧化为主<sup>[25]</sup>, 剥夺出生后小鼠饮食中的脂肪酸<sup>[24]</sup>, 或敲除成年小鼠心肌中的脂肪酸代谢关键酶 Cpt1b<sup>[34]</sup>, 具有促进心肌细胞增殖的作用。尽管氨基酸不是心肌细胞的主要能量来源, 但在长期禁食, 剧烈或长时间运动、某些病理状态下, 心肌细胞也会利用氨基酸供能。代谢组学发现, P1 与 P7 心肌心肌细胞相比, 其谷氨酰胺、犬尿酸水平更高。在成年心肌细胞补充谷氨酰胺或犬尿酸可分别通过刺激哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)或 YAP 信号促进其增殖<sup>[35, 36]</sup>。此外, 增殖心肌细胞的组氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢更为旺盛, 而 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)和牛磺酸(Taurine)代谢降低<sup>[25]</sup>, 但这些变化是否与心肌细胞增殖相关尚不清楚。

## 2 心肌细胞再生的评价与研究方法

### 2.1 研究心肌细胞再生的动物模型

#### 2.1.1 心尖切除模型

心尖切除手术是在新生个体的心尖部位切除约 15%~20%的左心室心肌组织, 主要用于研究心肌组织的再生能力。心尖切除手术一般在 P1 和 P7/P8 小鼠心脏进行, 以检测心肌再生能力是否足以修复受损心肌<sup>[37]</sup>。结果显示, 在 P1 小鼠中, 心肌在心尖切除术后的 21 天内几乎完全修复, 而在 P7 小鼠中, 心肌无法再生

并发展为显著的纤维化。这一发现，使得在新生小鼠、大鼠进行心尖切除手术成为了研究心肌增殖的典型模型<sup>[8, 38]</sup>。

心尖切除手术同样可成功地应用于新生猪的实验模型。其具体操作为，通过胸骨正中线切开暴露新生猪的心脏，并从心尖部切除 4~5 mm 的心肌组织。值得注意的是，在 P1 接受心尖切除手术的新生猪，在 P28 再次接受 MI 手术时，与对照组相比显示出更为显著的心肌再生能力。该模型进一步证实了心尖切除手术对心肌增殖能力的刺激效果<sup>[39]</sup>。

### 2.1.2 冷冻损伤模型

冷冻诱导的心肌损伤(cyero-injury)模型是通过将冷冻探头(例如液氮冷冻的探头)直接接触到心脏的特定区域的心肌损伤模型，具有可重复性好，操作难度相对较低等特点。通过调整探头的温度、接触时间和接触压力以产生不同程度的损伤。冷冻损伤模型也被运用于心肌再生研究，由于其损伤的规模和深度可控，可以产生透壁(从心内膜到心外膜的全层)或非透壁(只损伤到部分心肌层)的损伤。P1 小鼠心脏在经历冷冻诱导的非透壁损伤后能够完全自我修复，但在受到透壁损伤后却没有显著的再生现象，这一现象的内在机制尚不清楚<sup>[40]</sup>。

### 2.1.3 MI 模型

MI 模型是对冠状动脉进行永久性结扎，造成心肌缺血损伤，以模拟临床 MI 病理状态的实验模型。在 P1 小鼠心脏诱导的 MI 模型同样可刺激心肌再生<sup>[37]</sup>。P1 新生小鼠的心脏在 MI 后第 21 天进行检测，可观察到类似于心尖切除模型自我修复，相反，P8 小鼠心脏在 MI 后则表现出广泛的纤维化、心壁变薄和心室扩张。对 P1 新生猪进行永久性的冠状动脉结扎，发现其心脏能够完全再生并持续恢复心脏功能，而在 P7 进行冠脉结扎的猪则发展出完全的心肌瘢痕和变薄的心壁<sup>[11]</sup>，表明 MI 同样是新生个体心肌损伤的有效模型。

成年小鼠在 MI 后，梗死边缘区重新进入细胞周期的心肌细胞明显增加，表现为 Ki67、磷酸化组蛋白 H3 (phospho-histone H3, PH3)、AuroraB、BrdU 和 EdU 等增殖标志物阳性的心肌细胞数目增多<sup>[41]</sup>。成年小鼠 MI 模型可用于检测特定干预措施对心肌增殖能力的影响。

在猪等大型实验动物，对冠状动脉前降支第二对角支开口的远端进行结扎造成的急性 MI 模型是研究猪心肌再生能力的常用模型。基于该模型的研究揭示

了猪在出生后同样存在心肌再生时间窗。在 P2 以内接受 MI 手术的猪心脏可通过原有心肌细胞增殖实现心肌再生<sup>[11]</sup>。

#### 2.1.4 心肌缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型

I/R 与永久性结扎 MI 模型不同, I/R 模型包括两个阶段: 第一阶段是暂时性的冠状动脉闭塞造成局部心肌缺血, 第二阶段是随后的血流恢复, 即再灌注和由之引起的再灌注损伤。由于 MI 患者通常会接受介入手术或溶栓治疗来恢复梗死区域的血流。因此, 与 MI 模型相比, I/R 模型更加贴近临床情况, 并且能够关注再灌注损伤的特点。I/R 模型同样被运用于研究心肌细胞增殖, 成年小鼠在缺血 60 min 的心肌 I/R 损伤后 14 天进行检测, 梗死边缘区 Ki67 阳性心肌细胞是假手术组的 3.5 倍, 且单个与成对 Ki67 阳性细胞的比例为 9:1, 表明 I/R 损伤刺激心肌细胞重新进入细胞周期, 但仅极少部分完成有丝分裂<sup>[42]</sup>。I/R 和 MI 损伤对成年心肌细胞周期的激活是否存在差异尚无报道。

在猪等大动物模型, 通过冠脉球囊封堵的方法建立的 I/R 损伤模型同样被用于检测刺激心肌细胞增殖的治疗效果, 例如在猪的 I/R 模型中, 前降支内给与重组 Agrin 可刺激成年心肌细胞重回细胞周期, 并将梗死面积缩小约 50%<sup>[43]</sup>。

#### 2.1.5 压力负荷模型

主动脉缩窄(transverse aortic constriction, TAC)构建的压力过载模型显示, P1 时小鼠进行 TAC 可刺激心肌细胞增殖。相反, P7 时进行 TAC 导致纤维化和心脏功能障碍。此外, 压力负荷的程度也与心肌细胞增殖相关, 使用 30 号针诱导的轻度压力负荷刺激了心肌细胞增殖和心肌肥大, 但两者对心脏增大的贡献比例没有明确的报道。使用 32 号和 34 号针诱导的中-中重度压力负荷在术后出现病理性心肌肥大甚至死亡<sup>[44]</sup>。在成年小鼠, TAC 同样在术后 2~7 天诱导了心肌细胞 PH3 阳性率的增加, 但这一变化趋势在术后 28 天消失<sup>[45]</sup>。

## 2.2 心肌细胞再生的检测方法和研究体系

为了评估和研究心肌细胞的再生能力, 研究者们开发了一系列技术方法和研究体系。这些方法包括心肌细胞分离计数、活细胞工作站的应用、细胞周期标志物的免疫染色、MIMS 技术、谱系示踪技术、以及各种测序与组学技术的应用。每种技术既有其独特的优势, 同时也存在相应的局限性。这些研究工具和方法为我们研究心肌细胞再生提供了重要基础(表 1)。

表 1. 用于检测心肌细胞再生的方法或工具

检测指标/工具	工作原理	检测方法	优势	局限性	在心肌再生研究中的应用	文献
消化分离心肌细胞并计数	通过消化分离小鼠心肌细胞, 制备悬液并计数, 估算心脏的绝对心肌细胞数目	通过 Langendorff 系统将胶原酶/胰酶进行主动脉逆灌, 消化心肌细胞并计数	心肌绝对数目的增加较为可靠地代表了心肌再生	该方法依赖于操作人员的熟练度, 和心脏之间灌流和消化细胞的可重复性	Mei1 敲除小鼠出生后 14 天心脏的心肌细胞计数明显高于对照小鼠( $\sim 5 \times 10^6$ vs. $3.5 \times 10^6$ )	[5]
活细胞工作站	通过延时摄像对体外培养的成年心肌细胞命运进行追踪	将荧光标记的成年心肌细胞在体外共培养, 通过间隔为 1 h 的延时摄像获得 7 天内的细胞行为轨迹	可观察成年细胞胞质分裂	仅限于体外实验	观察到成年心肌细胞增殖的全过程动态影像	[16]
Ki67	Ki67 在细胞周期 G1、S、G2 和 M 期中广泛表达, Ki67 阳性可代表心肌细胞处于细胞周期活跃状态	免疫染色	检测方法简便易行, 应用广泛	Ki67 阳性的心肌细胞并不一定完成胞质分裂.	过表达 CCND2 增加小鼠 MI 后心肌细胞 Ki67 阳性率 ( $\sim 2.0\%$ vs $0.4\%$ )	[63]
PH3	PH3 表达于细胞周期 M 期	免疫染色	检测方法简便易行, 应用广泛, 较 Ki67 更接近胞质分裂	PH3 阳性的心肌细胞并不一定完成胞质分裂	过表达 ErbB2 增加小鼠心肌细胞 PH3 阳性率( $\sim 0.4\%$ vs $< 0.02\%$ )	[123]
Aurora B	Aurora B 的表达和活性在 M 期后期达到高峰, 并具有特征性的定位	免疫染色	较 Ki67, PH3 更接近胞质分裂	仅在心肌胞质分裂的短暂时间内具有特征性表达定位, 敏感性较低, 需对大量图像结果进行观察	Nrg1 增加成年小鼠 MI 后心肌细胞 Aurora B 阳性率 ( $\sim 0.03\%$ vs $< 0.001\%$ )	[116]
BrdU	可在细胞周期 S 期掺入正在合成的基因组 DNA, 标记 DNA 复制	脉冲标记后免疫染色	可标记特定时间内(例如给药或处理期间)发生 DNA 复制的细胞核	BrdU 阳性的心肌细胞不一定完成胞质分裂, DNA 损伤修复也可能导致 BrdU 阳性	Nrg1 增加成年小鼠 MI 后心肌细胞 BrdU 阳性率( $\sim 0.18\%$ vs $< 0.05\%$ )	[116]

EdU	可在细胞周期 S 期掺入正在合成的基因组 DNA, 标记 DNA 复制	脉冲标记后免疫染色	与 BrdU 相比, 其细胞毒性更低, 操作更简便, 与其他染色计数有更好的兼容性.	EdU 阳性的心肌细胞不一定完成胞质分裂, DNA 损伤修复也可能导致 EdU 阳性	在人 iPSCs-CM 中, 过表达 CDK1, CDK4, CCND, CCNB 组合具有最高的 EdU 阳性率(> 25%); 验证 MADM 小鼠单色荧光心肌细胞发生过 DNA 复制(EdU 均为阳性)	[52]
多同位素成像质谱(MIMS)	可在细胞周期 S 期掺入正在合成的基因组 DNA, 标记 DNA 复制	<sup>15</sup> N 脉冲标记后进行同位素成像质谱	具有足以区分 DNA 复制和 DNA 修复的高分辨率	发生 DNA 复制的心肌细胞并不一定完成胞质分裂	小鼠 MI 后 8 周, 梗死边缘区 23% 的心肌细胞发生 DNA 复制; 小鼠 MI 后进行 8 周跑步运动可增加心肌细胞增殖约 8 倍	[9, 45]
IQGAP/RhoA	在胞质分裂阶段, 这两种蛋白对称性定位到中心体间隙上的肌动蛋白环; 否则心肌细胞不能完成胞质分裂, 代之以多核化	免疫染色	可根据 IQGAP/RhoA 形态与定位区分心肌细胞胞质分裂与多核化	需要观察大量共聚焦显微镜图片, 以及其形态判断依赖于观察者的经验, 并不适合运用于高通量检测心肌细胞增殖	原代心肌细胞有丝分裂失败是由于异常的有丝分裂微管导致肌动蛋白环与细胞膜的连接不充分所致。通过分析 RhoA 以及 IQGAP3 的定位, 可以区分心肌细胞的双核形成和分裂。	[18]
FUCCI 小鼠 ( $\alpha$ MHC-Cre::FUCCI)	橙色荧光蛋白 Kusabira (mKO) 与细胞周期 G1 期指示蛋白 hCdt1 融合, 而绿色荧光蛋白 Azami (AzG) 与 S/G2/M 期指示蛋白 Geminin 融合。在细胞周期进程中, 由泛素化介导的 mKO-Cdt1 和 AzG-Geminin 之间的交替使得从 G1 期到 M 期呈现不同颜色荧光	mKO 橙色荧光代表细胞处于 G1 期, AzG 绿色荧光代表细胞处于 S/G2/M	可标记处于不同细胞周期阶段的心肌细胞	无法显示胞质分裂	AzG <sup>+</sup> /mKO <sup>-</sup> 心肌细胞比率在 P2 和 P21 心脏分别为 9.3% 和 1%。AzG <sup>-</sup> /mKO <sup>+</sup> 心肌细胞比率在 P2 和 P90 分别为 6.8% 和 1.1%。MI 并不增加心肌细胞周期活性	[47]
Anillin-GFP 小鼠 ( $\alpha$ MHC-Anillin-GFP)	Anillin 是胞质分裂期间收缩环的固有组成蛋白。在 M 期, Anillin 在中心体的对	Anillin 在中心体呈对称分布, 与分裂中的姊妹细胞核距离较远,	可用于协助判断胞质分裂与多核化	形态判断依赖于观察者的经验, 不适合运用于高通量检测心肌细胞增殖, 不适用于	小鼠心肌细胞增殖率在 P2、P5 和 P7 分别为 5.99%, 3.63% 和 0.97%	[48]

	称分布, 以及与分裂中的姊妹细胞核具有较长间距, 与最终发生胞质分裂高度相关。	预示细胞发生胞质分裂		分离后心肌细胞		
Aurkb-tdTomato (Tnnt2-Dre × Aurkb-rox-tdTomato)	心肌特异性 Dre 的表达剪切掉 Aurkb 启动子和 tdTomato 之间的 STOP 序列, 使得 Aurkb 阳性的心肌细胞表达 tdTomato	成对分布且 tdTomato 阳性的心肌细胞代表发生增殖的心肌细胞	可实时显示 Aurora B 阳性的心肌细胞, 无需诱导	Aurora B 表达于 G2/M, 并不一定代表胞质分裂。	小鼠心肌细胞增殖率在 P1 心脏为 3.92%, 在 P7 为 1.57%, 在成年为 0.1%~0.2%。AR 损伤增加 P1 小鼠 tdTomato <sup>+</sup> 心肌细胞, 但成年后的 MI 损伤则不会增加 tdTomato <sup>+</sup> 心肌细胞; 四倍体(1×4n)和多倍体(3×2n 或更多)心肌细胞的 tdTomato <sup>+</sup> 阳性率较二倍体(1×2n)和四倍体(2×2n)高	[49]
ProTracer 小鼠 (Tnnt2-DreER;Ki67-CrexER;R26-GFP)	在任何特定的时间窗口内, 通过永久性标记 GFP 持续记录表达 Ki67 的细胞	GFP 阳性细胞代表 Ki67 阳性, 细胞周期活跃的心肌细胞	可持续记录心肌细胞增殖, 而不依赖于 Tamoxifen 等长期诱导给药	Ki67 阳性的心肌细胞并不一定完成胞质分裂	GFP 阳性心肌细胞的比例, 在出生后 0~6 天为 30.88%, 6~12 天为 10.34%, 12~18 天为 2.68%, 18~24 天为 0.22%。在成年心脏中, 心肌梗死(MI)后进入细胞周期的心肌细胞增加	[38]
Rainbow 小鼠 (αMHC-CreER; R26VT2/GK)	所有心肌细胞最初都表达 GFP, 但在 Cre 激活的情况下, GFP 被切除, 而 Cerulean、mOrange 或 mCherry 荧光蛋白会随机表达。若上述单色荧光的心肌细胞发生增殖, 其子代心肌细胞会表达相同颜色的荧光并形成集落。	成簇分布的单色荧光细胞代表心肌发生增殖	可回顾性地检测已经完成胞质分裂的心肌细胞	由于标记的随机性, 所以存在小概率相邻的心肌细胞被标记为相同荧光, 而不是因为发生增殖	心肌细胞增殖能力在胚胎发育期间经历大幅下降(与 E9.5 相比, 在 E12.5 时增殖能力大约降低了 16 倍)。心肌梗死可以激活新生而非成年心肌细胞的增殖	[51]

DKRC 小鼠 ( $\alpha$ MHC- MerDreMer- Ki67p-Roxed Cre; Rox-Lox- tdTomato-eGFP)	Tamoxifen 可诱导心肌细胞表达 tdTomato, 而任何 Ki67 阳性的心肌细胞则转变为表达 eGFP	增殖心肌细胞表达 eGFP 而非增殖心肌细胞表达 tdTomato	可标记 Ki67 阳性的心肌细胞, 还可通过阳性细胞的集落大小协助判断细胞是否完成胞质分裂。可实现仅在 Ki67 阳性的心肌细胞操纵特定基因的表达; 由于非增殖心肌细胞和增殖心肌细胞呈现不同颜色, 使得分离增殖心肌细胞成为可能	Ki67 阳性的心肌细胞并不一定完成胞质分裂	在 I/R 缺血损伤组和假手术组的心脏切片, 心肌细胞的 eGFP <sup>+</sup> 阳性率分别为 0.07% 和 0.02%; 单个 eGFP 阳性心肌细胞与成对 eGFP 阳性心肌细胞的比例为 9:1, 提示仅少部分细胞完成增殖	[39]
MADM 小鼠 (Myh6CreERT2; MADM- 11GT/TG)	心肌特异性 Cre 重组酶产生诱导的 DNA 同源重组, 导致子代细胞可能呈现红色、绿色、红色和绿色(黄色)或无色。	单一颜色的红色或绿色细胞表明心肌细胞经历了细胞分裂	红/绿单色荧光标记的细胞可确定为发生增殖的子代心肌细胞。	可能低估了心肌细胞的增殖, 因为 双色(黄色)或无色的细胞也可能已经分裂; 染色体间重组存在效率不高的问题。	在小鼠出生后的第一周, 有 11% 的标记细胞是单一颜色荧光标记的。在出生后 3 个月时, 该数值减少到 2.5%。心肌梗死并不会刺激成年心脏中心肌细胞的增殖。	[13]
CyclinA2-LacZ- floxed-EGFP 小 鼠	在心肌特异性 Cre 诱导下, 表达 CyclinA2-eGFP 融合蛋白, 从而标记心肌细胞周期	eGFP 信号代表心肌细胞实时表达 CyclinA2, 为细胞周期活跃的心肌细胞	CyclinA2 为表达于细胞周期 G1-M 中期的细胞周期蛋白, 可较为准确地标记细胞周期; 与 FUCCI 相比, 仅使用单色荧光	CyclinA2 阳性的心肌细胞并不一定完成胞质分裂	P1 小鼠右心室 CyclinA2-EGFP 阳性的心肌细胞数目少于左心室; 小鼠在 P15 并没有再次出现心肌细胞增殖的高峰	[54]

该表描述了检测心肌细胞增殖的方法学及其工作原理、优点和局限性。AR, 心尖切除; MI, 心肌梗死; FUCCI: 荧光泛素细胞周期指示器; Tnnt2: 心肌肌钙蛋白 T 型 2; Myh6:  $\alpha$ -心肌肌动蛋白重链; MIMS: 多同位素成像质谱; IQGAP: IQ motif containing GTPase Activating Protein; RhoA: Ras homolog family member A; iPSCs-CM: 诱导多能干细胞来源的心肌细胞。

### 2.2.1 分离心肌细胞计数

将胶原酶/胰酶通过 Langendorff 系统进行主动脉逆行灌注，以消化分离心肌细胞，制备细胞悬液并计数，估算其绝对心肌细胞数量的方法，也被用于评估心肌细胞增殖。但该方法依赖于操作人员的熟练度和可重复性，以最大限度保证分离心肌细胞的活性/数目具有可比性。此外，在小鼠 MI 模型中，存在因部分心肌灌注不完全，前降支血管结扎位置、梗死面积个体差异导致心肌细胞绝对计数不同的可能。

### 2.2.2 活细胞工作站

通过将荧光蛋白(例如 tdTomato)标记的成年心肌细胞与一定比例的新生乳鼠心室肌细胞(neonatal rat ventricular myocytes, NRVMs)进行共培养，并联合延时摄像(time lapse video)技术，可实现对体外培养成年心肌细胞命运，特别是胞质分裂的全程示踪。该系统发现成年心肌细胞在体外的增殖比例可达 7%。利用活细胞核染料 Draq5 对成年心肌细胞核数目进行标记，并测算心肌细胞初始大小，该系统还发现不同细胞核数目(单核/多核)以及不同大小心肌细胞的增殖能力并无明显差异。通过对完成胞质分裂的子代心肌细胞进行 cTnI 等心肌标志物染色，该系统发现并非所有子代心肌细胞都能重新表达 cTnI，在 cTnI 阳性的子代细胞中，仅有部分可获得肌小节的重新排列，表明增殖后的子代心肌细胞并不能完全获得重新分化。该技术还被用于检验心肌增殖标志物的可靠性<sup>[16]</sup>。

### 2.2.3 细胞周期标志物的免疫染色

#### 2.2.3.1 Ki67、PH3、Aurora B

Ki67 抗原最初是在 1980 年代初由 Gerdes 和他的同事们发现，他们使用一种来自霍奇金淋巴瘤细胞系的核抗原的小鼠单克隆抗体进行了研究。这种蛋白质的命名是根据研究者的所在地来的，Ki 代表着德国基尔大学(Kiel University)，而 67 则表示 96 孔板上的克隆编号<sup>[46]</sup>。Ki67 在非 G0 期(非休眠期)，即细胞周期 G1、S、G2 和 M 期中广泛表达，因此 Ki67 蛋白可被用来标记细胞是否正在活跃地进行 DNA 复制和是否进入细胞周期。

PH3 表示在第 10 位丝氨酸(Ser10)位置上发生磷酸化的组蛋白 H3。PH3 是一种 M 期特异的标志物，尤其是在有丝分裂过程中的前期和中期。因此，检测 PH3 可作为评估细胞处于有丝分裂过程中的有效方法。

Aurora B 也称为 “Aurora kinase B”，属于极光激酶(Aurora kinases)家族的一员。Aurora kinases 最早是在果蝇中被发现，其突变导致细胞在有丝分裂过程中，中心小体不能正常分离，出现单极纺锤体而得名。Aurora B 在细胞有丝分裂的各个阶段，特别是在染色体的分离和纺锤体的形成中发挥重要的调控作用，因此其功能对细胞分裂的顺利进行至关重要。Aurora B 的表达和活性在 M 期达到高峰，并具有特征性的定位。在有丝分裂后期至终末期，Aurora B 从着丝粒移向中心体，参与胞质分裂。因此，Aurora B 被用于检测心肌细胞有丝分裂/胞质分裂<sup>[18]</sup>。

### 2.2.3.2 BrdU/EdU 染色

5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)和 5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶(5-bromo-2'-deoxyuridine, EdU)是两种合成的核苷类似物。它们可以被细胞摄取并嵌入到新合成的 DNA 中，因此被广泛用于标记正在合成 DNA 的细胞，从而检测心肌细胞增殖。然后，由于心肌细胞 DNA 复制并不代表细胞增殖，并且 DNA 修复也会导致 BrdU/EdU 阳性，因此单独使用该指标评估心肌细胞增殖可能并不准确，一般需联合其它指标或谱系示踪技术。BrdU/EdU 检测不仅可以在组织切片中进行，还可以通过胰酶/胶原酶对全心进行消化制备心肌细胞悬液进行。BrdU/EdU 阳性的单核心肌细胞被认为更可能是增殖的心肌细胞<sup>[18]</sup>。

### 2.2.3.3 细胞周期标记与心肌特异性标记的联合应用

在心脏组织切片中，确定细胞周期标记阳性的细胞核是属于心肌细胞还是相邻的间质细胞具有一定难度。通过共染色技术，可显著提高标记心肌细胞的准确性。例如，使用小麦胚芽凝集素染色(wheat germ agglutinin, WGA)来环绕细胞膜，以及使用心肌细胞核的特异性标记，如 PCM1、Nkx2.5、MEF2 和 GATA4，都可明显提高标记细胞周期活跃的心肌细胞的准确性<sup>[47]</sup>。

### 2.2.4 MIMS 技术

MIMS 是结合了离子显微镜和质谱的高分辨率成像技术。在给小鼠 <sup>15</sup>N 同

位素标记的胸腺嘧啶( $^{15}\text{N}$ -thymidine)标记 DNA 复制后, MIMS 可以小于一微米立方的精度, 定量分析  $^{15}\text{N}$ : $^{14}\text{N}$  比值并生成高空间分辨率图像。

