



朱小君, 北京大学分子医学研究所副研究员、博士研究生导师。主要研究斑马鱼心脏发育与再生的细胞及分子机制, 发现Brg1等分子参与斑马鱼的心脏再生过程。

<http://www.imm.pku.edu.cn/kytd/rcdw/24153.htm>

心肌细胞增殖与再生的研究进展

庞美俊 朱小君* 熊敬维

(北京大学分子医学研究所代谢及心血管分子医学北京市重点实验室,
天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100871)

摘要 由心肌梗死引起的缺血性心肌病已成为威胁人类健康的重大疾病。与成年哺乳动物不同, 一些鱼类、两栖类和新生的哺乳动物的心肌细胞在心脏损伤后具有增殖能力, 可以实现心脏的完美再生, 为基于心肌细胞增殖的心脏再生与修复提供了新技术和新思路。该文简单概述心脏再生动物模型的建立、心肌再生修复的细胞生物学过程以及近年来发现的调控心肌细胞增殖的关键因子, 并且总结了未来心肌细胞增殖及心脏再生领域的研究方向, 为心脏再生医学的基础理论和临床转化研究提供创新的思路。

关键词 心脏再生; 心肌细胞增殖; 细胞周期; 信号通路; 模式动物

Recent Advances on Cardiac Proliferation and Regeneration in Model Organisms

PANG Meijun, ZHU Xiaojun*, XIONG Jingwei

(Beijing Key Laboratory of Cardiometabolic Molecular Medicine, Institute of Molecular Medicine and State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Ischemic cardiomyopathy post myocardial infarction has become a major threat to human health. Unlike adult mammals, some fish, amphibians and newborn mammals can achieve perfect regeneration after cardiac injury due to their capacity of cardiomyocyte proliferation. Thus promoting cardiomyocyte proliferation has become a promising therapeutic strategy for ischemic cardiomyopathy. Here, we present a brief review on cardiac regeneration models in animals, and the key cellular and molecular mechanisms on cardiomyocyte proliferation and regeneration. Finally, we summarize and speculate future research directions to provide concise literature reference for both basic and clinical research scientists in the field of cardiac regenerative medicine.

Keywords cardiac regeneration; cardiomyocyte proliferation; cell cycle; signaling pathway; model organisms

国家自然科学基金(批准号: 31430059、81870198)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62755291, E-mail: zhuxiaojun@pku.edu.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31430059, 81870198)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62755291, E-mail: zhuxiaojun@pku.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-29 11:54:14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190929.1153.004.html>

当前心血管疾病已经成为人类健康的头号杀手。每年美国有四分之一的死亡归因于心血管疾病,这一统计数据相比欧洲国家几乎翻了一倍,与心血管疾病相关的死亡人数相比亚洲国家也逐年增加。这种日益严重的趋势造成了全球严重的经济和社会负担^[1]。心力衰竭是由多种心血管疾病引起的心脏功能下降,最终导致心肌局部坏死和不可逆转的纤维化。心肌细胞的丢失是导致心力衰竭的主要原因。人体左心室有2亿~4亿个心肌细胞,心肌梗死后几小时内多达25%的心肌因持久性缺血而发生局部的心肌坏死^[2]。哺乳动物心肌梗死后坏死区域会被无功能的胶原瘢痕组织取代,继而引发心室重塑和肥大,非梗死区心肌细胞功能恶化与代谢紊乱,最终导致心力衰竭^[3]。尽管常规治疗方法如药物、介入溶栓、冠状动脉搭桥、球囊扩张等治疗手段可以在一定程度