与 BrdU/EdU 相比, MIMS 具有以下明显优势:  $^{15}\text{N}$  是非放射性稳定同位素示踪剂, 不会对细胞内生化反应造成影响, 且对有机体无害; MIMS 图像的超高分辨率可区分 DNA 合成与 DNA 修复, 因为 MIMS 图像显示 DNA 修复所掺入的  $^{15}\text{N}$ -thymidine 指数级少于 DNA 合成。MIMS 本身的分辨率足以区分心肌细胞与非心肌细胞, 结合谱系示踪可进一步研究心肌细胞增殖的来源。联合 Y 染色体 DNA 原位杂交, 可帮助区分发生 DNA 复制的细胞核是否发生多倍体化(同时满足单核、2 倍体检测), 高  $^{15}\text{N}$ : $^{14}\text{N}$  比值信号的心肌细胞被认为是完成增殖的心肌细胞<sup>[9]</sup>。

MIMS 帮助揭示了成年心肌细胞增殖的来源为原有心肌细胞, 成年心脏每年的更新比率约为 4.4%, MI 后 8 周, 梗死边缘区 23% 的心肌细胞发生 DNA 复制, 但仅 3.2% 的心肌细胞最终完成增殖<sup>[9]</sup>。小鼠 MI 后进行 8 周跑步运动可诱导心肌细胞增殖, 修复梗死心肌<sup>[48]</sup>。

### 2.2.5 谱系示踪技术

通过谱系示踪技术, 利用心脏特异性的 Cre/Dre 重组酶对心肌细胞进行标记, 是研究在体心肌细胞增殖的强大工具。目前已经成功开发了多种小鼠模型, 用以跟踪心脏发育过程中或损伤后的心肌增殖(图 1)。值得注意的是, 谱系示踪常用的 Cre-loxP 系统需设立严格的对照, 有研究报道 Myh6-MerCreMer 或 Myh6-Cre 在诱导后即使在没有 loxP 位点存在的情况下, 亦可导致心肌细胞 DNA 损伤以及心功能下降。因此, 在研究中设置合适的对照具有必要性<sup>[49]</sup>。

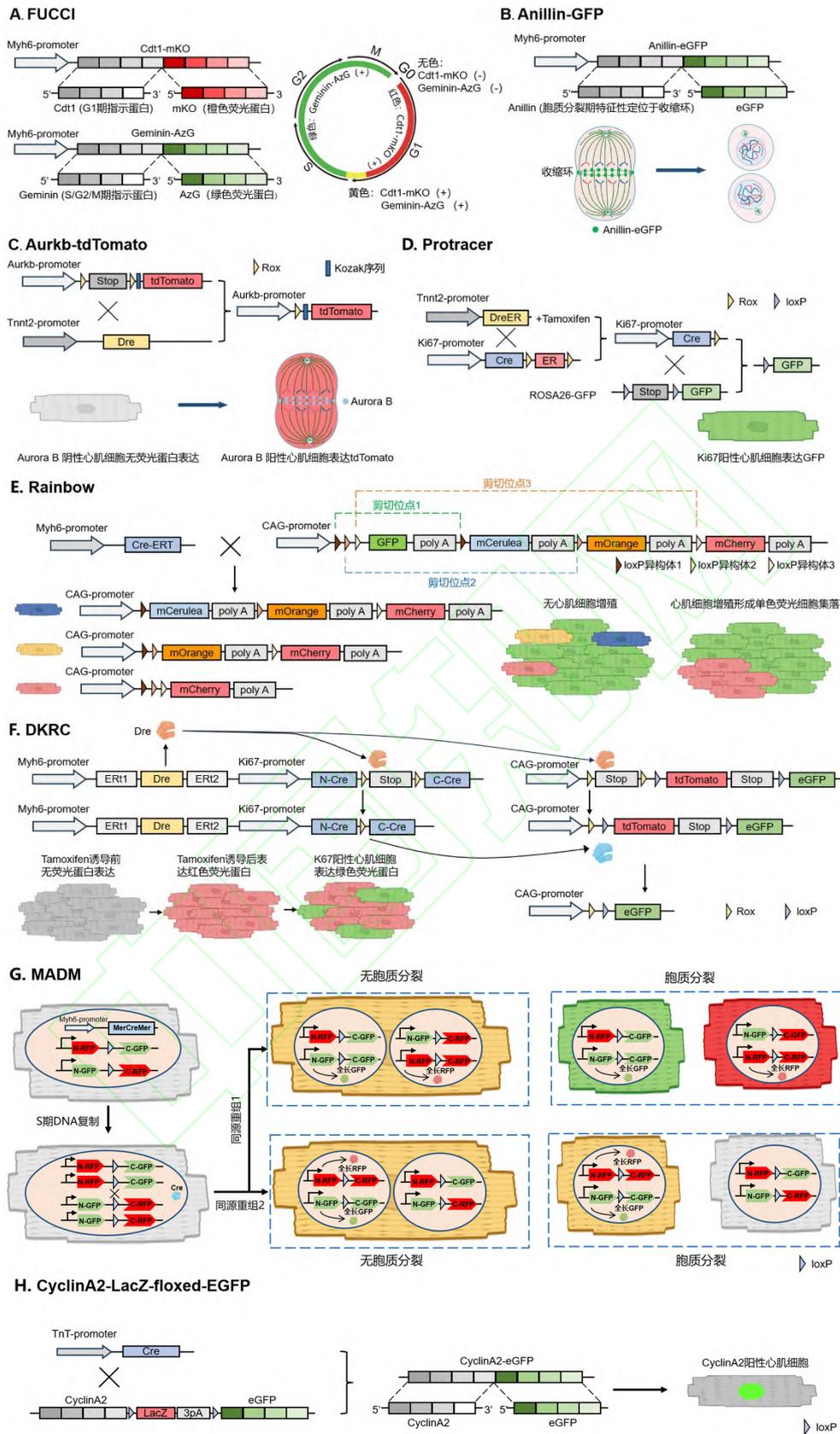


图 1. 研究心肌细胞增殖的谱系追踪小鼠模型。A: FUCCI 小鼠: 单体 Kusabira 橙色(mKO) 与 Cdt1 融合, 标志 G1 期的橙色荧光。Azami 绿色(AzG)与 Geminin 融合, 标志 S/G2/M 期的绿色荧光。细胞周期中 mKO-Cdt1 和 AzG-Geminin 通过泛素化交替表达提供了从 G1 期到

有丝分裂晚期细胞周期各阶段的直接可视化。**B: eGFP-Anillin 小鼠:** Anillin 是细胞周期中 M 期收缩环的组成部分。Anillin 与 eGFP 的融合蛋白在 Myh6 启动子驱动下表达。eGFP-Anillin 在 G1/S/G2 期位于核内, 在 M 期核溶解后转移到细胞质, 并在细胞分裂过程中位于收缩环。**C: Aurkb-tdTomato 小鼠:** 在 Dre 剪切酶诱导重组后, tdTomato 编码序列直接定位在 Aurkb 启动子后面。由于 Aurkb 主要在 G2/M 期表达, 这种工具能够独特地标记接近细胞分裂的 G2/M 期活跃心肌细胞。**D: ProTracer 小鼠:** 通过 Cre-loxp/Dre-rox 双重重组系统生成特异于心脏的 Ki67 启动子-Cre/Rosa26-GFP 小鼠系, 能够在任意定义的时间窗口内持续记录表达 Ki67 的细胞并用永久性遗传标记 GFP 标记。**E: Rainbow 小鼠:** GFP、mCerulean、mOrange 和 mCherry 被插入彩虹小鼠的 Rosa26 (R26) 位点。与 Myh6-CreER2 小鼠杂交时, 激活的 Cre 切除了围绕 DNA 区域前的随机一对 loxP 位点, 导致受影响细胞及其后代不可逆地表达荧光蛋白。单个祖先细胞的子代细胞很容易被识别, 因为它们表现为局部同色细胞团。**F: DKRC 小鼠:** 他莫昔芬暴露诱导心肌细胞特异性 Dre 表达, 进而导致两个 STOP 序列的切除, 并导致 tdTomato 和活性 Cre 的表达。任何重新进入细胞周期的心肌细胞, 如 Ki67 启动子激活所定义的, 表达 Cre 并切除 tdTomato-STOP 序列, 导致 eGFP 的表达。**G: MADM 小鼠:** 在此模型中, 由于 S 期后染色体间 Cre-loxP 介导荧光蛋白片段重组, 一个分裂细胞的两个子细胞被永久标记为 GFP<sup>+</sup> 或 RFP<sup>+</sup>。**H: CyclinA2-LacZ-floxed-EGFP 小鼠:** 该工具模型将 LacZ-floxed-EGFP 构建到 CyclinA2 基因座, 由心肌细胞特异性 Cre 将 LacZ-floxed 剪切掉后, 表达 CyclinA2-EGFP 融合蛋白, 以实现心肌细胞周期的监测。**MADM: 双荧光标记镶嵌分析小鼠; GFP: 绿色荧光蛋白; eGFP: 增强型绿色荧光蛋白; RFP: 红色荧光蛋白;  $\alpha$ DRKC:  $\alpha$ MHC-MerDreMer-Ki67p-Roxed Cre; RLTG: Rox-Lox-tdTomato-eGFP; Tnnt2: 心肌肌钙蛋白 T 型 2; Myh6: 肌球蛋白重链 6。**

### 2.2.5.1 FUCCI 报告基因鼠

荧光泛素化细胞周期示踪系统(fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator, FUCCI)使用两个荧光探针, 即橙色荧光蛋白 Kusabira-Orange (mKO)和绿色荧光蛋白 Azami-Green (AzG)。在 FUCCI 系统中, mKO 与细胞周期 G1 期指示蛋白 hCdt1 融合, 而 AzG 与 S/G2/M 期指示蛋白 Geminin 融合。在细胞周期进程中, 由泛素化介导的 mKO-Cdt1 和 AzG-Geminin 之间的交替使得从 G1 期到 M 期的细胞周期阶段可直接可视化<sup>[43]</sup>。FUCCI 报告鼠可以与  $\alpha$ MHC-Cre 鼠繁育, 从而生成心肌特异性的 FUCCI 系统, 以反映心肌细胞的细胞周期进程<sup>[50]</sup>(图 1A)。

### 2.2.5.2 eGFP-Anillin 小鼠

Anillin 是胞质分裂期间收缩环(contractile ring)的固有组成蛋白, 其亚细胞定位随细胞周期发生变化。在 M 期, Anillin 在中心体的对称分布, 以及与分裂中的姊妹细胞具有较长间距, 与最终发生胞质分裂高度相关。相反, Anillin 在中心体的不对称分布, 以及与姊妹细胞之间距离较短, 则提示细胞多核化的命运。因此, Anillin 的亚细胞分布特征被认为有助于评价心肌细胞的胞质分裂。

在 eGFP-Anillin 小鼠中, eGFP-Anillin 融合蛋白在 Myh6 启动子的控制下表达, 从而实现对 M 期心肌细胞的可视化。通过 Anillin 在中心体是否呈对称分布, 以及距离姊妹待分离细胞的距离远近两个标准, 有助于区分心肌细胞的胞质分裂和多核化<sup>[51]</sup>(图 1B)。

### 2.2.5.3 Aurkb-tdTomato 小鼠

Aurkb-tdTomato 小鼠通过 Aurkb 的表达同步、实时标记增殖心肌细胞。由于 Aurkb 表达在 M 期间达到顶峰, 该工具能够标记 M 期活跃的心肌细胞, 与 Ki67 相比更接近于细胞分裂。该系统利用 Tnnt2 驱动表达的 Dre, 将 Aurkb(promoter)-rox-Stop-rox-tdTomato 的 Stop 序列剪切, 形成 Aurkb(promoter)-rox-tdTomato, 使任何表达 Aurkb 的细胞均同步表达 tdTomato。体外共培养系统结合实时延时成像显示, 94.44%的 tdTomato<sup>+</sup>P1 心肌细胞经历了完整的胞质分裂。该系统揭示在 P1 小鼠心脏中, tdTomato<sup>+</sup>心肌细胞占左心室总心肌细胞数的 3.92%, 在 P7 的心脏中减少到 1.57%, 在成年心脏中降至 0.1%~0.2%。此外, P1 新生小鼠的心尖切除损伤增加了 tdTomato<sup>+</sup>心肌细胞的数量, 但成年小鼠 MI 却并未增加心脏 tdTomato<sup>+</sup>心肌细胞数<sup>[52]</sup>(图 1C)。

### 2.2.5.4 ProTracer 小鼠

ProTracer 系统使用 Ki67 标记增殖的心肌细胞, 其优势在于可长期持续记录心肌细胞增殖<sup>[46]</sup>。传统的 Ki67-CreER 系统标记心肌细胞增殖, 依赖于持续给与他莫昔芬(Tamoxifen)对 CreER 的激活。由于 Tamoxifen 通常不用于长期给药, 因此传统工具很难在长时间内(如数月)持续记录 Ki67 基因活性。考虑到较短时间窗内成年心肌细胞增殖极其稀少, ProTracer 对记录较长时间段内的心肌增殖具有积极意义。

ProTracer 使用 Cre-loxP/Dre-rox 双重重组系统。Tnnt2-DreER 在 Tamoxifen 诱导后, 可将 Ki67(promoter)-Cre-rox-ER-rox 的 ER 通过 Dre-rox 重组切除, 从而得到 Ki67(promoter)-Cre-rox, 一旦细胞在任何时间表达 Ki67, 可同步诱导 Cre 重组酶的表达, 将 GFP 序列前的 loxP-Stop-loxP 序列剪切掉, 使细胞标记上 GFP。

ProTracer 系统发现, 小鼠出生后心肌细胞增殖虽持续下降, 但仍持续至青春前期<sup>[53]</sup>; 验证了成年小鼠每年的心肌增殖比率约在 4.4%; 此外, 它还显示成年小鼠 MI 后, 梗死区和梗死边缘区的心肌细胞进入细胞周期, 而这些心肌细胞

显示出空间特异性，高度局限于左心室心内膜下心肌。通过连续心脏切片，ProTracer 系统还揭示了约 13%被 Ki67 标记的成年心肌细胞最终完成分裂<sup>[41]</sup>(图 1D)。

#### 2.2.5.5 Rainbow 小鼠

Rainbow 小鼠使用 3 对串联的 loxP 位点围绕不同的荧光蛋白编码框(GFP、RFP、mCerulean 和 mOrange)。未经诱导的细胞表达 GFP 绿色荧光，心肌特异性 Cre 对荧光蛋白编码框进行剪切重组，从而随机产生三种不同颜色荧光的心肌细胞，由于单个心肌细胞增殖后的子代细胞均表达同一种荧光蛋白，通过单色荧光细胞集落的大小，可判断心肌是否增殖。然而，由于标记的随机性，相邻的心肌存在极小概率被标记为相同颜色，而不是来源于心肌细胞增殖。基于该工具鼠的研究结果显示，MI 可刺激新生小鼠心肌细胞增殖，在成年小鼠心脏中则无此效果<sup>[54]</sup>(图 1E)。Confetti 小鼠是 Rainbow 小鼠的衍生版本，其不同之处在于只有在 Cre-loxP 同源重组发生后细胞才被标记荧光，并且 nGFP 和 mCFP 荧光蛋白的设计使其得以标记细胞核或细胞膜，该小鼠被用于研究 miR-302/水凝胶原位注射对 MI 后心肌细胞再生的影响<sup>[55]</sup>。

#### 2.2.5.6 $\alpha$ DKRC/RLTG 小鼠

$\alpha$ MHC-MerDreMer-Ki67p-RoxedCre ( $\alpha$ DKRC) : Rox-Lox-tdTomato-eGFP (RLTG)小鼠在 Tamoxifen 诱导后可将全部心肌细胞标记为 tdTomato，而此后发生增殖的心肌细胞由 tdTomato 变为 eGFP。

该系统利用 Dre-rox 与 Cre-loxP 双重诱导。诱导后的 Dre 将所有心肌细胞标记为 tdTomato，并同时剪切掉 Ki67 promoter-Cre(N-terminus)-rox-Stop-rox-Cre(C-terminus)中的 Stop 序列，使得全长 Cre 可在 Ki67 启动子驱动下得以表达。Cre 剪切掉位于 eGFP 前的 loxP-tdTomato-Stop-loxP 序列后，使细胞由表达 tdTomato 变为表达 eGFP<sup>[42]</sup>。

根据 eGFP 阳性的心肌细胞单个分布还是形成集落，可协助判断进入细胞周期的心肌细胞是否发生增殖。成年  $\alpha$ DKRC/RLTG 小鼠在心肌 I/R 损伤后，eGFP 阳性心肌细胞是假手术组的 3.5 倍，但单个 eGFP 与成对 eGFP 心肌细胞的比例为 9:1，表明心肌损伤后 Ki67 阳性的心肌细胞仅有少部分完成增殖<sup>[42]</sup>(图 1F)。

#### 2.2.5.7 双标记嵌合分析(mosaic analysis with double markers, MADM)小鼠

MADM 小鼠模型可明确地识别增殖后心肌细胞。MADM 小鼠由 MADM-GT 与 MADM-TG 小鼠杂交而得，GT 与 TG 代表红色/绿色荧光蛋白非全长片段的排列顺序。在该模型中，编码非全长荧光蛋白(如 RFP 和 GFP)片段的 DNA 被整合到基因组，细胞在 S 期进行 DNA 复制后，由于染色体间的 Cre-loxP 同源重组，可导致分裂后的两个子细胞分别具有不同颜色的全长荧光蛋白标记(GFP 或 RFP)。因此，每当一个细胞分裂，它的两个子细胞将被明确地、永久地标记。

该模型的明显优势是单色的细胞无可争议地表明是已经分裂的心肌细胞。该模型同样存在局限性，由于染色体间重组的随机性，不是所有分裂的子细胞都会被标记为单一颜色，因此可能低估了真实的增殖率。在小鼠出生后第一周，11%的标记细胞表达单色荧光蛋白，而到 3 个月时这个数字减少到 2.5%。在该模型中，MI 后第 4 周并没有观察到明显的成年心肌细胞增殖。转录组测序结果提示，增殖后子代心肌细胞的表达谱特征更接近成年心肌细胞，而不是新生心肌细胞，表明这些子代细胞发生了再分化<sup>[13]</sup>(图 1G)。

#### 2.2.5.8 CyclinA2-LacZ-floxed-EGFP 小鼠

CyclinA2 是表达于 G1 中期-M 期中期的细胞周期蛋白。该工具小鼠将 LacZ-floxed-EGFP 序列构建到 CyclinA2 基因座，与 CyclinA2 形成融合蛋白，使细胞表达 CyclinA2-β-gal。在与 Troponin T-Cre 小鼠杂交后，可由心肌细胞特异性表达的 Cre 将 LacZ-floxed 剪切，从而表达 CyclinA2-EGFP，标记进入细胞周期的心肌细胞。与 FUCCI 小鼠相比，该系统使用单色荧光，更有利于多重染色。利用该系统，研究者揭示了在 P0~P1 小鼠，右心室 CyclinA2-EGFP 阳性的心肌细胞比例少于左心室；此外，小鼠在 P15 并没有再次出现心肌细胞增殖的高峰，这与 Husain 团队关于小鼠在青春前期(P15)出现心肌细胞增殖高峰的报道相反<sup>[56, 57]</sup>。

#### 2.2.6 空间转录组学

尽管单细胞测序可在细胞水平提供不同细胞亚群的详细信息，但这些细胞在空间解剖上如何分布却并不清楚。利用空间转录组学技术，Olson 团队报道了 NYFa 对心肌细胞增殖的调控作用具有空间异质性。在胚胎期小鼠心脏，根据表达谱特征，较为成熟的心室肌细胞可分为 3 个细胞群(M-VCM1, M-VCM2 和 M-VCM3)，这些细胞均匀分布于致密心肌或室间隔；而表达谱呈幼稚状态的心室

肌细胞亦分为 3 群，其中 F-VCM1 广泛分布于心室，F-VCM2 分布于心室近小梁区，而 F-VCM3 则分布于致密心肌或室间隔。此外，空间转录组学技术还鉴定出分布于肌小梁区的细胞亚群 T-VCM1 和 T-VCM2，以及分布于心外膜、表达 ECM 的心肌细胞亚群 CME<sup>+</sup>，其中 F-VCM1-3、CME<sup>+</sup>的表达谱与单细胞测序中具有再生能力的 CM4 亚群具有高度重合。在敲除心肌细胞增殖调控因子 NFY $\alpha$  的胚胎期小鼠心脏，F-VCM1 的比例下降，而小梁区细胞群 T-VCM1 和 T-VCM2 的比例升高，提示增殖信号可能通过影响位于不同空间位置的细胞亚群调控心肌增殖<sup>[58]</sup>。通过这些空间细节，空间转录组学为心肌细胞增殖研究提供了更为全面的视野。

### 2.2.7 其它技术

IQGAP3 (IQ motif containing GTPase activating protein 3)和 RhoA (ras homolog family member A)激酶是调控细胞骨架的关键蛋白。在胞质分裂阶段，这两种蛋白对称性定位到中心体间隙上的肌动蛋白环(actomyosin ring，收缩环的核心成分)，促进分裂沟(cleavage furrow)的形成和由此引起的细胞分裂。细胞延时摄像实验证实，IQGAP3 和 RhoA 没有正确地定位到肌动蛋白环与心肌细胞不能完成胞质分裂，而代之以多核化相关。因此，IQGAP3 和 RhoA 的细胞定位被认为可用于区分细胞分裂与多核化。由于该方法需要观察大量共聚焦显微镜图片，以及其形态判断依赖于观察者的经验，并不适合运用于高通量检测心肌细胞增殖<sup>[18]</sup>。

### 2.2.8 不同工具对心肌再生能力的评估存在差异

由于心肌细胞再生是涉及多个层面的复杂过程，不同的检测工具采用的评价指标不同，可能导致对心肌再生能力的评估存在一定差异。例如关于 MI 在成年小鼠是否诱导心肌增殖，基于 Ki67、DNA 复制的检测系统可观察到 MI 后进入细胞周期的心肌细胞数目增加；在 MADM 小鼠<sup>[13]</sup>、Aurkb-tdTomato 小鼠<sup>[52]</sup>以及 Rainbow 小鼠<sup>[54]</sup>等以胞质分裂/心肌细胞数目增加为检测指标的检测体系中，与 Sham 相比 MI 并没有诱导明显的心肌增殖<sup>[9]</sup>(表 2)。造成这些结果出现不一致的原因，可能是由于各个检测系统的局限性导致的对心肌增殖的高估或低估。例如 Ki67、DNA 复制提示心肌细胞进入细胞周期，但这些心肌细胞不一定完成胞质分裂，可能会导致对增殖比率的高估。另一方面，MADM 小鼠可能存在发

生同源重组和胞质分裂但亦不能成功表达单色荧光的情况；Rainbow 小鼠的单色细胞集落可能来源于标记的随机性而不是来源于细胞增殖，增殖后心肌细胞可能发生迁移，导致集落数目发生变化；Aurkb-tdTomato 为实时、非永久性标记，可能会遗漏掉已完成胞质分裂的心肌细胞，这些特性可能导致对实际心肌增殖比率的低估。因此，能够更加准确地评估心肌增殖的工具有助于进一步明确该问题。

表 2. 不同工具对心肌再生能力的评估存在差异

检测指标	检测工具/方法	检测原理	检测时间点	主要结论	MI 是否促进心肌增殖	文献
Ki67	Protracer 小鼠	通过 ProTracer 将表达 Ki67 的心肌细胞标记，通过连续切片显示成对阳性标记的心肌细胞定义为增殖心肌细胞	MI 后第 8 周	梗死边缘区 6.5% 的心肌细胞进入细胞周期 (6.5% vs 0.6%, MI vs Sham), 2.6% 的心肌细胞完成增殖	是	[38]
DNA 复制	MIMS	通过 MIMS 检测发生细胞核复制的心肌细胞，通过 Y 染色体显示单倍体，同时满足单核、2 倍体，高 <sup>15</sup> N: <sup>14</sup> N 信号的心肌细胞被认为是增殖心肌细胞	MI 后第 8 周	梗死边缘区 23% 的心肌细胞进入细胞周期 (23% vs 0.5%, MI vs Sham), 3.2% 的心肌细胞完成增殖	是	[9]
Ki67	$\alpha$ DKRC/RTLg 小鼠	通过 $\alpha$ DKRC/RTLg 将表达 Ki67 的心肌细胞标记，成对阳性心肌细胞被认为是增殖心肌细胞	I/R 后 2 周	梗死边缘区 I/R 组标记阳性心肌细胞是 Sham 组的 3.5 倍，其中 10% 的标记心肌细胞完成增殖(成对出现)	是	[39]
胞质分裂	MADM 小鼠	染色体同源重组诱导发生复制的子代细胞核表达 GFP 或 RFP，完成胞质分裂的子代细胞可表达为 GFP 或 RFP 单色荧光	MI 后 4 周	MI vs Sham 无明显差异(单色细胞比率 0.16%)	否	[13]
Aurora B	Aurkb-tdTomato 小鼠	通过 Aurkb-tdTomato 小鼠将表达 Aurkb 的心肌细胞标记为 tdTomato 阳性	MI 后 2 周	MI vs Sham 无明显差异(阳性细胞比率 0.14%~0.2%)	否	[49]
胞质分裂	Rainbow 小鼠	随机标记为单色荧光的心肌细胞集落大小 ( $\geq 2$ 被认为是增殖心肌细胞)	MI 后 3 周	梗死+梗死边缘区 vs 远端区无明显差异	否	[51]

该表描述了不同检测工具由于其工作原理的不同，对 MI 是否促进心肌细胞再生得出的结论存在差异。I/R: 缺血再灌注损伤；MI: 心肌梗死；Sham: 假手术组；tdTomato: 红色荧光蛋白衍生体；MIMS: 多同位素成像质谱。

### 2.3 心肌细胞增殖靶点的干预策略

**细胞转染/感染:** 在新生大鼠原代心肌细胞(neonatal rat ventricular myocytes, NRVMs)等原代心肌细胞, 脂质体 lipofectamine、RNAimax 等工具介导的 siRNA 转染, 或体外获得的 mRNA 转染可实现对特定基因的敲低或过表达, 但通过脂质体在 NRVMs 转染过表达质粒的效率极低。相反, 腺病毒(adenovirus, Ad)对 NRVMs 具有极高的感染和表达效率。

**腺相关病毒与 Ad:** 9 型腺相关病毒(adeno-associated virus type 9, AAV9)仍然是在小鼠和猪等模型在体操纵基因表达的优势工具, 具有细胞毒性和免疫原性低、表达时间长等优势。AAV9 的给药方式包括尾静脉注射(小鼠)、冠脉内注射(猪)与心肌内原位注射(猪、小鼠), 在大多数以猪为模型的实验中, 心肌内原位注射较为常用。Ad 也可用于在体实验。Ad 具有携带量大, 可同时表达多个基因, 表达快速(感染后 24~48 h 达到峰值)的优势, 适用于过表达多个基因的组合(如细胞周期基因“4F”组合<sup>[59]</sup>或“OSKM”转录因子组合<sup>[60]</sup>)。与 AAV9 相比, Ad 有免疫原性大、表达持续时间短的限制性。

**Cre-loxP 及 Dre-rox 系统:** 在心肌再生研究中, Cre-loxP 和 Dre-rox 系统是两种强大的基因操作工具, 它们允许研究人员在特定的细胞类型或组织中精确控制基因表达。这些系统通过利用细菌来源的重组酶(Cre 和 Dre)和它们各自识别的 DNA 位点(loxP 和 rox 位点), 在这些位点间进行精确的 DNA 切割和重连来实现特定基因的敲除或激活。利用心肌特异性表达基因的启动子来驱动 Cre 或 Dre 的表达, 可实现在某特定细胞或组织类型对基因进行调控。Myh6<sup>[13]</sup>和 Tnnt2<sup>[41]</sup>是最为常用的心肌细胞特异性启动子。将 Cre 酶与突变的雌激素受体(mutated estrogen receptor, Mer)构建融合蛋白(MerCreMer), 利用 Mer 不与内源性雌激素结合, 仅能与雌激素类似物 Tamoxifen 结合, 并在结合 Tamoxifen 后从胞质进入到胞核的特性, 使 MerCreMer 仅在暴露于 Tamoxifen 的特定时间内能够结合到基因组 DNA, 实现对基因的时间特异性调控<sup>[61]</sup>。Cre-loxP 及 Dre-rox 两种系统的配合使用, 允许研究人员对多重限定条件的细胞进行标记。例如, 在 ProTracer 小鼠中, Tnnt2-Dre 确保了对心肌细胞进行特异性标记, 而 Ki67-Cre 进一步实现了对 Ki67 阳性的心肌细胞进行标记<sup>[41]</sup>。

**CRISPR/Cas9:** CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9)是一种先进的基因编辑工具, 在

引导 RNA(guide RNA, gRNA)的定位下, 具有 DNA 切割功能 Cas 9 可对基因组中的特定序列实现精确的基因敲除、替换或插入。与 Cre-loxP/Dre-rox 系统相比, CRISPR/Cas9 具有编辑效率高的特点, 除了用于基因敲除以外, 还可以通过不同的 Cas 变体进行基因激活、抑制、编辑。CRISPR/Cas9 系统同样被运用于心肌细胞增殖的研究。利用 CRISPR/Cas9 技术, 研究者在小鼠在体心肌细胞中敲除了非编码 RNA *Snhg1* [62]或 *LDHA* [63], 以探究其对心肌细胞增殖的影响。CRISPR/Cas9 系统的另一优势是在培养细胞中实现对基因的敲除或多个基因的过表达, 例如在人的 iPSCs 细胞中敲除 NOTCH1, 以研究其对心肌细胞增殖和分化的影响[64]。在人的成纤维细胞中, 过表达失活的 Cas9 (dCas9)与转录激活因子 VP64的融合蛋白(dCas9-VP64), 在不同的gRNA引导下, 可同时实现对 *Gata4*、*Hand2*、*Mef2C* 和 *Tbx5* 的过表达, 从而将成纤维细胞转分化为诱导多能心脏前体细胞[65]。

**CRISPR-CasRx:** 与 CRISPR/Cas9 编辑 DNA 不同, CRISPR-CasRx 系统用于 RNA 层面的干预。它不需要 PAM 序列, 通过其内含的 RNase 活性对靶 RNA 进行切割和降解。通过 *Myh6-Cre* 驱动的 CasRx 在小鼠心肌特异性敲低 *Meis1* 和 *Hoxb13*, 可促进 MI 后的心肌细胞增殖与心肌修复。与 RNA 干扰技术相比, CRISPR-CasRx 具有更高的特异性, 发生脱靶效应的概率更低[66]。

**modRNA:** modRNA 指在体外转录、获得 mRNA, 并对 mRNA 进行一系列化学修饰, 以提高其稳定性和翻译效率、降低免疫原性, 再将其应用到离体细胞或全身各组织的技术。modRNA 具有免疫原性低, 瞬时、局部、高效过表达的特性。modRNA 主要的化学修饰包括: 用尿苷衍生物 N1-甲基伪鸟苷(N1-Methylpseudouridine)替代尿苷; 在 mRNA 的 5'加入 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (anti reverse cap analog, ARCA)帽子结构, 其中 3'-O-Me 代表核糖 3'位上的氧原子(O)被甲基(Me)所取代。ARCA 结构能够减少 mRNA 引起的免疫反应, 帮助 mRNA 被翻译起始复合物所识别, 提高 mRNA 的翻译效率, 并抵抗核酸酶从而增加 mRNA 的稳定性[67]。

通过对 modRNA 进行进一步改造, 可实现心肌细胞特异性过表达特定基因。在 *Pkm2* 调控心肌细胞增殖的研究中, 研究者设计了两条 modRNA (modRNA1 和 modRNA2), modRNA1 的基本结构为 5'UTR-L7Ae-cardiac specific miRs

recognition element-3'UTR。modRNA2 基本结构为 5'UTR-Kinc-turn motif(K-motif)-Pkm2-3'UTR。modRNA1 中编码的古细菌核糖体蛋白 L7Ae, 可与 modRNA2 中的 K-motif 结合, 阻碍 modRNA2 的翻译。当存在心肌特异性 miRs 时, 这些 miRs 通过结合到 modRNA1 的识别原件, 将 modRNA1 降解, 从而解除 modRNA1 对 modRNA2 的翻译抑制, 实现心肌细胞特异性过表达 Pkm2。将改造的 modRNA 在 MI 造模时注射到小鼠心肌, 可在注射后 2 天检测到 Pkm2 蛋白水平和活性的增加, 并持续到注射后 8~12 天<sup>[33]</sup>。通过 modRNA 在小鼠和猪心肌过表达 Pkm2<sup>[33]</sup>或 CCND2<sup>[68]</sup>, 均可促进 MI 后心肌细胞增殖与心肌修复。

**Tet-on 系统:** 在工具载体中加入 Tet-on 系统, 利用四环素(tetracycline, Tet)或多西环素(doxycycline, Dox)的存在与否, 可决定反向四环素转录激活因子(reverse tetracycline transactivator, rtTA)是否与四环素反应原件(tetracycline responsive element, TRE)结合并启动下游基因转录的特性, 对基因表达的时间窗进行可控调节。例如心肌注射 AAV9-TRE-miR-294- $\alpha$ MHC-rtTA 可依赖于 Dox 的给药时间, 在选定时间窗内同步表达 miR-294, 从而避免永久表达带来的不良反应<sup>[69]</sup>。

## 四、心肌再生能力的影响因素

### 1 内外环境因素

**环境氧浓度:** 啮齿类动物的谱系示踪实验证实, 较低的环境氧浓度(7%)可延长新生个体心肌再生的时间窗, 并促进成年个体 MI 后的心肌再生与修复<sup>[12]</sup>。哺乳动物从母体内到出生后, 环境氧气浓度骤然升高, 心肌细胞更多利用氧气供能, 这一过程导致 ROS 产生增加。心肌细胞内 ROS 水平升高导致的 DNA 损伤是阻碍 DNA 复制和细胞周期推动的重要因素<sup>[5]</sup>, 清除 ROS<sup>[5, 70]</sup>, 或促进 DNA 损伤后修复<sup>[71]</sup>, 可延长出生后心肌增殖时间窗和刺激成年心肌再生。

**运动应激:** 运动可促进心肌细胞再生, 改善 MI 后心功能。对小鼠进行跑步、游泳等运动训练, 可显著提高 Ki67 阳性的的心肌细胞数目<sup>[72-74]</sup>。MIMS 发现, 小鼠 MI 后进行跑步运动 8 周可将心肌细胞增殖能力提高约 8 倍<sup>[48]</sup>。心脏环状 RNA (circular RNA, circRNA) circUtrn, 长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) CPhar、微小 RNA (microRNA, miRNA) miR-222 的上调, 以及 PI3K、EGFR 等信号通路的激活与运动促心肌细胞再生作用有关, 但运动引起上述改

变的作用机制尚不清楚<sup>[74, 75]</sup>。

**心室机械张力：**心室内机械张力升高被认为是心肌细胞增殖的抑制因素。在心力衰竭患者，长期使用左心室辅助装置(left ventricular assist device, LVAD)可减轻心室压力，诱导成年心肌细胞重新进入细胞周期。与植入 LVAD 之前的心脏相比，植入 LVAD 后的心脏其心肌细胞大小减少了 45%，线粒体含量减少了 60%，而 Ki67、PH3、Aurora B 阳性的心肌细胞数显著增加，该作用的机制尚不清楚，推测可能与降低氧耗和 DNA 损伤有关<sup>[76]</sup>。

**甲状腺素等内分泌激素：**心肌细胞增殖能力受到内分泌的调控。小鼠出生后不久，血液中的甲状腺激素水平急剧上升超过 50 倍，这与小鼠代谢、产热水平的增加、心肌细胞退出细胞周期、形成双核以及失去再生能力的变化趋势相一致。使用丙基硫氧嘧啶(propylthiouracil, PTU)阻断甲状腺激素合成，或抑制甲状腺激素受体  $\alpha$  (thyroid hormone receptor  $\alpha$ , TR $\alpha$ )功能，均可引起心肌细胞数量增加约 3 倍<sup>[6]</sup>。这些数据表明，围产期的甲状腺激素信号在心肌细胞退出细胞周期和多倍体化中发挥重要作用。除甲状腺素外，儿茶酚胺也是调控心脏功能的重要激素，抑制  $\beta$  肾上腺素受体可激活 Yap-1/Ect2 信号，促进心肌细胞增殖<sup>[77]</sup>。

在围产期，孕激素水平的急剧减少也与心肌退出细胞周期有关。在胎儿发育期间，孕酮由胎盘和/或卵巢黄体产生供应。新生小鼠离开母体后，血清孕酮水平急剧下降。补充孕酮可通过上调 YAP 的表达促进小鼠心肌细胞增殖与损伤后修复<sup>[78]</sup>。

## 2 微环境因素

**炎症与免疫：**在 MI 诱导心肌损伤的情况下，炎症反应相关基因的表达水平在 P1 小鼠心肌显著上调，而在 P8 小鼠却未观察到这种变化<sup>[79]</sup>，基于单细胞测序的细胞互作分析揭示了巨噬细胞来源的分泌因子参与心肌损伤后再生<sup>[28]</sup>，这些结果提示炎症反应是调控心肌细胞增殖能力的关键因素。以下实验证据为这一结论提供了支撑：炎症诱导剂 Zymosan 具有促进成年小鼠 MI 后心肌增殖的作用<sup>[80]</sup>；相反，新生免疫缺陷小鼠(NOD/SCID)在进行心尖切除后其心肌不能再生<sup>[81]</sup>。此外，给与新生小鼠/猪地塞米松抑制炎症，也明显阻碍了心肌再生<sup>[80, 82]</sup>。

不同的免疫细胞显示出对心肌再生差异化的调控作用。与 P14 小鼠相比，P1 小鼠心脏在 MI 后具有更多的巨噬细胞浸润，通过 Cl<sub>2</sub>MDP-L 清除 P1 小鼠巨

噬细胞，可抑制心尖切除后心肌再生<sup>[83]</sup>。反之，移植新生小鼠的巨噬细胞可促进成年小鼠 MI 后的心肌细胞增殖<sup>[84]</sup>。巨噬细胞对心肌再生的促进作用依赖于 IL-6<sup>[83]</sup>、oncostatin M<sup>[85]</sup>等因子的分泌，敲除上述因子可抑制小鼠心尖切除后的心肌再生。

从 T 细胞数量上来看，MI 后 P7 小鼠心脏较 P1 小鼠具有更多的 T 细胞浸润。从 T 细胞种类上进行区分，P1 小鼠心脏以  $\gamma\delta^+$  T 细胞浸润为主，而 P7 小鼠心脏以  $\alpha\beta^+$  T 细胞浸润为主，将成年小鼠的  $\alpha\beta^+$  T 细胞移植到 P1 小鼠，可抑制 MI 后心肌再生，该作用与  $\alpha\beta^+$  T 细胞分泌的  $\gamma$  干扰素(interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )有关<sup>[86]</sup>。值得注意的是，具有抑炎作用的调节性 T 细胞(regulatory T cell, T-reg)发挥促心肌增殖的作用。小鼠出生后，T-reg 在 T 细胞中所占比例逐渐下降，敲除 T-reg 抑制小鼠心尖切除后心肌再生，T-reg 的作用依赖于 Ccl24、Gas6、Areg 等旁分泌因子。这些结果表明炎症/免疫细胞对心肌增殖的调控可能依赖于特定的细胞种类和分泌谱<sup>[81]</sup>。

**淋巴管：**胚胎期的淋巴管发育对新生小鼠的心肌再生具有调控作用。在胚胎期第 14.5 天，心脏淋巴管开始发育，阻碍淋巴管的发育导致心肌增殖减弱，淋巴管内皮细胞分泌的 Reln 是淋巴管调控小鼠心肌再生的关键介质。然而，在成年 MI 鼠给与 Reln 则未观察到明显的促心肌细胞再生作用<sup>[87]</sup>。

**ECM：**ECM 对心肌细胞增殖的调控作用取决于其来源，来自具有再生潜力心脏的 ECM 能够促进心肌细胞增殖。使用斑马鱼心脏的 ECM 处理成年 MI 小鼠，可通过激活 ErbB2 促进心肌增殖与修复<sup>[88]</sup>。同样，P1 小鼠的 ECM 可促进体外心肌细胞的增殖，而 P7 小鼠的 ECM 则不具有该能力。ECM 中的基底膜糖蛋白 Agrin 是 P1 心肌 ECM 促心肌增殖能力的关键介质，胚胎期敲除 Agrin，以及给予成年 MI 小鼠重组 Agrin 分别抑制和促进心肌增殖与再生。Agrin 的这一作用与激活 YAP 和 ERK 信号通路有关<sup>[89]</sup>。

Periostin 是发育过程中心脏 ECM 的重要成分，成年心脏在损伤后可重新表达 Periostin。给予成年 MI 小鼠 Periostin 可激活位于心肌细胞膜上的整合素-PI3K 信号，诱导心肌细胞重返细胞周期，促进心肌再生<sup>[90]</sup>。在猪 MI 模型通过心外膜缓释系统持续给予 Periostin，可在 12 个月后将射血分数从 31%提高到 41%，并将梗死面积缩小约 22%<sup>[91]</sup>。

蛋白聚糖 Versican 是新生小鼠心脏 ECM 的另一组分, 由心脏成纤维细胞产生。心肌损伤可诱导新生小鼠心脏 Versican 的上调, 并通过整合素  $\beta 1$  和 ERK1/2、Akt 等下游信号分子促进心肌细胞再生。敲除成纤维细胞中的 Versican 降低新生小鼠的心肌再生能力。在成年小鼠中, 向梗死心肌注射 Versican 可促进心肌细胞增殖, 减少纤维化并改善心功能<sup>[92]</sup>。

ECM 对心肌增殖的调控还与其僵硬程度(stiffness)有关。P1 小鼠与 P2 小鼠相比, 其心肌 ECM 僵硬程度更低, 通过化学诱导剂增加 P1 小鼠心肌 ECM 的僵硬程度, 抑制心尖切除后心肌再生<sup>[93]</sup>。有研究将 NRVMs 培养在不同僵硬度的 ECM 上, 发现低僵硬度的 ECM 诱导心肌细胞去分化与增殖, 而高僵硬度的 ECM 则诱导心肌细胞成熟、肌小节组装与心肌细胞收缩<sup>[94]</sup>。这些结果表明 ECM 的僵硬程度是心肌细胞增殖与成熟的调控因素之一。

**心脏神经:** 在小鼠胚胎期第 13.5 天(E13.5), 心脏的交感和迷走神经开始分布。通过化学方法、基因工程技术或器械手段损毁心脏的迷走(胆碱能)神经分布, 可显著抑制新生个体的心肌再生, 该抑制效应可被外源性给与 Neuregulin 1 (Nrg1) 或神经生长因子(nerve growth factor, Ngf)所挽救, 提示心脏胆碱能神经的促心肌增殖作用可能与神经分泌因子有关<sup>[95]</sup>。

另一方面, 通过基因工程技术抑制交感神经的分布, 则延长小鼠出生后心肌增殖时间窗, 进一步提高 P7 小鼠增殖心肌细胞的比率。交感神经通过影响心肌细胞节律周期蛋白 Per1/Per2 及下游 Wee 激酶, 从而抑制细胞周期基因和心肌细胞有丝分裂。使用去甲肾上腺素模拟交感活性, 可上调 Per1/Per2-Wee 信号并抑制心肌增殖<sup>[96]</sup>。

**血管新生和侧支循环:** 损伤后的血管新生/冠脉侧支循环是心脏组织修复过程中的关键因素。斑马鱼心肌损伤后, 冠脉向损伤区域发出新生血管是这一过程的早期事件和先决条件: 在 Vegfa 和 Vegfc 功能缺失的斑马鱼模型, 心肌损伤后血管新生和侧支循环受限, 心肌细胞不能再生<sup>[97, 98]</sup>。在新生小鼠心脏, 受损区域毛细血管的内皮细胞通过 Cxcl12-Cxcr4 的作用, 趋化动脉内皮细胞沿毛细血管迁移并形成侧支动脉循环。Cxcl12 或 Cxcr4 缺陷导致侧支循环受阻, 心肌细胞难以再生。在成年心脏, Cxcl12 在毛细血管内皮细胞的表达大幅降低, 是心肌损伤后侧支循环和心肌再生能力受阻的原因, 给与外源性 Cxcl12 可逆转这

一现象<sup>[99]</sup>。新生血管可能为心肌再生提供了有利的微环境：血管周细胞可通过分泌 Angiopoietin-2 等因子，调控内皮细胞功能进而调节巨噬细胞浸润<sup>[100]</sup>，而后者具有促进心肌细胞增殖的作用。进一步阐明血管新生与心肌细胞增殖的关系，以刺激血管新生对提高心肌细胞再生效率的作用，尚需更多研究。

**成纤维细胞：**成纤维细胞是心脏微环境中调控心肌细胞增殖与成熟的重要因素。成纤维细胞的成熟是成年小鼠心肌细胞增殖能力减退的因素之一。将成年小鼠心脏的成纤维细胞与新生小鼠心肌细胞共培养，可抑制心肌细胞增殖、促进心肌细胞成熟。这一过程受到 Cxcl12/Cxcr4 以及信号的调控，对其进行干预促进损伤后小鼠心肌再生<sup>[101]</sup>。另一方面，心肌细胞也可与成纤维细胞对话，调控损伤后心脏纤维化与瘢痕重塑：心肌细胞内的 Yap 信号可诱导 Wnt 配体分泌并作用于成纤维细胞，通过非经典 Wnt 通路抑制成纤维细胞激活，从而抑制胶原沉积与纤维化<sup>[102]</sup>。

### 3 心肌细胞状态

**年龄和老化：**谱系示踪技术发现，小鼠的心肌增殖活动在出生后逐渐下降，并在青春期以前(P12)降至成年水平<sup>[53]</sup>。对不同年龄的人心肌组织进行消化分离，再进行流式细胞分析发现，从出生后 1 天到出生后第 3 月、第 14 月，PH3 阳性的心肌细胞数经历两次下降后维持在成年水平<sup>[103]</sup>。

在啮齿类动物出生后 7 天内，心肌损伤会诱发心肌再生与修复，导致新的心肌细胞替换损失的心肌细胞<sup>[8]</sup>，在大动物模型，新生第 1~2 天的猪心脏在心肌损伤可完成自我修复，但出生 7 天后的猪心脏则不具备该能力<sup>[11]</sup>。目前灵长类和人的新生个体是否具有这一能力尚无实验证据，但有文献报道两例出生 1 天的新生儿，经冠脉造影，血清 cTnI 以及心电图检查被确诊为严重的 MI。在 1 年后对患儿进行的随访发现，心脏超声、血清生物标记物均未检查到明显异常<sup>[104, 105]</sup>。另一例出生后 4 天被诊断为 MI 的新生儿，在经过体外膜肺氧合 (extracorporeal membrane oxygenation, ECMO) 和溶栓治疗后好转，2 个月后的随访发现其心功能恢复至正常<sup>[106]</sup>。这些结果表明人类新生个体可能存在心肌自我修复能力，但其具体的心肌修复时间窗尚不完全清楚。

**细胞周期：**哺乳动物出生后，心肌细胞逐渐退出细胞周期，到成年时几乎处于细胞周期停滞状态，导致心肌细胞失去增殖能力。基于 FUCCI 小鼠的数据

显示, 在小鼠出生 2 天以后, 心肌细胞几乎全面停滞于 G1/S 期<sup>[50]</sup>。来源于猪的单个心肌细胞核测序结果也发现, 从胚胎期, P1, P28 到 P56 心肌细胞, 处于细胞周期 G1/S, S, G2/M, M 期各个阶段的心肌细胞比率均急剧下降。心尖切除或 MI 造成的心肌损伤可刺激进入细胞周期的心肌细胞比例重新升高<sup>[29]</sup>。

**DNA 损伤:** 细胞内高 ROS 水平造成的 DNA 损伤, 以及由之引起的 DNA 损伤应答(DNA damage response, DDR)是心肌退出细胞周期的重要原因。氧化磷酸化是成年心肌的主要供能方式, 这一过程在消耗氧气与产生 ATP 的同时, 也导致副产物 ROS 的产生。ROS 可导致碱基、脱氧核糖核苷酸以及 DNA 双链的损伤, 从而触发 DDR 反应。DDR 被激活后启动 ATM、Chk1/Chk2 等细胞周期检查点, 这些检查点在细胞周期的关键阶段, 通过激活 p21、Wee1 等细胞周期抑制因子暂停细胞分裂, 为细胞修复 DNA 损伤提供时间。如果因 DNA 损伤太严重而无法修复, 细胞可能会被引导进入程序性死亡或永久性细胞周期停滞<sup>[5]</sup>。

具有增殖能力的围出生期小鼠心肌, 在低氧环境、更少的线粒体数目以及代谢方式的多重作用下, 与非增殖心肌相比具有更低的 ROS、DNA 损伤以及 DDR 水平, 使心肌细胞免于退出细胞周期。在 P1 小鼠心脏, ROS 生成剂可诱导 DDR 和细胞周期停滞; 相反, 清除细胞内 ROS 或抑制 DDR 则推迟心肌细胞周期的停滞, 促进心肌增殖<sup>[5]</sup>。单细胞测序的结论提示, 处于增殖态的心肌细胞亚群其呼吸链、氧化磷酸化相关基因的表达下降<sup>[27]</sup>, 进一步支持了上述结论。

**多核化/多倍体化:** 多核化/多倍体化抑制心肌细胞增殖。哺乳动物出生后短暂时间内, 心肌细胞即发生多核化/多倍体化(在小鼠模型为 P4), 该过程还伴随细胞周期的退出。斑马鱼模型上的研究显示: 心肌细胞多核化/多倍体化是心肌再生的直接障碍。Ect2 的显性负性突变体(dominant negative Ect2, dnEct2)可通过阻碍胞质分裂造成心肌细胞多核化/多倍体化。通过热休克蛋白启动子、FLP/Cre 双重组系统在斑马鱼心肌细胞瞬时过表达 dnEct2, 可诱导不同比例的 2 倍体/多倍体“嵌合体”心脏。多倍体心肌细胞极少参与心肌损伤后的再生, 当大部分心肌细胞为多倍体细胞时, 斑马鱼心脏在损伤后不能再生, 遗留瘢痕。该现象的具体机制尚待阐明<sup>[20]</sup>。

**代谢:** 糖脂代谢方式的转变是心肌增殖能力的重要调控因素。代谢组学分析发现, 与 P1 小鼠心肌相比, P23 小鼠心肌的葡萄糖及糖类衍生物(葡萄糖-6-磷

酸、果糖-6-磷酸、半乳糖-6-磷酸)的水平下降。相反,棕榈酸等大多数脂肪酸,以及甘油酯代谢成分(甘油-3-磷酸、甘油-2 磷酸、甘油、甘油酸)增加。这些发现表明,在出生后的发育过程中,能量来源从利用碳水化合物转变为依赖脂肪酸为主<sup>[25, 32]</sup>。通过剥夺饮食中的脂肪摄入,可降低 ROS 产生和 DNA 损伤,延长心肌再生修复时间窗并促进损伤心肌增殖<sup>[24]</sup>。

糖脂代谢酶表达水平的变化是小鼠出生后代谢方式改变的重要原因,大多数糖转运体及代谢酶,包括 Glut1 和 Pkm2,在出生后逐渐降低<sup>[107]</sup>。相反,大多数脂肪酸氧化酶,如线粒体肉毒碱棕榈酰转移酶 1 (carnitine palmitoyltransferase 1, CPT1)、烯酰辅酶 A 水解酶 1 (enoyl-coA hydratase 1, ECH1)在出生后表达逐渐增加<sup>[5]</sup>。敲除 CPT1b 可通过抑制脂代谢,调控组蛋白表观遗传修饰促进成年心肌细胞再生<sup>[34]</sup>。相反,敲除糖代谢途径调节酶丙酮酸激酶 M2 则抑制新生小鼠心肌再生,在成年小鼠心肌过表达 Pkm2 增强糖代谢途径、降低 ROS,促进心肌增殖与修复<sup>[33]</sup>。

**无氧糖酵解和有氧氧化对心肌增殖能力的影响。**与无氧糖酵解相比,依赖于三羧酸循环的有氧氧化导致更多的氧气消耗与 ROS 产生。敲除三羧酸循环中的琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH),可迫使心肌更多利用葡萄糖进行无氧糖酵解,降低氧耗与 ROS 产生,促进心肌细胞再生<sup>[108]</sup>。

**氨基酸代谢影响心肌细胞增殖。**氨基酸同样是心脏的能量来源之一。与 P1 小鼠相比, P7 小鼠心脏的 S-腺苷甲硫氨酸和牛磺酸的代谢显著增加,而组氨酸、丝氨酸和苏氨酸的代谢降低<sup>[25]</sup>。谷氨酰胺和色氨酸代谢产物犬尿氨酸(kynurenine)在新生小鼠心脏表达量高,但在成年时降低。补充谷氨酰胺<sup>[35]</sup>或犬尿酸<sup>[36]</sup>分别通过激活 mTOR 信号途径,以及细胞质芳烃受体-SRC-Yap/ERK 信号促进心肌细胞的增殖。

## 五、促进心肌细胞再生的策略

### 1 调控心肌细胞再生的内源性机制

#### 1.1 诱导心肌细胞去分化

如前所述,去分化被认为是成年心肌细胞发生增殖的必经步骤。该过程的显著特征为肌小节结构蛋白的解聚合。肌小节结构蛋白,例如  $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -actinin)的翻译后修饰可能与其解聚有关<sup>[109]</sup>。在啮齿类增殖心肌细胞中, $\alpha$ -肌动

蛋白在有丝分裂前中期阶段开始解体。来自小鼠的磷酸化蛋白组学数据识别出 $\alpha$ -肌动蛋白的6个氨基酸位点在这一过程中发生了磷酸化修饰<sup>[109]</sup>。然而,目前仍不清楚这些位点的修饰是否为 $\alpha$ -肌动蛋白解聚的始动因素,以及哪种激酶负责这种磷酸化修饰。在Agrin诱导的心肌去分化过程中,锚定于肌细胞膜的肌营养不良蛋白(dystrophin)介导了肌小节的解聚以及肌球蛋白(myosin)的降解<sup>[89]</sup>。研究显示,心肌细胞增殖能力的减退伴随着单体G-actin聚合为F-actin,过表达肌动蛋白调控因子组合Tmsb4x、Tmsb10、dystrophin和Ctnna3短暂抑制G-actin聚合为F-actin,增加单体G-actin水平,促进非增殖心肌细胞的去分化和后续的增殖、再分化<sup>[19]</sup>。其它肌小节结构蛋白如何变化,尚需进一步研究。

除了肌小节结构蛋白的聚合,线粒体数目、结构和功能的改变也是诱导心肌细胞去分化过程中的重要事件。Klf1 (Krüppel-like factor 1)是斑马鱼心肌损伤后显著上调的转录因子。过表达Klf1可诱导斑马鱼心肌细胞去分化,在减少线粒体含量、线粒体嵴(氧化磷酸化场所)、ATP生成的同时,增加线粒体基质(无氧糖代谢场所)的比例,从而调控心肌能量代谢。Klf1的这一作用依赖于下调PGC-1 $\alpha$ 等调控线粒体生成的基因的表达<sup>[110]</sup>。

在oncostatin M、Agrin、Nrg1等诱导的心肌增殖过程中,心肌细胞的去分化过程依赖于ERK、 $\beta$ -catenin、Yap信号的活化及其对基因转录的调控<sup>[17, 111]</sup>,但该过程的详细机制还不完全清楚。

## 1.2 心肌细胞增殖的调控和促进策略

哺乳动物出生后,心肌细胞逐渐退出细胞周期,心肌再生能力减弱,如何重新推动成年心肌细胞重新进入细胞周期是心肌细胞再生研究的关键点。另一方面,成年心肌细胞在进入细胞周期后难以完成胞质分裂,进一步阐明其中的关键机制,将对促进心脏细胞再生起到重要作用。

### 1.2.1 细胞周期基因的作用

哺乳动物出生后心肌增殖能力的下降与细胞周期蛋白(cyclins)的沉默有关<sup>[63]</sup>。在具有增殖能力的心肌细胞中,细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)的表达水平较高,而细胞周期抑制因子p21、p16、p27的表达水平较低。这种表达模式在非增殖心肌细胞中显示出相反的趋势<sup>[112]</sup>。在成年小鼠心肌中分别过表达Cyclin D1<sup>[113]</sup>、Cyclin D2<sup>[114]</sup>或Cyclin A2

[115]均可诱导细胞周期的重新激活和心肌增殖。同时过表达 CDK1、CDK4、Cyclin B1 和 Cyclin D1 组合“4F”，可促进 15%~20%被感染的心肌细胞增殖，这一结论被心肌特异性 MADM 小鼠所证实<sup>[59]</sup>。

### 1.2.2 转录因子的调控

转录因子是心肌细胞增殖的重要调控因素。在成年小鼠心肌过表达“OSKM”转录因子组合(Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc)可诱导心肌细胞原位重编程，重新进入细胞周期，促进 MI 后的心肌增殖再生(心肌细胞计数增加约 13%)。值得注意的是，长时间的过表达“OSKM”导致心脏肿瘤的发生和射血分数的下降，通过 Tet-on 系统缩短表达时间可避免该情况的发生<sup>[60]</sup>。“OSKM”在大动物心肌再生中的作用尚无研究证据。

此外，基于发育模型及新生小鼠心肌损伤模型(MI 或心尖切除)的 RNA 测序或单细胞测序，已发现 Meis1 等转录因子介导了出生后心肌细胞周期的退出<sup>[116]</sup>。NFYa<sup>[27]</sup>、Yap/Tead<sup>[117]</sup>、GATA4<sup>[118]</sup>、Tbx20<sup>[119]</sup>、SMAD4<sup>[120]</sup>等转录因子则激活心肌细胞周期，诱导心肌增殖。在斑马鱼模型，Klf1 是调控损伤后心肌细胞再生的关键转录因子<sup>[110]</sup>。

### 1.2.3 生长因子的应用

生长因子是促进心肌再生的重要刺激源。Egf 家族成员 Nrg1 通过与 ErbB4 受体结合，促进 ErbB2/ErbB4 异源二聚体的形成和下游信号的激活，促进心肌细胞增殖<sup>[121]</sup>。Nrg1 的作用依赖于共受体 ErbB2 水平。小鼠出生后，心脏 ErbB2 表达迅速下降，导致 Nrg1 对 P7 及成年小鼠的心肌增殖并无明显促进作用，过表达 ErbB2 则可刺激成年小鼠心肌细胞增殖<sup>[122]</sup>。重组 Nrg1 对患有心脏疾病的新生儿具有类似作用：在小于 5 月龄的患者，给与 Nrg1 可增加 PH3 阳性心肌细胞数，但 Nrg1 对大于 5 月龄的患者并无该作用<sup>[103]</sup>。

Fstl1 是从心外膜细胞鉴定出的促进心肌细胞再生的因子。Fstl1 的作用依赖于心外膜给药，在心肌细胞过表达 Fstl1 不具有上述作用，Fstl1 在心外膜经历的糖基化修饰可能与该现象有关<sup>[123]</sup>。

其它生长因子，例如 Fgf 家族(Fgf1、Fgf2、Fgf9、Fgf16)<sup>[124]</sup>，Igf 家族(Igf-1、Igf-2)<sup>[125]</sup>，以及骨形成蛋白 BMP 家族(Bmp2、Bmp-10)<sup>[126, 127]</sup>也被证明能够刺激心肌细胞增殖。

## 1.2.4 信号转导通路的调节

### 1.2.4.1 Hippo-Yap 信号通路

Hippo-Yap 信号通路调控细胞增殖、分化以及器官大小，其对心肌细胞增殖的直接影响已在小鼠<sup>[117]</sup>、猪<sup>[128]</sup>的模型中被证实。当 Hippo 通路激活时，该通路中的激酶，包括 MST1/2 (mammalian sterile 20-like kinase 1 and 2) 和 LATS1/2 (large tumor suppressor 1 and 2) 将核转录因子 Yap 磷酸化。磷酸化的 Yap 无法到达细胞核激活目标基因转录，从而抑制细胞增殖。当 Hippo 通路被抑制或 Yap 被激活时，Yap 进入细胞核并与其它转录因子结合，推动细胞周期和增殖相关基因的表达。

Hippo-Yap 介导了众多心肌增殖调控因子的信号转导。巨噬细胞分泌因子 oncostatin M<sup>[85]</sup>、代谢产物 Kynurenine<sup>[36]</sup>、ECM 蛋白 Agrin<sup>[43]</sup>、生长因子受体 ErbB2<sup>[129]</sup>、非编码 RNA miR-199a-3p<sup>[130]</sup> 以及孕激素<sup>[78]</sup> 均通过激活 Yap 促进心肌细胞增殖。 $\alpha$ -catenin<sup>[131]</sup>、 $\beta$ 1-AR/G $\alpha$ s 信号<sup>[132]</sup>、肌营养不良蛋白 dystrophin<sup>[133]</sup> 则通过阻断 Yap 激活抑制心肌增殖。

### 1.2.4.2 Wnt 信号通路

Wnt 通路对心肌增殖的作用较为复杂，在发育的不同阶段，以及针对该通路不同环节的干预可能得到不同的结果。Wnt 通路分为经典通路和非经典通路。经典通路也被称为  $\beta$ -catenin 通路。该通路激活后依靠  $\beta$ -catenin 入核形成转录因子复合体，启动靶基因的转录从而发挥作用。非经典通路主要通过 Rho GTPases/JNK 或 Ca<sup>2+</sup>/PKC 发挥下游效应。在小鼠 MI 模型，Wnt 经典与非经典途径均被激活<sup>[134]</sup>。

一系列研究表明 Wnt 经典通路促进心肌增殖。在小鼠胚胎期 13.5 天(E 13.5)，具有增殖活性的心肌细胞高表达  $\beta$ -catenin，心肌特异性敲除  $\beta$ -catenin 减少 Ki67/PH3 阳性的心肌细胞数目。这一作用与  $\beta$ -catenin 靶基因 Cyclin D2 水平变化有关<sup>[135]</sup>。此外，另一调控心肌增殖的关键分子 Yap 可与  $\beta$ -catenin 形成复合体，发挥协同作用增强  $\beta$ -catenin 活性，促进发育过程中的心肌增殖<sup>[136]</sup>。在成年小鼠心肌细胞，激活/升高  $\beta$ -catenin 促进心肌细胞增殖与 MI 后心肌修复<sup>[33, 137]</sup>。另一方面，亦有证据表明抑制 Wnt 通路促进心肌增殖：在斑马鱼心肌损伤模型，通过 Dickkopf-1 (DKK1) 蛋白<sup>[138]</sup> 抑制 Wnt 蛋白与受体结合，可促进心肌增殖信号。

在成年小鼠 MI 模型，通过小分子化合物抑制 Wnt 蛋白分泌，可促进心肌增殖与修复<sup>[139]</sup>。有观点提出 Wnt 通路是否促进心肌增殖，在心脏发育成熟的不同阶段可能存在“时相特异性”，导致出现不一致的研究结果<sup>[140]</sup>，但这一观点尚需更多的实验证据。有研究报道，某些 Wnt 通路中的成员具有调控心肌增殖的作用，但该作用不依赖于 Wnt 通路的活性。Wnt 蛋白的共受体 LRP6 (LDL receptor related protein 6)可在与 Wnt 蛋白结合后，激活细胞内下游信号并使  $\beta$ -catenin 活化。然而，除了作为 Wnt 蛋白的共受体，LRP6 还是一种 RNA 结合蛋白，可通过与抑癌基因 ING5 的 mRNA 结合并增加其稳定性，升高 ING5 和下游靶基因 P21 的水平，从而抑制心肌增殖。敲低 LRP6 可促进成年心肌增殖与修复，但  $\beta$ -catenin 的水平 and 活性并不受影响<sup>[141]</sup>。这些结果表明，Wnt 通路的成员可通过其它途径调控心肌细胞的增殖。

目前 Wnt 非经典通路调控心肌增殖作用的报道相对较少。来自斑马鱼模型的研究表明，Wnt2b 通过 JNK1/c-JUN/CREB1 激活非经典通路诱导斑马鱼心肌细胞增殖<sup>[142]</sup>。Wnt 非经典通路在哺乳动物模型对心肌增殖的调控作用尚缺乏研究。关于 Wnt 通路是促进还是抑制心肌增殖目前尚无明确共识，但多数研究倾向于认为经典通路下游效应器  $\beta$ -catenin 的激活促进心肌增殖。而非经典通路在心肌增殖中的具体作用，以及 Wnt 通路在不同发育阶段对心肌增殖的调控机制，仍需进一步研究和明确。

#### 1.2.4.3 其它信号通路

Notch 信号通路在哺乳动物新生个体中促进心肌增殖<sup>[143]</sup>。这一作用在成年小鼠 MI 模型中明显减弱，该现象与成年心肌细胞 Notch 靶基因发生组蛋白甲基化修饰，无法响应 Notch 信号有关<sup>[143]</sup>。

PI3K-Akt 信号促进心肌增殖。在小鼠 MI 模型，PI3K-Akt 介导了 lncRNA Snhg1<sup>[62]</sup>、血小板源生长因子受体  $\beta$  (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR- $\beta$ )<sup>[144]</sup>、转录因子 Tbx20<sup>[145]</sup>以及旁分泌因子 C3orf58<sup>[146]</sup>的促心肌增殖作用。

ERK/MAPK 信号也发挥了类似作用。IGF2<sup>[125]</sup>、Nrg1/ErbB2<sup>[122]</sup>、Agrin<sup>[89]</sup>、溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)<sup>[147]</sup>、lncRNA ECRAR (endogenous cardiac regeneration-associated regulator, ECRAR)<sup>[148]</sup>对小鼠心肌增殖的促进作用依赖于

ERK/MAPK 信号的激活。

骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)-SMAD 信号对小鼠心肌增殖具有正向调控作用。BMP2 和 BMP10 作为转录因子 Tbx20 的靶基因,介导了后者的促心肌增殖效应<sup>[119, 126, 145]</sup>。

此外, JAK/STAT3 信号可调控 P21、c-Myc 等基因转录,介导炎症反应<sup>[149]</sup>、非编码 RNA lncRNA NR\_045363<sup>[150]</sup>、以及 circRNA circWhsc1<sup>[151]</sup>对心肌增殖的促进作用。

### 1.2.5 表观遗传调控

在哺乳动物从胎儿、出生到成年的过程中,调控心肌细胞增殖的基因发生显著的、多层次的表观遗传变化,这一过程导致心肌再生能力下降,对其进行针对性干预有望促进心肌再生。

#### 1.2.5.1 染色质可及性

小鼠心肌的染色质可及性在出生后发生显著变化。对小鼠出生后不同时间点(P1、P14 和 P56)的心肌细胞进行 ATAC-seq 分析发现,与细胞周期、炎症、ECM 相关基因的染色质在心肌成熟期间发生聚缩和关闭;相反,与代谢、肌肉成熟和收缩有关的基因,其染色质由关闭转变开放状态,这些结果与基因的表达趋势相一致,染色质可及性改变是增殖相关基因表达变化的深层原因<sup>[26]</sup>。

RB (retinoblastoma protein)蛋白家族参与了对上述过程的调控, RB 通过将异染色质蛋白 1 (heterochromatin protein 1, HP1)、组蛋白去乙酰化酶 1 (histone deacetylases 1, HDAC1)等招募到 E2F 等基因启动子,启动组蛋白去乙酰化和异染色质形成,推动细胞周期基因表达的沉默<sup>[152]</sup>。

在 P1 和 P8 小鼠的 MI 模型中, scATAC-seq 揭示了不同细胞亚群中的染色质可及性变化:在增殖活跃的心肌细胞亚群,转录因子 Tead3、MycN 以及 Gli1 的染色质可及性增加;在非心肌细胞,心外膜细胞的 KLF4、内皮细胞的 FOXO4/ETS1、以及平滑肌细胞的 EBF1/TCF21 等因子的染色质可及性明显增加。这些结果提示增殖心肌细胞与非心肌细胞之间可能存在调控网络,表观遗传调控机制可能在其中发挥关键作用<sup>[28]</sup>。

#### 1.2.5.2 组蛋白乙酰化修饰

组蛋白乙酰化修饰促进心肌增殖。小鼠出生后,心肌增殖能力的降低伴随

染色质组蛋白的去乙酰化修饰。P7小鼠与P1小鼠相比，细胞周期和炎症相关基因的 H3K27ac 显著减少<sup>[79]</sup>。通过干预赖氨酸乙酰转移酶(lysine acetyltransferase 6A, KAT6A)增加成年小鼠心肌 H3K27ac，可促进心肌重新进入细胞周期和 MI 后心肌修复<sup>[153]</sup>。还有哪些位点的组蛋白乙酰化修饰与心肌增殖能力相关，以及其调控机制如何，还缺乏进一步研究。

### 1.2.5.3 组蛋白甲基化修饰

根据修饰位点的不同，以及发生修饰的基因不同，组蛋白甲基化可能对心肌增殖发挥相反的调控作用。

**H3K9me3:** H3K9me3 抑制心肌增殖。在成年小鼠心肌，细胞周期基因的关闭伴随着高水平的 H3K9me3 修饰。KDM4D (lysine demethylase 4D)是针对 H3K9me3 的组蛋白去甲基化酶，在小鼠心肌过表达 KDM4D 可降低细胞周期基因的 H3K9me3 水平，激活细胞周期基因表达并促进成年心肌增殖<sup>[154]</sup>。

**H3K27me3:** H3K27me3 一般导致基因表达的沉默，其与心肌细胞增殖的关系依赖于发生修饰的具体基因。心脏发育相关基因的 H3K27me3 与心肌增殖能力减退相关。EZH1 (enhancer of zeste homolog 1)是多梳抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2)的亚基，在通常情况下催化 H3K27me3、H3K27me2 以及 H3K27me1。尽管其机制尚不清楚，但在小鼠心肌过表达 EZH1 导致“心脏发育”(GO term: tissue morphogenesis, cardiac muscle tissue growth 等)相关基因 H3K27me3 的减少，并同时引起 H3K27me1 水平的增加，促使基因表达上调和成年心肌细胞增殖<sup>[155]</sup>。尽管该研究发现 H3K27me3 下降与心肌细胞增殖呈正相关，但同时升高的 H3K27me1 是否直接调控心肌细胞增殖还需更多的研究证明。

肌小节/细胞骨架蛋白基因的 H3K27me3 促进斑马鱼心肌细胞增殖。在斑马鱼心肌损伤模型，增殖心肌细胞的肌小节/细胞骨架蛋白基因发生 H3K27me3，导致这些基因表达下调。将组蛋白 H3K27 进行突变(h3.3K27M)可抑制 H3K27me3，引起肌小节/细胞骨架蛋白基因上调，肌小结形成增加，细胞分裂受到明显抑制<sup>[156]</sup>。这一现象是否存在于哺乳动物尚无报道。

**H3K4me3:** H3K4me3 通常导致基因表达的激活。在小鼠心肌敲除 CPT1b 可引起  $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -Ketoglutarate,  $\alpha$ -KG)水平升高，从而激活去甲基化酶 KDM5，降低心肌细胞成熟相关基因启动子区 H3K4me3 水平，使心肌细胞变为相对幼稚

状态并促进刺激其增殖<sup>[34]</sup>。

#### 1.2.5.4 DNA 甲基化

哺乳动物出生后，心肌细胞增殖相关基因的沉默伴随 DNA 甲基化修饰水平的增加。这些发生 DNA 甲基化修饰的基因包括 ErbB4、转录因子 Foxp11<sup>[157]</sup>、DNA 复制调控蛋白 Mcm3 (mini-chromosome maintenance 3)<sup>[158]</sup>以及细胞周期基因(cell cycle genes, GO term: 0007049)<sup>[159]</sup>。抑制 Mcm3 的甲基化修饰促进成年心肌细胞增殖<sup>[158]</sup>。

#### 1.2.5.5 N6-甲基腺苷修饰(N6-methyladenosine, m6A)

RNA 的 m6A 修饰对心肌细胞增殖发挥何种调控作用，取决于发生修饰的具体 RNA 分子。根据修饰发生位置，以及识别蛋白的不同，m6A 可能对 mRNA 功能发挥促进或抑制作用。

大多数研究表明，从新生到成年小鼠，心肌总 mRNA 的 m6A 修饰增加，抑制心肌细胞增殖。该现象与 m6A 催化酶 Mettl3 的上调，以及 m6A 去甲基酶 ALKBH5 (AlkB homolog 5)的下调有关。对 ALKBH5 或 Mettl3 进行干预，增加 RNA 的 m6A 修饰可抑制新生小鼠心肌再生；降低 RNA 的 m6A 修饰水平则促进成年心肌再生<sup>[160]</sup>。在探索运动如何促进心肌细胞增殖的过程中，研究发现了 Mettl14 表达水平下降这一现象。进一步研究证实，Mettl14 的降低显著促进了新生大鼠心肌细胞的增殖<sup>[161]</sup>。

m6A 修饰抑制心肌细胞增殖与以下机制有关：m6A 修饰可加速 YTHDF1 mRNA 的降解，从而减弱 YTHDF1 对 Yap mRNA 翻译的促进作用<sup>[160]</sup>；发生 m6A 修饰的 FGF16 mRNA 被 YTHDF2 识别后加速降解，将 FGF16 mRNA 的 m6A 修饰位点突变，可恢复 FGF16 水平并促进新生小鼠的心肌再生<sup>[124]</sup>。miR-143 前体 mRNA 的 m6A 修饰，可增加 mRNA 的稳定性以及 miR-143-3p 的产生，miR-143-3p 通过靶向抑制 Yap 抑制心肌细胞增殖<sup>[162]</sup>。

其它机制还包括：发生在 mRNA 3'-UTR 的 m6A 修饰，可增加 mRNA 与对应 miRNA 的结合，进一步抑制 mRNA 的翻译。例如 miR-133a 靶基因 GATA4 的 mRNA 在 3'-UTR 发生 m6A 修饰后，与 miR-133a 的结合增加，增强了 miR-133a 对靶基因和心肌细胞增殖的抑制作用<sup>[163]</sup>。

另一方面，某些 mRNA 的 m6A 修饰也发挥促进心肌细胞增殖的作用。例

如，m6A 修饰增加了磷酸丝氨酸磷酸酶(phosphoserine phosphatase, PspH) mRNA 的稳定性和蛋白水平。PSPH 将 CDK2 去磷酸化导致其活性增强，促进成年小鼠心肌细胞增殖<sup>[164]</sup>。

P7 小鼠与 P1 小鼠相比，其心脏 lncRNA 的总体 m6A 水平显著升高，其中 38 个 lncRNA 发生与 m6A 相关的表达变化，这些 lncRNA 的 m6A 修饰与心肌细胞增殖的关系尚不清楚<sup>[165]</sup>。

### 1.2.5.6 非编码 RNA

**miRNA:** miRNA 是心肌细胞增殖的重要调控分子。通过对人全基因组 miRNA 进行筛选，发现 hsa-miR-590 和 hsa-miR-199a 可在新生及成年啮齿类动物促进心肌细胞增殖<sup>[166]</sup>，mir-199a 的作用在成年猪的 MI 模型中得到进一步验证<sup>[167]</sup>。

在小鼠心脏，miR-302~367、miR-294、miR-296、miR-31a、miR-152、miR-708、miR-214 在出生后逐渐降低；miR-222 由运动诱导升高；miR-17~92、miR-106b~25、miR-210 在肿瘤等其他细胞显示促增殖能力<sup>[168]</sup>；这些 miRNA 通过靶向调控 Hippo-Yap 信号、细胞周期抑制因子、DNA 转录复制调节基因等促进新生及成年小鼠 MI 后心肌细胞增殖。

另一方面，一些在出生后心脏表达逐渐升高的 miRNA，例如 let-7 家族、miR-15 家族、miR-29a、miR-128、miR-34a，以及 miR-1~133 等促进心肌分化的 miRNA，则通过靶向细胞周期基因、生长因子、表观遗传调控酶等抑制心肌细胞增殖<sup>[168]</sup>。

**lncRNA:** lncRNA 通过多种方式调控心肌细胞增殖。在出生后到成年，lncRNA CAREL<sup>[169]</sup>、lncRNA CPR<sup>[158]</sup>、lncRNA CRRL<sup>[170]</sup>、lncRNA AZIN2-sv<sup>[171]</sup>、lncRNA NPPA-AS1<sup>[71]</sup>在心肌表达升高，抑制心肌细胞增殖；而 lncRNA Snhg1<sup>[62]</sup>、lncRNA ECRAR<sup>[148]</sup>、lncRNA Sirt1 antisense<sup>[172]</sup>、NR\_045363<sup>[168]</sup>在心肌表达降低(其中 NR\_045363 来源于胚胎和成年人心肌细胞数据)，促进心肌细胞增殖与再生。

lncRNA 一方面通过 lncRNA/miRNA/mRNA 轴发挥上述作用。例如 AZIN2-sv 能够吸附 miR-214，阻断其对 PTEN 的下调，恢复 PTEN 对 PI3K/AKT 和心肌细胞增殖的抑制作用<sup>[171]</sup>。CRRL 能与 miR-199a-3p 结合，中和其增殖促进效应

[170]。CAREL 能够绑定并抑制 miR-296, 使其无法与 Trp53inp1 (诱导 G1 期停滞) 和 Itm2a87 (诱导 G2/M 期停滞) 这两个 mRNA 靶标结合<sup>[169]</sup>。NR\_045363 通过吸附 miR-216a 解除其对 JAK2/STAT3 的抑制, 促进心肌细胞增殖<sup>[150]</sup>。

lncRNA 另一方面通过与 mRNA、蛋白质相互作用介导染色质重塑、DNA 修复, 调控心肌细胞增殖。例如 lncRNA CPR 可招募 DNA 甲基转移酶 3 $\alpha$  (DNA Methyltransferase 3 $\alpha$ , Dnmt3a) 到 Mcm3 基因的启动子区, 促进 DNA 的甲基化修饰, 抑制 Mcm3 表达和由之引起的 DNA 复制, 从而抑制心肌细胞增殖<sup>[158]</sup>。lncRNA Sirt1 antisense 能够绑定并增加 Sirt1 mRNA 稳定性, 增强 Sirt1 对 p21 的乙酰化和失活, 解除 p21 对细胞周期的抑制<sup>[172]</sup>。lncRNA ECRAR 可结合并促进 ERK1/2 的磷酸化, 激活下游 Cyclin D1 和 Cyclin E1<sup>[148]</sup>。lncRNA Snhg1 则通过结合并促进 PTEN 蛋白的降解, 解除 PTEN 对 PI3K/AKT 的抑制, 从而激活心肌细胞增殖<sup>[62]</sup>。由 ANP 反义链编码的 NPPA-AS 通过竞争性结合阻碍 DNA 修复二聚体的形成, 抑制 DNA 损伤后修复与心肌细胞增殖<sup>[71]</sup>。lncRNA H19 可同时通过吸附 miRNA 和作用于 mRNA/蛋白等多种方式增加心肌糖酵解, 推动成年心肌进入细胞周期<sup>[173]</sup>。

**circRNA:** circRNA 是具有共价闭环结构的非编码 RNA。与新生大鼠相比, circRNA 在成年大鼠心肌细胞的总体表达量显著下降。在大鼠、小鼠、和人心脏测得的 circRNA 中, 10% 在三个物种具有保守性<sup>[174]</sup>。

在高度保守的 circRNA 中, circNfix 抑制心肌细胞增殖。circNfix 是由转录因子 Meis1 所驱动, 主要表达于心肌细胞的 circRNA, 小鼠出生后 circNfix 的表达升高。circNfix 促使 E3 泛素连接酶 Nedd41 与 Ybx1 (Y-box binding protein 1) 发生相互作用, 从而引起 Ybx1 的泛素化降解, 下调 Ybx1 的下游靶基因 Cyclin A2 和 Cyclin B1。此外, circNfix 还通过吸附 miR-214 限制  $\beta$ -catenin 的活化, 从而抑制心肌细胞增殖。敲除心肌 circNfix 可促进成年心肌细胞增殖与修复<sup>[174]</sup>。

circSamd4 是特异性定位于线粒体的 circRNA, circSamd4 在出生后表达下降。与其宿主基因 SMAD4 相似, circSamd4 发挥正向调控心肌细胞增殖的作用<sup>[120]</sup>。circSamd4 通过招募分子伴侣 Vcp (valosin-containing protein) 到线粒体, 抑制线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 的开放, 从而降低 ROS, 促进成年小鼠心肌再生<sup>[70]</sup>。

circMdc1 是氧化应激诱导表达的 circRNA，在小鼠出生后随心肌 ROS 的增加而上调。circMdc1 的宿主基因 Mdc1 可结合到损伤 DNA 双链，为 DNA 修复提供平台。circMdc1 通过与宿主基因 Mdc1 竞争性结合翻译所需蛋白，抑制 Mdc1 的翻译，从而抑制 DNA 损伤修复与心肌细胞增殖。过表达 Mdc1 或敲低 circMdc1 均刺激成年小鼠心肌再生<sup>[175]</sup>。

circWhsc1 特异性表达于心脏内皮细胞，在缺氧状态下其表达上调，并通过内皮细胞分泌的微泡作用于心肌细胞，circWhsc1 通过与 TRIM59 结合促进其磷酸化，依次激活 TRIM59/STAT3/cyclin B 信号促进心肌细胞增殖<sup>[151]</sup>。

RNA 测序发现 circRNA circUtrn 在经游泳训练的小鼠心肌细胞中显著增加。circUtrn 的升高是运动后心肌细胞 Ki67、PH3 阳性率增加的重要原因，过表达 circUtrn 具有改善心肌 I/R 损伤后心脏重塑的作用。进一步研究揭示，circUtrn 通过与蛋白磷酸酶 5 (serine/threonine-protein phosphatase 5, PP5) 结合，调控其泛素化降解发挥上述作用<sup>[75]</sup>。

### 1.2.6 翻译后修饰

除了转录与表观水平的调控，基因的翻译后修饰通过调控蛋白的功能、稳定性和细胞内定位，对心肌细胞增殖发挥重要调控作用。

**磷酸化修饰：**磷酸化修饰在心肌增殖中扮演关键角色，从胚胎期到成熟小鼠心脏，80%的蛋白磷酸化位点修饰呈现动态变化<sup>[176]</sup>。其中 MAPK、CDK2<sup>[164]</sup>、ERK1/2<sup>[148]</sup>、AKT<sup>[177]</sup>、GSK-3 $\beta$ <sup>[178]</sup>的磷酸化修饰在心肌细胞增殖中发挥重要调控作用。同时，Hippo/Yap 通路中的多个磷酸化位点也对心肌细胞增殖具有调节作用。当 Hippo 信号抑制时，Yap 经去磷酸化后转移到细胞核内，促进心肌细胞增殖<sup>[117]</sup>。针对 P1 小鼠梗死边缘区心肌进行的磷酸化蛋白质组学分析揭示，检查点激酶 1 (Chk1)介导的 mTORC1/P70S6K 激活是心肌损伤后再生的重要原因<sup>[179]</sup>。此外，p38 的去磷酸化同样促进心肌细胞增殖，其抑制剂 SB203580 在成年心肌细胞中显著促进增殖。在临床上，针对 p38 的特异性抑制剂 losmapimod 已在 MI 治疗中显示出减少梗死面积和改善心脏功能的潜力<sup>[180]</sup>。

**乙酰化修饰：**乙酰化作为一种翻译后修饰，通过调控蛋白质的功能、稳定性和细胞内定位影响心肌细胞增殖。通过敲低 HDAC2 增加 GATA4 的乙酰化修饰，可促进其转录活性，上调靶基因表达，促进胚胎期小鼠心肌细胞增殖<sup>[181]</sup>。

Yap 的促心肌细胞增殖作用依赖于入核后与 TEAD 形成复合体, 这一过程受到 VGLL4 与 Yap 竞争性结合 TEAD 的抑制。P300 介导的 VGLL4 乙酰化修饰可减弱 VGLL4 与 TEAD 的结合, 降低 VGLL4 对 Yap/TEAD 复合体的影响, 从而促进心肌细胞增殖<sup>[182]</sup>。在增殖的心肌细胞中, Notch1 受体的细胞内结构域 (NICD) 乙酰化修饰增强, 这种修饰通过提高 NICD 的稳定性提高心肌细胞增殖能力<sup>[183]</sup>。另一方面, 细胞周期抑制因子 p21 在成年小鼠心脏的乙酰化水平也显著高于新生小鼠心脏。Sirt1 可将 p21 去乙酰化, 从而激活 p21 的泛素化降解, 促进心肌细胞增殖<sup>[184]</sup>。

**泛素化修饰:** 诸多心肌细胞增殖的关键调控因子和通路受到泛素化修饰的调控。E3 泛素连接酶复合体成员 Skp2<sup>[185]</sup>和去乙酰化酶 Sirt1<sup>[184]</sup>, 可分别通过直接诱导 p27 泛素化, 或将 p21 去乙酰化后触发其泛素化降解, 推动心肌细胞进入细胞周期。E3 泛素连接酶  $\beta$ -TrCP<sup>[130]</sup>和 Nedd41<sup>[174]</sup>则可通过介导 Yap 和 Ybx1 的泛素化降解, 下调 Cyclin A2 和 Cyclin B1 等靶基因, 从而抑制心肌细胞增殖。另一方面, E3 泛素连接酶 Cullin7 可以介导 Hippo 通路成员 MST1 的泛素化降解, 解除其对 Yap 的抑制, 促进心肌细胞增殖<sup>[186]</sup>。

**乳酸化修饰(lactylation):** 乳酸化修饰是指乳酸(或其衍生物)与蛋白质特定氨基酸残基(如赖氨酸)的共价结合。缺氧(低氧)等乳酸生成增加的条件可促进蛋白乳酸化修饰。乳酸化修饰可作用于组蛋白调控基因表达, 也可作用于非组蛋白调控其稳定性与活性。

在传统观点中, 乳酸主要被视为酸中毒的一个副产物, 但近年来人们发现其在细胞信号传导和基因表达调控中发挥积极作用。例如, 小分子化合物组合“5SM”(5种小分子化合物的组合: Phenylephrine, Baricitinib, Harmine, Vo-ohpic trihydrate 和 AZD3965)能够提高心肌细胞内的乳酸水平, 进而促使 PDHA 和 CPT2 发生乳酸化修饰。这种修饰抑制了这些酶的活性, 导致心肌细胞的代谢从有氧化转向糖酵解, 刺激心肌细胞增殖并改善心功能<sup>[187]</sup>。催化乳酸生成的关键酶乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA)在 P1 小鼠心脏中表达较高, 但在成年心肌显著下降。过表达 LDHA 可增加乳酸水平刺激成年心肌细胞增殖。这一作用与乳酸水平升高后促进巨噬细胞组蛋白的 H3K18 乳酸化修饰, 诱导其向 M2 极化, 从而创造有利于心肌再生的微环境有关<sup>[63]</sup>。

**其它翻译后修饰:** 糖基化修饰是由糖基转移酶将糖类通过糖苷键连接到蛋

白质的特定氨基酸残基，该修饰在蛋白质的功能、稳定性、折叠和细胞内定位方面发挥重要作用。心外膜来源的 FSTL1 能促进心肌细胞增殖，而心肌细胞过表达 FSTL1 则不具此功能，这主要是由于 FSTL1 的 N180Q 位点在心外膜发生了 N-糖基化修饰所致<sup>[123]</sup>。糖蛋白组学和蛋白质组学分析揭示了 P1 和 P7 SD 大鼠心脏中糖蛋白丰度和特定糖基化位点的显著差异，并初步提出生命第一周内唾液酸化(Sialylation)和岩藻糖化(Fucosylation)的变化可能是心脏再生的重要原因<sup>[188]</sup>。鉴于这一发现，深入研究新生儿、成年人和心脏损伤后的糖基化状态，探索糖基化在心脏损伤中的作用和机制，可能为心脏再生治疗提供新的思路。

### 1.3 促进心肌细胞增殖后再分化

去分化的心肌细胞在发生增殖后，由于肌小节解聚，心肌收缩蛋白丢失，线粒体数目减少，兴奋-收缩解耦联，尚不能与周围心肌整合从而参与心肌收缩功能。对 MADM 小鼠子代心肌细胞的表达谱分析也表明，增殖后的心肌细胞处于不同的成熟状态<sup>[13]</sup>。因此，如何促进心肌细胞增殖后的再分化，是心肌再生疗法的重要环节。

心肌细胞的再分化依赖于和周围心肌细胞重新建立缝隙连接，敲低缝隙连接蛋白 Cx43 可阻断心肌再分化。在缝隙连接蛋白介导的细胞间通讯中，钙瞬变(钙浓度短暂、快速的变化)和由之引起的 calcineurin-NFAT 信号激活是调控心肌细胞再分化的关键信号通路<sup>[16]</sup>。

心脏二分体(cardiac dyad)及其结构蛋白 LRRC10 通过调节钙电流影响心肌细胞的再分化。心脏二分体是由一个 T 小管与肌浆网的末端相接而成，包含 LTCC 的特殊结构。该结构确保心肌细胞兴奋时，可从肌浆网中迅速而有效地释放钙离子。心脏二分体在心肌的去分化-增殖-再分化过程中经历动态改变并发挥调控作用。在斑马鱼心肌损伤后早期(损伤后第 3、7 天)，由于心脏二分体结构蛋白 LRRC10 下调、二分体解聚、L 型钙通道蛋白 Cav1.2 从 Z 盘解离导致  $I_{Ca-L}$  减弱，细胞钙电流特征接近胚胎期心肌细胞，心肌细胞完成去分化与增殖；在损伤后期(损伤后 21 天)，LRRC10 表达量回升，二分体重新聚合恢复到正常结构，钙电流特征变化恢复，这一过程伴随着心肌细胞的再分化。LRRC10 缺失的斑马鱼心肌细胞增殖后不能再分化<sup>[31]</sup>。

## 2 促进心肌细胞再生的外源性干预策略

### 2.1 外源性细胞疗法

#### 2.1.1 外源性细胞疗法通过多种机制促进心肌修复

外源性细胞移植对心肌修复显示出一定的治疗作用，但其作用机制需谨慎评估<sup>[189]</sup>。虽然大多数研究表明，对受损心脏进行细胞的输注或植入能带来一定的治疗效益，但移植的成体干细胞不能分化为心肌细胞<sup>[190]</sup>。细胞疗法的获益机制仍不完全清楚，但大量研究证明主要依赖于旁分泌作用<sup>[1, 191]</sup>。也有研究表明，细胞疗法的获益有来源于移植后诱导的免疫反应，该结论来源于注射灭活的细胞仍能取得与未灭活细胞相当的治疗作用，并且其作用可被免疫激活剂模拟<sup>[149]</sup>。尽管该研究发现免疫反应在细胞疗法中具有重要作用，但仅以此难以断定免疫反应是细胞疗法的唯一获益机制。

**多能干细胞、iPSCs 为心肌再生提供细胞来源。** ESCs、iPSCs 以及诱导性心脏前体细胞(inducible cardiac progenitor cells, iCPCs)可在体外扩增并诱导分化为心肌细胞<sup>[65, 192]</sup>，将诱导分化的多能干细胞(ESC-CMs、iPSCs-CMs)移植到梗死后心脏，可与宿主心肌同步跳动并发挥收缩功能，但这些细胞的移植也可能导致心律失常的发生<sup>[3, 193]</sup>。此外，尽管 ESCs 或 iPSCs 向未成熟心肌细胞及心室心肌细胞的分化效率超过 80%<sup>[192]</sup>，但未分化的多能干细胞注射到免疫功能受损个体的心脏可形成畸胎瘤<sup>[194]</sup>。通过将 ESC-CMs 或 iPSC-CMs 培养在三维组织贴片再进行移植，可提高移植后细胞存活与长期疗效，并减少心律失常的发生<sup>[195, 196]</sup>。iPSC-CM 补片的有效性和安全性在缺血性心肌病患者中已得到初步证实<sup>[197]</sup>。

**心外膜细胞具有心肌修复作用。** 心外膜是动物心脏最外层的间皮组织，在发育过程中，部分心外膜细胞迁移至心外膜下并获得多向分化潜能，被称为心外膜来源细胞(epicardium-derived cells, EPDCs)。在胚胎期小鼠心脏，EPDCs 可分化为心肌细胞<sup>[198]</sup>，但在成年小鼠，正常心肌与 MI 后心肌均未观察到由 EPDCs 分化来的心肌细胞<sup>[199]</sup>。基于单细胞测序的细胞互作分析显示，心外膜来源的分泌因子调控损伤后心肌细胞再生<sup>[28]</sup>。杨黄恬课题组发现移植人多能干细胞源心外膜细胞(human embryonic stem cell-derived epicardial cells, hEPs)可改善小鼠和猪 MI 后心功能、减小梗死面积，并发现 hEPs 通过旁分泌作用抑制 IFN- $\beta$

促进血管、淋巴管生成、提高心肌细胞存活，但 hEPs 是否激活梗死心脏心肌细胞增殖有待进一步研究<sup>[200]</sup>。

### 2.1.2 外源性细胞疗法通过旁分泌调控心肌细胞再生

通过冠脉/心肌内注射心肌球来源细胞(cardiosphere-derived cells, CDCs)的胞外囊泡来替代 CDCs 的直接注射，可在避免移植后细胞存活率低的同时，促进边界区域的心肌细胞增殖<sup>[201]</sup>。新近研究发现，移植 iPSC-CM 和分化的心血管前体细胞(pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells, CVPCs)心脏补片，同样可促进梗死心脏原位心肌细胞增殖，并且这两类细胞组合移植可进一步提升促进梗死心脏原位心肌细胞增殖的效率，蛋白质谱分析发现该作用与移植后细胞的旁分泌作用相关<sup>[202]</sup>，基于上述研究发现，进一步阐明外源性细胞疗法的获益机制，明确旁分泌等机制在外源性细胞移植促进内源性心肌细胞增殖中的作用，有望为心肌再生提供更多的治疗策略。

## 2.2 小分子化合物的应用

小分子药物治疗在干预时间可控、成瘤性低、靶向递送和控制释放等方面具有优势。在啮齿类心肌细胞，通过小分子化合物 CGX-1321<sup>[139]</sup>或 SB203580<sup>[180]</sup>分别抑制 Wnt 蛋白分泌和 P38 活性，可显著促进成年心肌细胞增殖与修复。将 5 种小分子化合物的组合(5SM)通过腹腔内给予 MI 大鼠，可促进成年心肌重新进入细胞周期，逆转心功能的丧失，减小梗死面积。5SM 可能针对  $\alpha 1$  肾上腺素受体、JAK1、DYRKs、PTEN 和单羧酸转运蛋白 1 (monocarboxylate transporter 1, MCT1)等靶点，以 lactate/mTOR 依赖的方式，促使心肌代谢从氧化磷酸化转向糖酵解，进入细胞周期<sup>[187]</sup>。小分子化合物组合的应用避免了对心肌细胞进行基因操作所面临的风险，为临床应用提供了新的思路。

## 六、新技术在心肌再生中的应用

### 1 多组学联合应用

多项研究通过多组学分析了增殖心肌与非增殖心肌的转录组、蛋白组、代谢产物，揭示了随着心肌细胞增殖能力减退，伴随出现代谢方式从糖代谢到脂肪酸氧化的转变<sup>[25]</sup>，以及麦芽酮酸途径和生酮代谢的激活<sup>[32]</sup>。

多组学技术为深入理解心肌细胞增殖特性及其内在机制提供了多维度的视角。在一项涵盖转录组学、蛋白组学、磷酸蛋白组学和代谢组学的综合研究中，

研究者发现了小鼠从胚胎期到成年期间心肌细胞, 80%的蛋白磷酸化位点修饰、75%的转录本和 64%的蛋白水平在这一过程中发生了变化, 而且这些变化在时间上表现出高度的一致性。通过基于蛋白互作的 iGPS 算法分析发现, MAPKs、CDKs、CDC-like kinases (CLKs)和 Akt 等是这些磷酸化位点修饰的上游激酶。应用机器学习算法进一步鉴定出这些激酶的未知底物, 并发现其主要影响转录调控。结合 ATAC-seq 分析, 研究进一步揭示了 Yy1、Tbx20、Nkx2-5、Gata4、Rbpj、Tbx5、Nr1d2 和 Esrra 等调控心脏发育/心肌增殖的转录因子受到 MAPK 磷酸化修饰的调控。这些发现揭示了磷酸化与转录调控之间的复杂网络<sup>[176]</sup>。

## 2 基于高通量筛选平台的小分子化合物组合

基于高内涵成像(high-content microscopy)、小分子相互作用的算法辅助预测以及 FUCCI/MADM 系统筛选, 研究者从 11000 种小分子化合物中确定了“5SM”小分子化合物组合: Phenylephrine、Baricitinib、Harmine、Vo-ohpic trihydrate 和 AZD3965。5SM 不仅在原代心肌细胞显示出强大的促心肌细胞增殖能力, 腹腔给药后可高效诱导 MI 大鼠成年心肌细胞增殖, 修复受损心肌。<sup>[187]</sup>, 显示了高通量筛选技术用于心肌细胞增殖研究的强大潜力。

## 3 心肌细胞再生精准治疗的优化策略

对心肌再生靶点进行干预的时间、部位进行可控优化, 有助于增加心肌再生疗法的安全性。组织再生增强元件(tissue regeneration enhancer elements, TREEs)是在斑马鱼发现的基因组序列。TREEs 可特异性在损伤组织驱动目标基因表达, 并在组织修复完成后关闭基因表达。在猪 MI 模型, 通过冠脉或心肌注射带 TREE 的 AAV9 病毒, 可在梗死边缘区过表达 Yap 而不影响远端未受损心肌, 并在修复过程结束后自动关闭 Yap 的表达, 这些结果表明 TREE 的时空特异性优势同样适用于大动物模型<sup>[203]</sup>, 为心肌再生的精准治疗提供了有益思路。

## 4 新型递送系统在心肌再生中的应用潜力

脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle, LNP)是目前递送药物、mRNA 或 siRNA 的高效载体, 具有稳定、生物相容性好、毒性低、靶向性可控和递送效率高的特点。LNP 在 COVID-19 mRNA 疫苗<sup>[204]</sup>、“抗纤维化型”嵌合抗原受体 T 细胞

(chimeric antigen receptor T-cell, CAR-T)治疗心肌损伤<sup>[205]</sup>等领域显示出良好的转化前景。此外，利用 LNP 系统递送 siRNA 靶向沉默 PCSK9，以降低 LDL-c 水平的治疗药物(Inclisiran)已运用于临床<sup>[206]</sup>。基于 LNP 在这些领域的成功应用，它有望为心肌再生提供一个有力的递送平台，促进临床转化的实现。

## 七、尚待解决的关键问题

为了进一步推动心肌细胞再生治疗的研究与应用转化，我们面临一系列的关键科学和转化问题尚待解决。

### 1 心肌细胞再生研究需要更为精确的检测工具

如前所述，由于心肌细胞具有进入细胞周期但并不发生胞质分裂的特性，目前的检测指标或工具尚不能完全准确地反映心肌细胞增殖水平。无论是通过检测细胞周期，通过细胞周期活跃的心肌细胞是否成对(或集落大小)间接反映心肌细胞增殖，还是利用基因工程技术标记增殖后心肌细胞，均面临高估或低估心肌细胞增殖能力的问题。同样，由于现有检测方法无法准确标记处于围增殖期，且最终完成胞质分裂的心肌细胞，基于现有工具得到的增殖心肌细胞特性，亦不能完全代表实际完成胞质分裂的心肌细胞特性。例如对细胞周期标志物进行标记的心肌细胞不一定完成胞质分裂，而 MADM 等工具虽能标记完成增殖后的心肌细胞，而无法获得细胞围增殖期的各方面特征。因此，寻求能够多模态、全时程、准确评估和追踪心肌细胞增殖的工具，以及能够获取处于增殖不同阶段心肌细胞的技术和方法显得尤为重要。基于这些工具，我们能够更加深入地理解哺乳动物的心肌细胞再生过程，探讨心肌细胞自身特性、心脏微环境、全身及外部因素如何调控心肌细胞增殖能力的深层机制。

### 2 心肌细胞进入细胞周期后难以完成胞质分裂的瓶颈问题有待解决

哺乳动物在出生后早期，进入细胞周期的心肌细胞具有完成胞质分裂的能力，但随着年龄增大，该能力消失，细胞从增殖转而向多核化转变。例如新生猪的心脏在 3 天后不再具备心肌再生能力，但仍在数月内维持较高的心肌细胞周期活性，这些心肌细胞发生核的复制而不再增殖。此外，多个工具小鼠模型证实，MI 可刺激成年心肌细胞重新进入细胞周期，但这些细胞仅有极少比例可完成胞质分裂。因此，今后的研究除了关注如何促进心肌细胞进入周期以外，还有必要进一步阐明心肌细胞难以完成胞质分裂的深层机制，寻找促进胞质分

裂的干预策略，对心肌细胞增殖研究具有重要意义。

### 3 心肌细胞再生的去分化和再分化过程有待进一步阐明

心肌细胞增殖是包括去分化、增殖及再分化的连续过程。尽管目前的研究已对其中的增殖过程有了较为全面的了解，但对于去分化和再分化的研究却相对有限。因此，未来的研究应更加重视对心肌细胞去分化和再分化阶段的探索，这包括更加准确地评估再生过程中的去分化和再分化，阐明其深层调控机制，明确干预去分化和再分化是否可进一步增加促心肌细胞增殖靶点的疗效，发挥协同作用。以确保我们对整个心肌细胞增殖过程有一个完整和全面的认识，推动对心肌细胞再生疗法的应用。

### 4 如何有效控制心肌细胞增殖的程度、部位对转化应用至关重要

为了将心肌再生研究转化为有效的治疗手段，严格控制刺激心肌细胞增殖的程度、作用时间以及目标区域至关重要。过度活跃的心肌细胞增殖可导致心脏肿瘤的发生<sup>[60]</sup>。此外，心肌细胞增殖所经历的去分化还引起肌小节解聚，大量心肌细胞同时进入细胞周期，可能会导致特定时间内具有收缩功能的心肌细胞数量下降，从而加重心力衰竭，例如 miR-302~367 转基因小鼠虽在 MI 后短期内观察到心肌细胞增殖激活，梗死面积减小，但在三周后显示出心脏扩大，Myh6 表达下降而胚胎期基因 Myh7 表达升高，肌小节排列紊乱。这表明长期、大量的心肌细胞去分化可导致心功能失调。并且，大量心肌去分化后与周围心肌解耦联，导致心律失常的发生。在猪 MI 模型，心肌持续表达 miR-199a 导致动物在 8 周后出现致命的心律失常而死亡，这可能是由于不受控制的心肌细胞过度增殖所导致<sup>[167]</sup>。此外，尽管促进心肌细胞增殖可改善 MI 后心脏的结构与功能，但增殖心肌细胞与原有心肌细胞的整合情况尚待进一步研究。因此，对于心肌细胞再生疗法可能带来的副作用及安全问题，进一步优化治疗策略的时间选择、靶向特异性和干预强度，监测心肌细胞增殖之后的整合情况，以及建立与之相关的新技术、新方法尤为关键。此外，在转化过程也应关注心肌再生治疗引起其他脏器肿瘤发生或不良反应的可能。

## 5 药物和靶点筛选需要更接近人类心脏、成熟度更高的模型，以利于临床转化

目前的基因和药物筛选模型，主要有斑马鱼胚胎、新生大、小鼠心肌细胞、转基因小鼠心肌细胞、ESC 或 hiPSC 来源的心肌细胞以及人心脏类器官等。利用斑马鱼胚胎模型进行筛选具有一定的优势，如实验周期短、胚胎透明、产卵多、药量少、给药方便，可以将化合物溶解于水中扩散至胚胎，但斑马鱼模型中筛选的药物在哺乳动物中是否同样有良好的药效仍是一个疑问。以新生大、小鼠心肌细胞为筛选模型可在体外实现高通量，但其成熟度低于成年心肌细胞。转基因小鼠可以更好地指征增殖的心肌细胞，但配繁周期较长、成本较高且通量有限。2D 培养的 ESC 或 hiPSC 来源的心肌细胞具有较高的成熟性，但同样存在缺陷，即无法评估药物对心脏收缩、舒张及心律失常的影响。相比之下，成熟的心脏类器官可以用于评估药物对心脏收缩和舒张的影响。研究人员新近开发了一种高效分离、培养和保存原代人心肌细胞的方法。该方法可最大程度地保留心肌细胞的电生理、收缩功能等方面特性，且较 hiPSC 来源的心肌细胞更为成熟，为药物筛选提供了更多选择<sup>[207]</sup>。发展高通量、成熟的心脏类器官基因及药物筛选平台对于心脏再生有关键的推动作用。

## 6 心肌细胞再生研究亟待新技术的开发

为实现上述目标，新技术的开发应用必不可少。这包括用于准确识别和获取正在分裂的心肌细胞的先进工具、更加高效的筛选平台，新型组学的应用，以及更为安全、精确和可控的体内干预方法。实现这一目标需要来自不同学科的协同合作，涵盖分子生物学、医学影像学、药理学、生物工程和计算生物学等领域。通过这种跨学科的合作，有望推动心肌细胞再生领域新技术的开发，从而为心肌再生的研究和转化提供全新的方向。

## 7 心肌细胞再生疗法的安全性和有效性需要在大动物模型进一步验证

在小鼠模型中发现的促心肌细胞增殖靶点，仅有极少部分在大动物进行有效性的验证。另一方面，对这些靶点进行永久性、全面的干预也带来安全性问题。鉴于此，在心肌细胞再生的转化和应用层面，对于在啮齿类动物模型中发现的心肌细胞增殖干预靶点，有必要在大动物模型中进行更深入的验证实验，以确保其有效性与安全性。

猪等大动物具有与人类相似的心率、血压，其心脏重量与生理特性与人类心脏更加接近，其 MI 模型更接近临床 MI 特征。在猪等大动物模型进行心肌细胞增殖的临床前研究，是实现心肌再生基础研究到临床转化的必要过程。猪和人的心肌细胞特性在多个方面和小鼠心肌存在差异。小鼠在出生后 1 周内，伴随着心肌细胞增殖能力的减退，细胞周期的退出、心肌多核化和代谢方式的转变几乎同步完成。新生猪的心脏则在出生后 2 周至 6 个月内才完成上述转变。人心肌细胞完成上述过程则需要更长的时间。不仅如此，与小鼠心肌细胞增殖相关的 AKT 磷酸化和  $\beta$ -catenin 蛋白水平直到出生后 6 个月在猪的心肌中也未显著下降<sup>[208]</sup>。这些结果显示，与小鼠相比，猪等大动物的心肌细胞增殖特性和调控机制可能存在异质性，小鼠模型上的实验结果有必要在大动物模型进行进一步验证。

目前，一些在小鼠模型中发现的心肌细胞增殖靶点的有效性已在大动物模型中得到验证。例如在猪 MI 模型给与 Agrin<sup>[43]</sup>或 Periostin<sup>[91]</sup>，过表达 miR-199a<sup>[167]</sup>、Ccna2<sup>[209]</sup>、Ccnd2<sup>[210]</sup>、Fgf5<sup>[211]</sup>、Yap<sup>[203]</sup>、m6A 去甲基酶 FTO<sup>[212]</sup>以及细胞周期因子组合“4F”<sup>[213]</sup>，敲低 Hippo 通路基因 Salvador<sup>[128]</sup>，通过心外膜给与 Fst11 蛋白均可获得和小鼠模型类似的促心肌细胞增殖与修复效果<sup>[123]</sup>。在羊的胚胎发育模型，甲状腺素 T3 和甲状腺素受体 TR 对心肌细胞增殖的抑制作用得到确认，进一步验证了小鼠模型上的研究成果<sup>[214]</sup>。但是，这类研究仍然相对较少，更多的心肌细胞增殖干预靶点需要在大动物模型中进行进一步验证，以最终推动心肌细胞再生研究的临床转化。综上所述，为了实现心肌细胞再生研究的临床转化，我们需要在多方面取得突破，包括开发新的检测技术、深入理解心肌细胞胞质分裂的机制，以及在大动物模型中验证新的治疗策略。这些努力将有助于推动心肌细胞再生疗法的发展，为治疗 MI 后心力衰竭提供新的可能性。

## 参考文献

- 1 Wang WE, Yang D, Li L, Wang W, Peng Y, Chen C, Chen P, Xia X, Wang H, Jiang J, Liao Q, Li Y, Xie G, Huang H, Guo Y, Ye L, Duan DD, Chen X, Houser SR, Zeng C. Prolyl hydroxylase domain protein 2 silencing enhances the survival and paracrine function of transplanted adipose-derived stem cells in infarcted myocardium. *Circ Res* 2013; 113(3): 288–300.

- 2 Rasmussen TL, Raveendran G, Zhang J, Garry DJ. Getting to the heart of myocardial stem cells and cell therapy. *Circulation* 2011; 123(16): 1771–1779.
- 3 Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 2016; 538(7625): 388–391.
- 4 Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324(5923): 98–102.
- 5 Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, Moon J, Amatruda JF, Phelps KL, Grinsfelder D, Rothermel BA, Chen R, Garcia JA, Santos CX, Thet S, Mori E, Kinter MT, Rindler PM, Zacchigna S, Mukherjee S, Chen DJ, Mahmoud AI, Giacca M, Rabinovitch PS, Aroumougame A, Shah AM, Szweda LI, Sadek HA. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* 2014; 157(3): 565–579.
- 6 Hirose K, Payumo AY, Cutie S, Hoang A, Zhang H, Guyot R, Lunn D, Bigley RB, Yu H, Wang J, Smith M, Gillett E, Muroy SE, Schmid T, Wilson E, Field KA, Reeder DM, Maden M, Yartsev MM, Wolfgang MJ, Grutzner F, Scanlan TS, Szweda LI, Buffenstein R, Hu G, Flamant F, Olgin JE, Huang GN. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. *Science* 2019; 364(6436): 184–188.
- 7 Jopling C, Sleep E, Raya M, Marti M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 2010; 464(7288): 606–609.
- 8 Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 2011; 331(6020): 1078–1080.
- 9 Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Lechene CP, Lee RT. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 2013; 493(7432): 433–436.
- 10 He L, Han M, Zhang Z, Li Y, Huang X, Liu X, Pu W, Zhao H, Wang QD, Nie Y, Zhou B. Reassessment of c-Kit<sup>+</sup> Cells for Cardiomyocyte Contribution in Adult Heart. *Circulation* 2019; 140(2): 164–166.
- 11 Zhu W, Zhang E, Zhao M, Chong Z, Fan C, Tang Y, Hunter JD, Borovjagin AV, Walcott GP, Chen JY, Qin G, Zhang J. Regenerative Potential of Neonatal Porcine Hearts. *Circulation* 2018; 138(24): 2809–2816.
- 12 Kimura W, Xiao F, Canseco DC, Muralidhar S, Thet S, Zhang HM, Abderrahman Y, Chen R, Garcia JA, Shelton JM, Richardson JA, Ashour AM, Asaithamby A, Liang H, Xing C, Lu Z, Zhang CC, Sadek HA. Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. *Nature* 2015; 523(7559): 226–230.
- 13 Ali SR, Hippenmeyer S, Saadat LV, Luo L, Weissman IL, Ardehali R. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A 2014; 111(24): 8850–8855.
- 14 Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428(6983): 668–673.
- 15 Li Y, He L, Huang X, Bhaloo SI, Zhao H, Zhang S, Pu W, Tian X, Li Y, Liu Q, Yu W, Zhang L, Liu X, Liu K, Tang J, Zhang H, Cai D, Ralf AH, Xu Q, Lui KO, Zhou B. Genetic lineage tracing of nonmyocyte population by dual recombinases. *Circulation* 2018; 138(8): 793–805.
- 16 Wang WE, Li L, Xia X, Fu W, Liao Q, Lan C, Yang D, Chen H, Yue R, Zeng C, Zhou L, Zhou B, Duan DD, Chen X, Houser SR, Zeng C. Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury. *Circulation* 2017; 136(9): 834–848.
- 17 Zhu Y, Do VD, Richards AM, Foo R. What we know about cardiomyocyte dedifferentiation. *J Mol Cell Cardiol* 2021; 152: 80–91.
- 18 Leone M, Engel FB. Advances in heart regeneration based on cardiomyocyte proliferation and regenerative potential of binucleated cardiomyocytes and polyploidization. *Clin Sci (Lond)* 2019; 133(11): 1229–1253.
- 19 Fu W, Liao Q, Shi Y, Liu W, Ren H, Xu C, Zeng C. Transient induction of actin cytoskeletal remodeling associated with dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation stimulates cardiac regeneration. *Acta Pharma Sin B* 2024; <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.01.021>.
- 20 Gonzalez-Rosa JM, Sharpe M, Field D, Soonpaa MH, Field LJ, Burns CE, Burns CG. Myocardial polyploidization creates a barrier to heart regeneration in zebrafish. *Dev Cell* 2018; 44(4): 433–446 e437.
- 21 Patterson M, Barske L, Van Handel B, Rau CD, Gan P, Sharma A, Parikh S, Denholtz M, Huang Y, Yamaguchi Y, Shen H, Allayee H, Crump JG, Force TI, Lien CL, Makita T, Lusic AJ, Kumar SR, Sucov HM. Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. *Nat Genet* 2017; 49(9): 1346–1353.
- 22 Yuan X, Braun T. Multimodal regulation of cardiac myocyte proliferation. *Circ Res* 2017; 121(3): 293–309.
- 23 Gao F, Liang T, Lu YW, Pu L, Fu X, Dong X, Hong T, Zhang F, Liu N, Zhou Y, Wang H, Liang P, Guo Y, Yu H, Zhu W, Hu X, Chen H, Zhou B, Pu WT, Mably JD, Wang J, Wang DZ, Chen J. Reduced mitochondrial protein translation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation* 2023; 148(23): 1887–1906.
- 24 Cardoso AC, Lam NT, Savla JJ, Nakada Y, Pereira AHM, Elnwasany A, Menendez-Montes I, Ensley EL, Petric UB, Sharma G, Sherry AD, Malloy CR, Khemtong C, Kinter MT, Tan WLW, Anene-Nzulu CG, Foo RS, Nguyen NUN, Li S, Ahmed MS, Elhelaly WM, Abdisalaam S, Asaithamby A, Xing C, Kanchwala M, Vale G, Eckert KM, Mitsche MA, McDonald JG, Hill JA, Huang L, Shaul PW, Szweda LI, Sadek HA. Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell cycle progression. *Nat Metab* 2020; 2(2): 167–178.
- 25 Lalowski MM, Bjork S, Finckenberg P, Soliymani R, Tarkia M, Calza G,

- Blokhina D, Tulokas S, Kankainen M, Lakkisto P, Baumann M, Kankuri E, Mervaala E. Characterizing the key metabolic pathways of the neonatal mouse heart using a quantitative combinatorial omics approach. *Front Physiol* 2018; 9: 365.
- 26 Quaife-Ryan GA, Sim CB, Ziemann M, Kaspi A, Rafehi H, Ramialison M, El-Osta A, Hudson JE, Porrello ER. Multicellular transcriptional analysis of mammalian heart regeneration. *Circulation* 2017; 136(12): 1123–1139.
- 27 Cui M, Wang Z, Chen K, Shah AM, Tan W, Duan L, Sanchez-Ortiz E, Li H, Xu L, Liu N, Bassel-Duby R, Olson EN. Dynamic transcriptional responses to injury of regenerative and non-regenerative cardiomyocytes revealed by single-nucleus RNA sequencing. *Dev Cell* 2020; 53(1): 102–116 e108.
- 28 Wang Z, Cui M, Shah AM, Tan W, Liu N, Bassel-Duby R, Olson EN. Cell-type-specific gene regulatory networks underlying murine neonatal heart regeneration at single-cell resolution. *Cell Rep* 2020; 33(10): 108472.
- 29 Nakada Y, Zhou Y, Gong W, Zhang EY, Skie E, Nguyen T, Wei Y, Zhao M, Chen W, Sun J, Raza SN, Chen JY, Walcott GP, Garry DJ, Zhang JJ. Single nucleus transcriptomics: apical resection in newborn pigs extends the time window of cardiomyocyte proliferation and myocardial regeneration. *Circulation* 2022; 145(23): 1744–1747.
- 30 Borghetti G, Eisenberg CA, Signore S, Sorrentino A, Kaur K, Andrade-Vicenty A, Edwards JG, Nerkar M, Qanud K, Sun D, Goichberg P, Leri A, Anversa P, Eisenberg LM, Jacobson JT, Hintze TH, Rota M. Notch signaling modulates the electrical behavior of cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2018; 314(1): H68–H81.
- 31 Nguyen PD, Gooijers I, Campostrini G, Verkerk AO, Honkoop H, Bouwman M, de Bakker DEM, Koopmans T, Vink A, Lamers GEM, Shakked A, Mars J, Mulder AA, Chocron S, Bartscherer K, Tzahor E, Mummery CL, de Boer TP, Bellin M, Bakkers J. Interplay between calcium and sarcomeres directs cardiomyocyte maturation during regeneration. *Science* 2023; 380(6646): 758–764.
- 32 Talman V, Teppo J, Poho P, Movahedi P, Vaikkinen A, Karhu ST, Trost K, Suvitaival T, Heikkonen J, Pahikkala T, Kotiaho T, Kostiaainen R, Varjosalo M, Ruskoaho H. Molecular atlas of postnatal mouse heart development. *J Am Heart Assoc* 2018; 7(20): e010378.
- 33 Magadum A, Singh N, Kurian AA, Munir I, Mehmood T, Brown K, Sharkar MTK, Chepurko E, Sassi Y, Oh JG, Lee P, Santos CXC, Gazieli-Sovran A, Zhang G, Cai CL, Kho C, Mayr M, Shah AM, Hajjar RJ, Zangi L. Pkm2 regulates cardiomyocyte cell cycle and promotes cardiac regeneration. *Circulation* 2020; 141(15): 1249–1265.
- 34 Li X, Wu F, Gunther S, Looso M, Kuenne C, Zhang T, Wiesnet M, Klatt S, Zukunft S, Fleming I, Poschet G, Wietelmann A, Atzberger A, Potente M, Yuan X, Braun T. Inhibition of fatty acid oxidation enables heart regeneration in adult mice. *Nature* 2023; 622(7983): 619–626.
- 35 Miklas JW, Levy S, Hofsteen P, Mex DI, Clark E, Muster J, Robitaille AM,

- Sivaram G, Abell L, Goodson JM, Pranoto I, Madan A, Chin MT, Tian R, Murry CE, Moon RT, Wang Y, Ruohola-Baker H. Amino acid primed mTOR activity is essential for heart regeneration. *iScience* 2022; 25(1): 103574.
- 36 Zhang D, Ning J, Ramprasath T, Yu C, Zheng X, Song P, Xie Z, Zou MH. Kynurenine promotes neonatal heart regeneration by stimulating cardiomyocyte proliferation and cardiac angiogenesis. *Nat Commun* 2022; 13(1): 6371.
- 37 Mahmoud AI, Porrello ER, Kimura W, Olson EN, Sadek HA. Surgical models for cardiac regeneration in neonatal mice. *Nat Protoc* 2014; 9(2): 305–311.
- 38 Bei Y, Chen C, Hua X, Yin M, Meng X, Huang Z, Qi W, Su Z, Liu C, Lehmann HI, Li G, Huang Y, Xiao J. A modified apical resection model with high accuracy and reproducibility in neonatal mouse and rat hearts. *NPJ Regen Med* 2023; 8(1): 9.
- 39 Zhao M, Zhang E, Wei Y, Zhou Y, Walcott GP, Zhang J. Apical resection prolongs the cell cycle activity and promotes myocardial regeneration after left ventricular injury in neonatal pig. *Circulation* 2020; 142(9): 913–916.
- 40 Lam NT, Sadek HA. Neonatal heart regeneration: comprehensive literature review. *Circulation* 2018; 138(4): 412–423.
- 41 Liu X, Pu W, He L, Li Y, Zhao H, Li Y, Liu K, Huang X, Weng W, Wang QD, Shen L, Zhong T, Sun K, Ardehali R, He B, Zhou B. Cell proliferation fate mapping reveals regional cardiomyocyte cell-cycle activity in subendocardial muscle of left ventricle. *Nat Commun* 2021; 12(1): 5784.
- 42 Bradley LA, Young A, Li H, Billcheck HO, Wolf MJ. Loss of endogenously cycling adult cardiomyocytes worsens myocardial function. *Circ Res* 2021; 128(2): 155–168.
- 43 Baehr A, Umansky KB, Bassat E, Jurisch V, Klett K, Bozoglu T, Hornaschewitz N, Solyanik O, Kain D, Ferraro B, Cohen-Rabi R, Krane M, Cyran C, Soehnlein O, Laugwitz KL, Hinkel R, Kupatt C, Tzahor E. Agrin promotes coordinated therapeutic processes leading to improved cardiac repair in pigs. *Circulation* 2020; 142(9): 868–881.
- 44 Gu J, Chen X, Jin Y, Liu M, Xu Q, Liu X, Luo Z, Ling S, Liu N, Liu S. A neonatal mouse model for pressure overload: myocardial response corresponds to severity. *Front Cardiovasc Med* 2021; 8: 660246.
- 45 Souders CA, Borg TK, Banerjee I, Baudino TA. Pressure overload induces early morphological changes in the heart. *Am J Pathol* 2012; 181(4): 1226–1235.
- 46 Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31(1): 13–20.
- 47 Auchampach J, Han L, Huang GN, Kuhn B, Lough JW, O'Meara CC, Payumo AY, Rosenthal NA, Sucov HM, Yutzey KE, Patterson M. Measuring cardiomyocyte cell-cycle activity and proliferation in the age of heart regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2022; 322(4): H579–H596.
- 48 Vujic A, Lerchenmuller C, Wu TD, Guillermier C, Rabolli CP, Gonzalez E, Senyo SE, Liu X, Guerquin-Kern JL, Steinhauser ML, Lee RT, Rosenzweig A. Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian heart.

- Nat Commun 2018; 9(1): 1659.
- 49 Rashbrook VS, Brash JT, Ruhrberg C. Cre toxicity in mouse models of cardiovascular physiology and disease. *Nat Cardiovasc Res* 2022; 1: 806–816.
- 50 Alvarez R, Jr., Wang BJ, Quijada PJ, Avitabile D, Ho T, Shaitrit M, Chavarria M, Firouzi F, Ebeid D, Monsanto MM, Navarrete N, Moshref M, Siddiqi S, Broughton KM, Bailey BA, Gude NA, Sussman MA. Cardiomyocyte cell cycle dynamics and proliferation revealed through cardiac-specific transgenesis of fluorescent ubiquitinated cell cycle indicator (FUCCI). *J Mol Cell Cardiol* 2019; 127: 154–164.
- 51 Hesse M, Doengi M, Becker A, Kimura K, Voeltz N, Stein V, Fleischmann BK. Midbody positioning and distance between daughter nuclei enable unequivocal identification of cardiomyocyte cell division in mice. *Circ Res* 2018; 123(9): 1039–1052.
- 52 Fu W, Liao Q, Li L, Shi Y, Zeng A, Zeng C, Wang WE. An aurora kinase B-based mouse system to efficiently identify and analyze proliferating cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 570252.
- 53 Pu W, Zhang M, Liu X, He L, Li J, Han X, Lui KO, He B, Zhou B. Genetic proliferation tracing reveals a rapid cell cycle withdrawal in preadolescent cardiomyocytes. *Circulation* 2022; 145(5): 410–412.
- 54 Sereti KI, Nguyen NB, Kamran P, Zhao P, Ranjbarvaziri S, Park S, Sabri S, Engel JL, Sung K, Kulkarni RP, Ding Y, Hsiai TK, Plath K, Ernst J, Sahoo D, Mikkola HKA, Iruela-Arispe ML, Ardehali R. Analysis of cardiomyocyte clonal expansion during mouse heart development and injury. *Nat Commun* 2018; 9(1): 754.
- 55 Wang LL, Liu Y, Chung JJ, Wang T, Gaffey AC, Lu M, Cavanaugh CA, Zhou S, Kanade R, Atluri P, Morrisey EE, Burdick JA. Local and sustained miRNA delivery from an injectable hydrogel promotes cardiomyocyte proliferation and functional regeneration after ischemic injury. *Nat Biomed Eng* 2017; 1: 983–992.
- 56 Hirai M, Chen J, Evans SM. Tissue-specific cell cycle indicator reveals unexpected findings for cardiac myocyte proliferation. *Circ Res* 2016; 118(1): 20–28.
- 57 Naqvi N, Li M, Calvert JW, Tejada T, Lambert JP, Wu J, Kesteven SH, Holman SR, Matsuda T, Lovelock JD, Howard WW, Iismaa SE, Chan AY, Crawford BH, Wagner MB, Martin DI, Lefer DJ, Graham RM, Husain A. A proliferative burst during preadolescence establishes the final cardiomyocyte number. *Cell* 2014; 157(4): 795–807.
- 58 Cui M, Bezprozvannaya S, Hao T, Elnwasany A, Szweda LI, Liu N, Bassel-Duby R, Olson EN. Transcription factor NFYA controls cardiomyocyte metabolism and proliferation during mouse fetal heart development. *Dev Cell* 2023; 58(24): 2867–2880 e2867.
- 59 Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, Zhou P, Huang Y, Elfenbein A, Foley A, Magnitsky S, Srivastava D. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. *Cell* 2018; 173(1): 104–

116 e112.

- 60 Chen Y, Luttmann FF, Schoger E, Scholer HR, Zelarayan LC, Kim KP, Haigh JJ, Kim J, Braun T. Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science* 2021; 373(6562): 1537–1540.
- 61 Young A, Bradley LA, Wolf MJ. *In vivo* methods to monitor cardiomyocyte proliferation. *J Cardiovasc Dev Dis* 2022; 9(3): 73.
- 62 Li M, Zheng H, Han Y, Chen Y, Li B, Chen G, Chen X, Huang S, He X, Wei G, Xu T, Feng X, Liao W, Liao Y, Chen Y, Bin J. LncRNA *Snhg1*-driven self-reinforcing regulatory network promoted cardiac regeneration and repair after myocardial infarction. *Theranostics* 2021; 11(19): 9397–9414.
- 63 Chen Y, Wu G, Li M, Hesse M, Ma Y, Chen W, Huang H, Liu Y, Xu W, Tang Y, Zheng H, Li C, Lin Z, Chen G, Liao W, Liao Y, Bin J, Chen Y. LDHA-mediated metabolic reprogramming promoted cardiomyocyte proliferation by alleviating ROS and inducing M2 macrophage polarization. *Redox Biol* 2022; 56: 102446.
- 64 Ye S, Wang C, Xu Z, Lin H, Wan X, Yu Y, Adhicary S, Zhang JZ, Zhou Y, Liu C, Alonzo M, Bi J, Ramirez-Navarro A, Deschenes I, Ma Q, Garg V, Wu JC, Zhao MT. Impaired human cardiac cell development due to NOTCH1 deficiency. *Circ Res* 2023; 132(2): 187–204.
- 65 Wang J, Jiang X, Zhao L, Zuo S, Chen X, Zhang L, Lin Z, Zhao X, Qin Y, Zhou X, Yu XY. Lineage reprogramming of fibroblasts into induced cardiac progenitor cells by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators. *Acta Pharm Sin B* 2020; 10(2): 313–326.
- 66 Li J, Zhu D, Hu S, Nie Y. CRISPR-CasRx knock-in mice for RNA degradation. *Sci China Life Sci* 2022; 65(11): 2248–2256.
- 67 Zangi L, Lui KO, von Gise A, Ma Q, Ebina W, Ptaszek LM, Spater D, Xu H, Tabebordbar M, Gorbатов R, Sena B, Nahrendorf M, Briscoe DM, Li RA, Wagers AJ, Rossi DJ, Pu WT, Chien KR. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol* 2013; 31(10): 898–907.
- 68 Sun J, Wang L, Matthews RC, Walcott GP, Lu YA, Wei Y, Zhou Y, Zangi L, Zhang J. CCND2 modified mrna activates cell cycle of cardiomyocytes in hearts with myocardial infarction in mice and pigs. *Circ Res* 2023; 133(6): 484–504.
- 69 Borden A, Kurian J, Nickoloff E, Yang Y, Troupes CD, Ibeti J, Lucchese AM, Gao E, Mohsin S, Koch WJ, Houser SR, Kishore R, Khan M. Transient introduction of miR-294 in the heart promotes cardiomyocyte cell cycle reentry after injury. *Circ Res* 2019; 125(1): 14–25.
- 70 Zheng H, Huang S, Wei G, Sun Y, Li C, Si X, Chen Y, Tang Z, Li X, Chen Y, Liao W, Liao Y, Bin J. CircRNA *Samd4* induces cardiac repair after myocardial infarction by blocking mitochondria-derived ROS output. *Mol Ther* 2022; 30(11): 3477–3498.
- 71 Fu W, Ren H, Shou J, Liao Q, Li L, Shi Y, Jose PA, Zeng C, Wang WE. Loss of NPPA-AS1 promotes heart regeneration by stabilizing SFPQ-NONO heteromer-induced DNA repair. *Basic Res Cardiol* 2022; 117(1): 10.
- 72 Gao R, Wang L, Bei Y, Wu X, Wang J, Zhou Q, Tao L, Das S, Li X, Xiao J.

- Long noncoding RNA cardiac physiological hypertrophy-associated regulator induces cardiac physiological hypertrophy and promotes functional recovery after myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2021; 144(4): 303–317.
- 73 Shi J, Bei Y, Kong X, Liu X, Lei Z, Xu T, Wang H, Xuan Q, Chen P, Xu J, Che L, Liu H, Zhong J, Sluijter JP, Li X, Rosenzweig A, Xiao J. miR-17-3p contributes to exercise-induced cardiac growth and protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Theranostics* 2017; 7(3): 664–676.
- 74 Liu X, Xiao J, Zhu H, Wei X, Platt C, Damilano F, Xiao C, Bezzerides V, Bostrom P, Che L, Zhang C, Spiegelman BM, Rosenzweig A. miR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell Metab* 2015; 21(4): 584–595.
- 75 Wang L, Feng J, Feng X, Meng D, Zhao X, Wang J, Yu P, Xu GE, Hu M, Wang T, Lehmann HI, Li G, Sluijter JPG, Xiao J. Exercise-induced circular RNA circUtrn is required for cardiac physiological hypertrophy and prevents myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2023; 119(16): 2638–2652.
- 76 Canseco DC, Kimura W, Garg S, Mukherjee S, Bhattacharya S, Abdisalaam S, Das S, Asaithamby A, Mammen PP, Sadek HA. Human ventricular unloading induces cardiomyocyte proliferation. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65(9): 892–900.
- 77 Liu H, Zhang CH, Ammanamanchi N, Suresh S, Lewarchik C, Rao K, Uys GM, Han L, Abrial M, Yimlamai D, Ganapathy B, Guillermier C, Chen N, Khaladkar M, Spaethling J, Eberwine JH, Kim J, Walsh S, Choudhury S, Little K, Francis K, Sharma M, Viegas M, Bais A, Kostka D, Ding J, Bar-Joseph Z, Wu Y, Yechoor V, Moulik M, Johnson J, Weinberg J, Reyes-Mugica M, Steinhauser ML, Kuhn B. Control of cytokinesis by beta-adrenergic receptors indicates an approach for regulating cardiomyocyte endowment. *Sci Transl Med* 2019; 11(513).
- 78 Lan C, Cao N, Chen C, Qu S, Fan C, Luo H, Zeng A, Yu C, Xue Y, Ren H, Li L, Wang H, Jose PA, Xu Z, Zeng C. Progesterone, via yes-associated protein, promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Cell Prolif* 2020; 53(11): e12910.
- 79 Wang Z, Cui M, Shah AM, Ye W, Tan W, Min YL, Botten GA, Shelton JM, Liu N, Bassel-Duby R, Olson EN. Mechanistic basis of neonatal heart regeneration revealed by transcriptome and histone modification profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(37): 18455–18465.
- 80 Han C, Nie Y, Lian H, Liu R, He F, Huang H, Hu S. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res* 2015; 25(10): 1137–1151.
- 81 Li J, Yang KY, Tam RCY, Chan VW, Lan HY, Hori S, Zhou B, Lui KO. Regulatory T-cells regulate neonatal heart regeneration by potentiating cardiomyocyte proliferation in a paracrine manner. *Theranostics* 2019; 9(15): 4324–4341.
- 82 Tao Z, Loo S, Su L, Abdurrachim D, Lalic J, Lee TH, Chen X, Tan RS, Zhang

- J, Ye L. Dexamethasone inhibits regeneration and causes ventricular aneurysm in the neonatal porcine heart after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2020; 144: 15–23.
- 83 Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest* 2014; 124(3): 1382–1392.
- 84 Li Y, Li H, Pei J, Hu S, Nie Y. Transplantation of murine neonatal cardiac macrophage improves adult cardiac repair. *Cell Mol Immunol* 2021; 18(2): 492–494.
- 85 Li Y, Feng J, Song S, Li H, Yang H, Zhou B, Li Y, Yue Z, Lian H, Liu L, Hu S, Nie Y. gp130 Controls Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Circulation* 2020; 142(10): 967–982.
- 86 Dolejsi T, Delgobo M, Schuetz T, Tortola L, Heinze KG, Hofmann U, Frantz S, Bauer A, Ruschitzka F, Penninger JM, Campos Ramos G, Haubner BJ. Adult T-cells impair neonatal cardiac regeneration. *Eur Heart J* 2022; 43(28): 2698–2709.
- 87 Liu X, De la Cruz E, Gu X, Balint L, Oxendine-Burns M, Terrones T, Ma W, Kuo HH, Lantz C, Bansal T, Thorp E, Burrridge P, Jakus Z, Herz J, Cleaver O, Torres M, Oliver G. Lymphoangiocrine signals promote cardiac growth and repair. *Nature* 2020; 588(7839): 705–711.
- 88 Chen WC, Wang Z, Missinato MA, Park DW, Long DW, Liu HJ, Zeng X, Yates NA, Kim K, Wang Y. Decellularized zebrafish cardiac extracellular matrix induces mammalian heart regeneration. *Sci Adv* 2016; 2(11): e1600844.
- 89 Bassat E, Mutlak YE, Genzelinakh A, Shadrin IY, Baruch Umansky K, Yifa O, Kain D, Rajchman D, Leach J, Riabov Bassat D, Udi Y, Sarig R, Sagi I, Martin JF, Bursac N, Cohen S, Tzahor E. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature* 2017; 547(7662): 179–184.
- 90 Kuhn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, Keating MT. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 2007; 13(8): 962–969.
- 91 Ladage D, Yaniz-Galende E, Rapti K, Ishikawa K, Tilemann L, Shapiro S, Takewa Y, Muller-Ehmsen J, Schwarz M, Garcia MJ, Sanz J, Hajjar RJ, Kawase Y. Stimulating myocardial regeneration with periostin Peptide in large mammals improves function post-myocardial infarction but increases myocardial fibrosis. *PLoS One* 2013; 8(5): e59656.
- 92 Feng J, Li Y, Li Y, Yin Q, Li H, Li J, Zhou B, Meng J, Lian H, Wu M, Li Y, Dou K, Song W, Lu B, Liu L, Hu S, Nie Y. Versican promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Circulation* 2023; 10.1161/CIRCULATIONAHA.123.066298.
- 93 Notari M, Ventura-Rubio A, Bedford-Guaus SJ, Jorba I, Mulero L, Navajas D, Marti M, Raya A. The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart. *Sci Adv* 2018; 4(5): eaao5553.
- 94 Yahalom-Ronen Y, Rajchman D, Sarig R, Geiger B, Tzahor E. Reduced matrix rigidity promotes neonatal cardiomyocyte dedifferentiation, proliferation and clonal expansion. *Elife* 2015; 4: e07455.

- 95 Mahmoud AI, O'Meara CC, Gemberling M, Zhao L, Bryant DM, Zheng R, Gannon JB, Cai L, Choi WY, Egnaczyk GF, Burns CE, Burns CG, MacRae CA, Poss KD, Lee RT. Nerves regulate cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Dev Cell* 2015; 34(4): 387–399.
- 96 Tampakakis E, Gangrade H, Glavaris S, Htet M, Murphy S, Lin BL, Liu T, Saberi A, Miyamoto M, Kowalski W, Mukoyama YS, Lee G, Minichiello L, Kwon C. Heart neurons use clock genes to control myocyte proliferation. *Sci Adv* 2021; 7(49): eabh4181.
- 97 Marin-Juez R, Marass M, Gauvrit S, Rossi A, Lai SL, Materna SC, Black BL, Stainier DY. Fast revascularization of the injured area is essential to support zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113(40): 11237–11242.
- 98 El-Sammak H, Yang B, Guenther S, Chen W, Marin-Juez R, Stainier DYR. A Vegfc-Emilin2a-Cxcl8a signaling axis required for zebrafish cardiac regeneration. *Circ Res* 2022; 130(7): 1014–1029.
- 99 Das S, Goldstone AB, Wang H, Farry J, D'Amato G, Paulsen MJ, Eskandari A, Hironaka CE, Phansalkar R, Sharma B, Rhee S, Shamskhou EA, Agalliu D, de Jesus Perez V, Woo YJ, Red-Horse K. A unique collateral artery development program promotes neonatal heart regeneration. *Cell* 2019; 176(5): 1128–1142 e1118.
- 100 Imhof BA, Aurrand-Lions M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med* 2006; 12(2): 171–172.
- 101 Wang Y, Yao F, Wang L, Li Z, Ren Z, Li D, Zhang M, Han L, Wang SQ, Zhou B, Wang L. Single-cell analysis of murine fibroblasts identifies neonatal to adult switching that regulates cardiomyocyte maturation. *Nat Commun* 2020; 11(1): 2585.
- 102 Liu S, Tang L, Zhao X, Nguyen B, Heallen TR, Li M, Wang J, Wang J, Martin JF. Yap promotes noncanonical wnt signals from cardiomyocytes for heart regeneration. *Circ Res* 2021; 129(8): 782–797.
- 103 Polizzotti BD, Ganapathy B, Walsh S, Choudhury S, Ammanamanchi N, Bennett DG, dos Remedios CG, Haubner BJ, Penninger JM, Kuhn B. Neuregulin stimulation of cardiomyocyte regeneration in mice and human myocardium reveals a therapeutic window. *Sci Transl Med* 2015; 7(281): 281ra245.
- 104 Haubner BJ, Schneider J, Schweigmann U, Schuetz T, Dichtl W, Velik-Salchner C, Stein JI, Penninger JM. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction. *Circ Res* 2016; 118(2): 216–221.
- 105 Farooqi KM, Sutton N, Weinstein S, Menegus M, Spindola-Franco H, Pass RH. Neonatal myocardial infarction: case report and review of the literature. *Congenit Heart Dis* 2012; 7(6): E97–102.
- 106 Deutsch MA, Cleuziou J, Noebauer C, Eicken A, Vogt M, Hoerer J, Lange R, Schreiber C. Successful management of neonatal myocardial infarction with ECMO and intracoronary r-tPA lysis. *Congenit Heart Dis* 2014; 9(5): E169-174.
- 107 Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte

- during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010; 56(2): 130–140.
- 108 Bae J, Salamon RJ, Brandt EB, Paltzer WG, Zhang Z, Britt EC, Hacker TA, Fan J, Mahmoud AI. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation* 2021; 143(20): 1973–1986.
- 109 Ahuja P, Perriard E, Perriard JC, Ehler E. Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 15): 3295–3306.
- 110 Ogawa M, Geng FS, Humphreys DT, Kristianto E, Sheng DZ, Hui SP, Zhang Y, Sugimoto K, Nakayama M, Zheng D, Hesselson D, Hodson MP, Bogdanovic O, Kikuchi K. Kruppel-like factor 1 is a core cardiomyogenic trigger in zebrafish. *Science* 2021; 372(6538): 201–205.
- 111 Kubin T, Poling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, Wietelmann A, Tanaka M, Lorchner H, Schimanski S, Szibor M, Warnecke H, Braun T. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. *Cell Stem Cell* 2011; 9(5): 420–432.
- 112 Hatzistergos KE, Williams AR, Dykxhoorn D, Bellio MA, Yu W, Hare JM. Tumor suppressors RB1 and CDKN2a cooperatively regulate cell-cycle progression and differentiation during cardiomyocyte development and repair. *Circ Res* 2019; 124(8): 1184–1197.
- 113 Soonpaa MH, Koh GY, Pajak L, Jing S, Wang H, Franklin MT, Kim KK, Field LJ. Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice. *J Clin Invest* 1997; 99(11): 2644–2654.
- 114 Pasumarthi KB, Nakajima H, Nakajima HO, Soonpaa MH, Field LJ. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circ Res* 2005; 96(1): 110–118.
- 115 Woo YJ, Panlilio CM, Cheng RK, Liao GP, Atluri P, Hsu VM, Cohen JE, Chaudhry HW. Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure. *Circulation* 2006; 114(1 Suppl): I206–213.
- 116 Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, Kimura W, Koura AS, Thet S, Porrello ER, Sadek HA. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 2013; 497(7448): 249–253.
- 117 von Gise A, Lin Z, Schlegelmilch K, Honor LB, Pan GM, Buck JN, Ma Q, Ishiwata T, Zhou B, Camargo FD, Pu WT. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(7): 2394–2399.
- 118 Malek Mohammadi M, Kattih B, Grund A, Froese N, Korf-Klingebiel M, Gigina A, Schrameck U, Rudat C, Liang Q, Kispert A, Wollert KC, Bauersachs J, Heineke J. The transcription factor GATA4 promotes myocardial regeneration in neonatal mice. *EMBO Mol Med* 2017; 9(2): 265–279.
- 119 Xiang FL, Guo M, Yutzey KE. Overexpression of Tbx20 in adult cardiomyocytes promotes proliferation and improves cardiac function after myocardial infarction. *Circulation* 2016; 133(11): 1081–1092.

- 120 Song L, Yan W, Chen X, Deng CX, Wang Q, Jiao K. Myocardial smad4 is essential for cardiogenesis in mouse embryos. *Circ Res* 2007; 101(3): 277–285.
- 121 Bersell K, Arab S, Haring B, Kuhn B. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 2009; 138(2): 257–270.
- 122 D'Uva G, Aharonov A, Lauriola M, Kain D, Yahalom-Ronen Y, Carvalho S, Weisinger K, Bassat E, Rajchman D, Yifa O, Lysenko M, Konfino T, Hegesh J, Brenner O, Neeman M, Yarden Y, Leor J, Sarig R, Harvey RP, Tzahor E. ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nat Cell Biol* 2015; 17(5): 627–638.
- 123 Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cunado M, Zhao M, Maruyama S, Zhu W, Fajardo G, Noseda M, Nakamura K, Tian X, Liu Q, Wang A, Matsuura Y, Bushway P, Cai W, Savchenko A, Mahmoudi M, Schneider MD, van den Hoff MJ, Butte MJ, Yang PC, Walsh K, Zhou B, Bernstein D, Mercola M, Ruiz-Lozano P. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* 2015; 525(7570): 479–485.
- 124 Jiang FQ, Liu K, Chen JX, Cao Y, Chen WY, Zhao WL, Song GH, Liang CQ, Zhou YM, Huang HL, Huang RJ, Zhao H, Park KS, Ju Z, Cai D, Qi XF. Mettl3-mediated m<sup>6</sup>A modification of Fgf16 restricts cardiomyocyte proliferation during heart regeneration. *Elife* 2022; 11: e77014.
- 125 Li P, Cavallero S, Gu Y, Chen TH, Hughes J, Hassan AB, Bruning JC, Pashmforoush M, Sucov HM. IGF signaling directs ventricular cardiomyocyte proliferation during embryonic heart development. *Development* 2011; 138(9): 1795–1805.
- 126 Huang J, Elicker J, Bowens N, Liu X, Cheng L, Cappola TP, Zhu X, Parmacek MS. Myocardin regulates BMP10 expression and is required for heart development. *J Clin Invest* 2012; 122(10): 3678–3691.
- 127 Wu CC, Kruse F, Vasudevarao MD, Junker JP, Zebrowski DC, Fischer K, Noel ES, Grun D, Berezikov E, Engel FB, van Oudenaarden A, Weidinger G, Bakkers J. Spatially resolved genome-wide transcriptional profiling identifies BMP signaling as essential regulator of zebrafish cardiomyocyte regeneration. *Dev Cell* 2016; 36(1): 36–49.
- 128 Liu S, Li K, Wagner Florencio L, Tang L, Heallen TR, Leach JP, Wang Y, Grisanti F, Willerson JT, Perin EC, Zhang S, Martin JF. Gene therapy knockdown of Hippo signaling induces cardiomyocyte renewal in pigs after myocardial infarction. *Sci Transl Med* 2021; 13(600): eabd6892.
- 129 Aharonov A, Shakked A, Umansky KB, Savidor A, Genzelinakh A, Kain D, Lendengolts D, Revach OY, Morikawa Y, Dong J, Levin Y, Geiger B, Martin JF, Tzahor E. ERBB2 drives YAP activation and EMT-like processes during cardiac regeneration. *Nat Cell Biol* 2020; 22(11): 1346–1356.
- 130 Torrini C, Cubero RJ, Dirx E, Braga L, Ali H, Prosdocimo G, Gutierrez MI, Collesi C, Licastro D, Zentilin L, Mano M, Zacchigna S, Vendruscolo M, Marsili M, Samal A, Giacca M. Common regulatory pathways mediate activity of micrnas inducing cardiomyocyte proliferation. *Cell Rep* 2019; 27(9):

- 2759–2771.e5.
- 131 Li J, Gao E, Vite A, Yi R, Gomez L, Goossens S, van Roy F, Radice GL. Alpha-catenins control cardiomyocyte proliferation by regulating Yap activity. *Circ Res* 2015; 116(1): 70–79.
- 132 Sakabe M, Thompson M, Chen N, Verba M, Hassan A, Lu R, Xin M. Inhibition of beta1-AR/Galphas signaling promotes cardiomyocyte proliferation in juvenile mice through activation of RhoA-YAP axis. *Elife* 2022; 11.
- 133 Morikawa Y, Heallen T, Leach J, Xiao Y, Martin JF. Dystrophin-glycoprotein complex sequesters Yap to inhibit cardiomyocyte proliferation. *Nature* 2017; 547(7662): 227–231.
- 134 Fu WB, Wang WE, Zeng CY. Wnt signaling pathways in myocardial infarction and the therapeutic effects of Wnt pathway inhibitors. *Acta Pharmacol Sin* 2019; 40(1): 9–12.
- 135 Ye B, Hou N, Xiao L, Xu Y, Boyer J, Xu H, Li F. APC controls asymmetric Wnt/beta-catenin signaling and cardiomyocyte proliferation gradient in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 89(Pt B): 287–296.
- 136 Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, Martin JF. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 2011; 332(6028): 458–461.
- 137 Fan Y, Ho BX, Pang JKS, Pek NMQ, Hor JH, Ng SY, Soh BS. Wnt/beta-catenin-mediated signaling re-activates proliferation of matured cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1): 338.
- 138 Peng X, Lai KS, She P, Kang J, Wang T, Li G, Zhou Y, Sun J, Jin D, Xu X, Liao L, Liu J, Lee E, Poss KD, Zhong TP. Induction of Wnt signaling antagonists and p21-activated kinase enhances cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration. *J Mol Cell Biol* 2021; 13(1): 41–58.
- 139 Yang D, Fu W, Li L, Xia X, Liao Q, Yue R, Chen H, Chen X, An S, Zeng C, Wang WE. Therapeutic effect of a novel Wnt pathway inhibitor on cardiac regeneration after myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)* 2017; 131(24): 2919–2932.
- 140 Li D, Sun J, Zhong TP. Wnt signaling in heart development and regeneration. *Curr Cardiol Rep* 2022; 24(10): 1425–1438.
- 141 Wu Y, Zhou L, Liu H, Duan R, Zhou H, Zhang F, He X, Lu D, Xiong K, Xiong M, Zhuang J, Liu Y, Li L, Liang D, Chen YH. LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Cell Res* 2021; 31(4): 450–462.
- 142 Peng X, Fan S, Tan J, Zeng Z, Su M, Zhang Y, Yang M, Xia L, Fan X, Cai W, Tang WH. Wnt2bb induces cardiomyocyte proliferation in zebrafish hearts via the jnk1/c-jun/creb1 pathway. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 323.
- 143 Felician G, Collesi C, Lusic M, Martinelli V, Ferro MD, Zentilin L, Zacchigna S, Giacca M. Epigenetic modification at Notch responsive promoters blunts efficacy of inducing notch pathway reactivation after myocardial infarction. *Circ Res* 2014; 115(7): 636–649.
- 144 Yue Z, Chen J, Lian H, Pei J, Li Y, Chen X, Song S, Xia J, Zhou B, Feng J,

- Zhang X, Hu S, Nie Y. PDGFR-beta signaling regulates cardiomyocyte proliferation and myocardial regeneration. *Cell Rep* 2019; 28(4): 966–978.e4.
- 145 Chakraborty S, Sengupta A, Yutzey KE. Tbx20 promotes cardiomyocyte proliferation and persistence of fetal characteristics in adult mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2013; 62: 203–213.
- 146 Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-Anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, Huang J, Mirotsov M, Dzau VJ. C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway. *Circ Res* 2013; 113(4): 372–380.
- 147 Wang F, Liu S, Pei J, Cai L, Liu N, Liang T, Dong X, Cong X, Chun J, Chen J, Hu S, Chen X. LPA(3)-mediated lysophosphatidic acid signaling promotes postnatal heart regeneration in mice. *Theranostics* 2020; 10(24): 10892–10907.
- 148 Chen Y, Li X, Li B, Wang H, Li M, Huang S, Sun Y, Chen G, Si X, Huang C, Liao W, Liao Y, Bin J. Long non-coding RNA ECRAR triggers post-natal myocardial regeneration by activating ERK1/2 Signaling. *Mol Ther* 2019; 27(1): 29–45.
- 149 Vagnozzi RJ, Maillet M, Sargent MA, Khalil H, Johansen AKZ, Schwanekamp JA, York AJ, Huang V, Nahrendorf M, Sadayappan S, Molkenin JD. An acute immune response underlies the benefit of cardiac stem cell therapy. *Nature* 2020; 577(7790): 405–409.
- 150 Wang J, Chen X, Shen D, Ge D, Chen J, Pei J, Li Y, Yue Z, Feng J, Chu M, Nie Y. A long noncoding RNA NR\_045363 controls cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol* 2019; 127: 105–114.
- 151 Wei G, Li C, Jia X, Xie J, Tang Z, Jin M, Chen Q, Sun Y, He S, Li X, Chen Y, Zheng H, Liao W, Liao Y, Bin J, Huang S. Extracellular vesicle-derived CircWhsc1 promotes cardiomyocyte proliferation and heart repair by activating TRIM59/STAT3/Cyclin B2 pathway. *J Adv Res* 2022; 10.1016/j.jare.2022.12.014.
- 152 Sdek P, Zhao P, Wang Y, Huang CJ, Ko CY, Butler PC, Weiss JN, MacLellan WR. Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes. *J Cell Biol* 2011; 194(3): 407–423.
- 153 Lan C, Chen C, Qu S, Cao N, Luo H, Yu C, Wang N, Xue Y, Xia X, Fan C, Ren H, Yang Y, Jose PA, Xu Z, Wu G, Zeng C. Inhibition of DYRK1A, via histone modification, promotes cardiomyocyte cell cycle activation and cardiac repair after myocardial infarction. *EBioMedicine* 2022; 82: 104139.
- 154 El-Nachef D, Oyama K, Wu YY, Freeman M, Zhang Y, MacLellan WR. Repressive histone methylation regulates cardiac myocyte cell cycle exit. *J Mol Cell Cardiol* 2018; 121: 1–12.
- 155 Ai S, Yu X, Li Y, Peng Y, Li C, Yue Y, Tao G, Li C, Pu WT, He A. Divergent requirements for EZH1 in heart development versus regeneration. *Circ Res* 2017; 121(2): 106–112.
- 156 Ben-Yair R, Butty VL, Busby M, Qiu Y, Levine SS, Goren A, Boyer LA, Burns CG, Burns CE. H3K27me3-mediated silencing of structural genes is required for zebrafish heart regeneration. *Development* 2019; 146(19): dev178632.

- 157 Chamberlain AA, Lin M, Lister RL, Maslov AA, Wang Y, Suzuki M, Wu B, Greally JM, Zheng D, Zhou B. DNA methylation is developmentally regulated for genes essential for cardiogenesis. *J Am Heart Assoc* 2014; 3(3): e000976.
- 158 Ponnusamy M, Liu F, Zhang YH, Li RB, Zhai M, Liu F, Zhou LY, Liu CY, Yan KW, Dong YH, Wang M, Qian LL, Shan C, Xu S, Wang Q, Zhang YH, Li PF, Zhang J, Wang K. Long noncoding RNA CPR (Cardiomyocyte Proliferation Regulator) regulates cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Circulation* 2019; 139(23): 2668–2684.
- 159 Gilsbach R, Preissl S, Gruning BA, Schnick T, Burger L, Benes V, Wurch A, Bonisch U, Gunther S, Backofen R, Fleischmann BK, Schubeler D, Hein L. Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease. *Nat Commun* 2014; 5: 5288.
- 160 Han Z, Wang X, Xu Z, Cao Y, Gong R, Yu Y, Yu Y, Guo X, Liu S, Yu M, Ma W, Zhao Y, Xu J, Li X, Li S, Xu Y, Song R, Xu B, Yang F, Bamba D, Sukhareva N, Lei H, Gao M, Zhang W, Zagidullin N, Zhang Y, Yang B, Pan Z, Cai B. ALKBH5 regulates cardiomyocyte proliferation and heart regeneration by demethylating the mRNA of YTHDF1. *Theranostics* 2021; 11(6): 3000–3016.
- 161 Wang L, Wang J, Yu P, Feng J, Xu GE, Zhao X, Wang T, Lehmann HI, Li G, Sluijter JPG, Xiao J. METTL14 is required for exercise-induced cardiac hypertrophy and protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Nat Commun* 2022; 13(1): 6762.
- 162 Gong R, Wang X, Li H, Liu S, Jiang Z, Zhao Y, Yu Y, Han Z, Yu Y, Dong C, Li S, Xu B, Zhang W, Wang N, Li X, Gao X, Yang F, Bamba D, Ma W, Liu Y, Cai B. Loss of m<sup>6</sup>A methyltransferase METTL3 promotes heart regeneration and repair after myocardial injury. *Pharmacol Res* 2021; 174: 105845.
- 163 Qian B, Wang P, Zhang D, Wu L. m<sup>6</sup>A modification promotes miR-133a repression during cardiac development and hypertrophy via IGF2BP2. *Cell Death Discov* 2021; 7(1): 157.
- 164 Wang T, Zhou LY, Li XM, Liu F, Liang L, Chen XZ, Ju J, Ponnusamy M, Wang K, Liu CY, Yan KW, Wang K. ABRO1 arrests cardiomyocyte proliferation and myocardial repair by suppressing PSPH. *Mol Ther* 2023; 31(3): 847–865.
- 165 Shen S, Liu K, Li S, Rampes S, Yang Y, Huang Y, Tang J, Xia Z, Ma D, Zhang L. N<sup>6</sup>-methyladenosine modulates long non-coding RNA in the developing mouse heart. *Cell Death Discov* 2022; 8(1): 329.
- 166 Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zacchigna S, Giacca M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 2012; 492(7429): 376–381.
- 167 Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, Carlucci L, Zentilin L, Secco I, Ali H, Braga L, Gorgodze N, Bernini F, Burchielli S, Collesi C, Zandona L, Sinagra G, Piacenti M, Zacchigna S, Bussani R, Recchia FA, Giacca M. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature* 2019; 569(7756): 418–422.
- 168 Braga L, Ali H, Secco I, Giacca M. Non-coding RNA therapeutics for cardiac regeneration. *Cardiovasc Res* 2021; 117(3): 674–693.

- 169 Cai B, Ma W, Ding F, Zhang L, Huang Q, Wang X, Hua B, Xu J, Li J, Bi C, Guo S, Yang F, Han Z, Li Y, Yan G, Yu Y, Bao Z, Yu M, Li F, Tian Y, Pan Z, Yang B. The long noncoding RNA CAREL controls cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol* 2018; 72(5): 534–550.
- 170 Chen G, Li H, Li X, Li B, Zhong L, Huang S, Zheng H, Li M, Jin G, Liao W, Liao Y, Chen Y, Bin J. Loss of long non-coding RNA CRRL promotes cardiomyocyte regeneration and improves cardiac repair by functioning as a competing endogenous RNA. *J Mol Cell Cardiol* 2018; 122: 152–164.
- 171 Li X, He X, Wang H, Li M, Huang S, Chen G, Jing Y, Wang S, Chen Y, Liao W, Liao Y, Bin J. Loss of AZIN2 splice variant facilitates endogenous cardiac regeneration. *Cardiovasc Res* 2018; 114(12): 1642–1655.
- 172 Li B, Hu Y, Li X, Jin G, Chen X, Chen G, Chen Y, Huang S, Liao W, Liao Y, Teng Z, Bin J. Sirt1 antisense long noncoding rna promotes cardiomyocyte proliferation by enhancing the stability of Sirt1. *J Am Heart Assoc* 2018; 7(21): e009700.
- 173 Rigaud VOC, Hoy RC, Kurian J, Zarka C, Behanan M, Brosious I, Pennise J, Patel T, Wang T, Johnson J, Kraus LM, Mohsin S, Houser SR, Khan M. RNA-binding protein LIN28a regulates new myocyte formation in the heart through long noncoding RNA-H19. *Circulation* 2023; 147(4): 324–337.
- 174 Huang S, Li X, Zheng H, Si X, Li B, Wei G, Li C, Chen Y, Chen Y, Liao W, Liao Y, Bin J. Loss of super-enhancer-regulated circRNA Nfix induces cardiac regeneration after myocardial infarction in adult mice. *Circulation* 2019; 139(25): 2857–2876.
- 175 Ma W, Wang X, Sun H, Xu B, Song R, Tian Y, Zhao L, Xu Y, Zhao Y, Yang F, Chen H, Gong R, Yu Y, Li X, Li S, Zhang W, Zhang T, Ne J, Cai B. Oxidant stress-sensitive circRNA Mdc1 controls cardiomyocyte chromosome stability and cell cycle re-entry during heart regeneration. *Pharmacol Res* 2022; 184: 106422.
- 176 Gu Y, Zhou Y, Ju S, Liu X, Zhang Z, Guo J, Gao J, Zang J, Sun H, Chen Q, Wang J, Xu J, Xu Y, Chen Y, Guo Y, Dai J, Ma H, Wang C, Jin G, Li C, Xia Y, Shen H, Yang Y, Guo X, Hu Z. Multi-omics profiling visualizes dynamics of cardiac development and functions. *Cell Rep* 2022; 41(13): 111891.
- 177 Lin Z, Zhou P, von Gise A, Gu F, Ma Q, Chen J, Guo H, van Gorp PR, Wang DZ, Pu WT. Pi3kcb links Hippo-YAP and PI3K-AKT signaling pathways to promote cardiomyocyte proliferation and survival. *Circ Res* 2015; 116(1): 35–45.
- 178 Woulfe KC, Gao E, Lal H, Harris D, Fan Q, Vagnozzi R, DeCaul M, Shang X, Patel S, Woodgett JR, Force T, Zhou J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates post-myocardial infarction remodeling and stress-induced cardiomyocyte proliferation *in vivo*. *Circ Res* 2010; 106(10): 1635–1645.
- 179 Fan Y, Cheng Y, Li Y, Chen B, Wang Z, Wei T, Zhang H, Guo Y, Wang Q, Wei Y, Chen F, Sha J, Guo X, Wang L. Phosphoproteomic analysis of neonatal regenerative myocardium revealed important roles of checkpoint kinase 1 via activating mammalian target of rapamycin C1/Ribosomal protein S6 kinase b-1

- pathway. *Circulation* 2020; 141(19): 1554–1569.
- 180 Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 2005; 19(10): 1175–1187.
- 181 Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, Jia C, Kee HJ, Li L, Hannenhalli S, Epstein JA. Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Dev Cell* 2010; 19(3): 450–459.
- 182 Lin Z, Guo H, Cao Y, Zohrabian S, Zhou P, Ma Q, VanDusen N, Guo Y, Zhang J, Stevens SM, Liang F, Quan Q, van Gorp PR, Li A, Dos Remedios C, He A, Bezzerides VJ, Pu WT. Acetylation of VGLL4 regulates hippo-yap signaling and postnatal cardiac growth. *Dev Cell* 2016; 39(4): 466–479.
- 183 Collesi C, Felician G, Secco I, Gutierrez MI, Martelletti E, Ali H, Zentilin L, Myers MP, Giacca M. Reversible Notch1 acetylation tunes proliferative signalling in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2018; 114(1): 103–122.
- 184 Li B, Li M, Li X, Li H, Lai Y, Huang S, He X, Si X, Zheng H, Liao W, Liao Y, Bin J. Sirt1-inducible deacetylation of p21 promotes cardiomyocyte proliferation. *Aging (Albany NY)* 2019; 11(24): 12546–12567.
- 185 Tamamori-Adachi M, Hayashida K, Nobori K, Omizu C, Yamada K, Sakamoto N, Kamura T, Fukuda K, Ogawa S, Nakayama KI, Kitajima S. Down-regulation of p27Kip1 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4. Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279(48): 50429–50436.
- 186 Zou J, Ma W, Li J, Littlejohn R, Zhou H, Kim IM, Fulton DJR, Chen W, Weintraub NL, Zhou J, Su H. Neddylation mediates ventricular chamber maturation through repression of Hippo signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(17): E4101–E4110.
- 187 Du J, Zheng L, Gao P, Yang H, Yang WJ, Guo F, Liang R, Feng M, Wang Z, Zhang Z, Bai L, Bu Y, Xing S, Zheng W, Wang X, Quan L, Hu X, Wu H, Chen Z, Chen L, Wei K, Zhang Z, Zhu X, Zhang X, Tu Q, Zhao SM, Lei X, Xiong JW. A small-molecule cocktail promotes mammalian cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2022; 29(4): 545–558 e513.
- 188 Contessotto P, Ellis BW, Jin C, Karlsson NG, Zorlutuna P, Kilcoyne M, Pandit A. Distinct glycosylation in membrane proteins within neonatal versus adult myocardial tissue. *Matrix Biol* 2020; 85–86: 173–188.
- 189 Zhang J, Bolli R, Garry DJ, Marban E, Menasche P, Zimmermann WH, Kamp TJ, Wu JC, Dzau VJ. Basic and translational research in cardiac repair and regeneration: JACC state-of-the-art review. *J Am Coll Cardiol* 2021; 78(21): 2092–2105.
- 190 Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell* 2011; 8(4): 389–398.
- 191 Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Verma SK, Krishnamurthy P, Mackie AR, Vaughan E, Garikipati VN, Benedict C, Ramirez V, Lambers E, Ito

- A, Gao E, Misener S, Luongo T, Elrod J, Qin G, Houser SR, Koch WJ, Kishore R. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res* 2015; 117(1): 52–64.
- 192 Burridge PW, Keller G, Gold JD, Wu JC. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell* 2012; 10(1): 16–28.
- 193 Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, Mahoney WM, Van Biber B, Cook SM, Palpant NJ, Gantz JA, Fugate JA, Muskheli V, Gough GM, Vogel KW, Astley CA, Hotchkiss CE, Baldessari A, Pabon L, Reinecke H, Gill EA, Nelson V, Kiem HP, Laflamme MA, Murry CE. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014; 510(7504): 273–277.
- 194 Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 2007; 21(7): 1345–1357.
- 195 Gao L, Gregorich ZR, Zhu W, Mattapally S, Oduk Y, Lou X, Kannappan R, Borovjagin AV, Walcott GP, Pollard AE, Fast VG, Hu X, Lloyd SG, Ge Y, Zhang J. Large cardiac muscle patches engineered from human induced-pluripotent stem cell-derived cardiac cells improve recovery from myocardial infarction in swine. *Circulation* 2018; 137(16): 1712–1730.
- 196 Zhang D, Shadrin IY, Lam J, Xian HQ, Snodgrass HR, Bursac N. Tissue-engineered cardiac patch for advanced functional maturation of human ESC-derived cardiomyocytes. *Biomaterials* 2013; 34(23): 5813–5820.
- 197 Kawamura T, Ito Y, Ito E, Takeda M, Mikami T, Taguchi T, Mochizuki-Oda N, Sasai M, Shimamoto T, Nitta Y, Yoshioka D, Kawamura M, Kawamura A, Misumi Y, Sakata Y, Sawa Y, Miyagawa S. Safety confirmation of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte patch transplantation for ischemic cardiomyopathy: first three case reports. *Front Cardiovasc Med* 2023; 10: 1182209.
- 198 Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, Jiang D, von Gise A, Ikeda S, Chien KR, Pu WT. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008; 454(7200): 109–113.
- 199 Zhou B, Honor LB, He H, Ma Q, Oh JH, Butterfield C, Lin RZ, Melero-Martin JM, Dolmatova E, Duffy HS, Gise A, Zhou P, Hu YW, Wang G, Zhang B, Wang L, Hall JL, Moses MA, McGowan FX, Pu WT. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest* 2011; 121(5): 1894–1904.
- 200 Luo XL, Jiang Y, Li Q, Yu XJ, Ma T, Cao H, Ke MX, Zhang P, Tan JL, Gong YS, Wang L, Gao L, Yang HT. hESC-derived epicardial cells promote repair of infarcted hearts in mouse and swine. *Adv Sci (Weinh)* 2023; 10(27): e2300470.
- 201 Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, de Couto G, Middleton R, Tseliou E,

- Luthringer D, Kreke M, Smith RR, Marban L, Ghaleh B, Marban E. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J* 2017; 38(3): 201–211.
- 202 Jiang Y, Zhang LL, Zhang F, Bi W, Zhang P, Yu XJ, Rao SL, Wang SH, Li Q, Ding C, Jin Y, Liu ZM, Yang HT. Dual human iPSC-derived cardiac lineage cell-seeding extracellular matrix patches promote regeneration and long-term repair of infarcted hearts. *Bioact Mater* 2023; 28: 206–226.
- 203 Yan R, Cigliola V, Oonk KA, Petrover Z, DeLuca S, Wolfson DW, Vekstein A, Mendiola MA, Devlin G, Bishawi M, Gemberling MP, Sinha T, Sargent MA, York AJ, Shakked A, DeBenedittis P, Wendell DC, Ou J, Kang J, Goldman JA, Baht GS, Karra R, Williams AR, Bowles DE, Asokan A, Tzahor E, Gersbach CA, Molkentin JD, Bursac N, Black BL, Poss KD. An enhancer-based gene-therapy strategy for spatiotemporal control of cargoes during tissue repair. *Cell Stem Cell* 2023; 30(1): 96–111 e116.
- 204 Zhang NN, Li XF, Deng YQ, Zhao H, Huang YJ, Yang G, Huang WJ, Gao P, Zhou C, Zhang RR, Guo Y, Sun SH, Fan H, Zu SL, Chen Q, He Q, Cao TS, Huang XY, Qiu HY, Nie JH, Jiang Y, Yan HY, Ye Q, Zhong X, Xue XL, Zha ZY, Zhou D, Yang X, Wang YC, Ying B, Qin CF. A thermostable mRNA vaccine against COVID-19. *Cell* 2020; 182(5): 1271–1283.e6.
- 205 Rurik JG, Tombacz I, Yadegari A, Mendez Fernandez PO, Shewale SV, Li L, Kimura T, Soliman OY, Papp TE, Tam YK, Mui BL, Albelda SM, Pure E, June CH, Aghajanian H, Weissman D, Parhiz H, Epstein JA. CAR T cells produced *in vivo* to treat cardiac injury. *Science* 2022; 375(6576): 91–96.
- 206 Lamb YN. Inclisiran: First Approval. *Drugs* 2021; 81(3): 389–395.
- 207 Zhou B, Shi X, Tang X, Zhao Q, Wang L, Yao F, Hou Y, Wang X, Feng W, Wang L, Sun X, Wang L, Hu S. Functional isolation, culture and cryopreservation of adult human primary cardiomyocytes. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7(1): 254.
- 208 Velayutham N, Alfieri CM, Agnew EJ, Riggs KW, Baker RS, Ponny SR, Zafar F, Yutzey KE. Cardiomyocyte cell cycling, maturation, and growth by multinucleation in postnatal swine. *J Mol Cell Cardiol* 2020; 146: 95–108.
- 209 Shapiro SD, Ranjan AK, Kawase Y, Cheng RK, Kara RJ, Bhattacharya R, Guzman-Martinez G, Sanz J, Garcia MJ, Chaudhry HW. Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction through cytokinesis of adult cardiomyocytes. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra227.
- 210 Zhao M, Nakada Y, Wei Y, Bian W, Chu Y, Borovjagin AV, Xie M, Zhu W, Nguyen T, Zhou Y, Serpooshan V, Walcott GP, Zhang J. Cyclin D2 overexpression enhances the efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for myocardial repair in a swine model of myocardial infarction. *Circulation* 2021; 144(3): 210–228.
- 211 Suzuki G, Lee TC, Fallavollita JA, Canty JM Jr. Adenoviral gene transfer of FGF-5 to hibernating myocardium improves function and stimulates myocytes to hypertrophy and reenter the cell cycle. *Circ Res* 2005; 96(7): 767–775.

- 212 Mathiyalagan P, Adamiak M, Mayourian J, Sssi Y, Liang Y, Agarwal N, Jha D, Zhang S, Kohlbrenner E, Chepurko E, Chen J, Trivieri MG, Singh R, Bouchareb R, Fish K, Ishikawa K, Lebeche D, Hajjar RJ, Sahoo S. FTO-dependent N<sup>6</sup>-methyladenosine regulates cardiac function during remodeling and repair. *Circulation* 2019; 139(4): 518–532.
- 213 Abouleisa RRE, Salama ABM, Ou Q, Tang XL, Solanki M, Guo Y, Nong Y, McNally L, Lorkiewicz PK, Kassem KM, Ahern BM, Choudhary K, Thomas R, Huang Y, Juhardeen HR, Siddique A, Ifthikar Z, Hammad SK, Elbaz AS, Ivey KN, Conklin DJ, Satin J, Hill BG, Srivastava D, Bolli R, Mohamed TMA. Transient cell cycle induction in cardiomyocytes to treat subacute ischemic heart failure. *Circulation* 2022; 145(17): 1339–1355.
- 214 Chattergoon NN, Louey S, Scanlan T, Lindgren I, Giraud GD, Thornburg KL. Thyroid hormone receptor function in maturing ovine cardiomyocytes. *J Physiol* 2019; 597(8): 2163–2176.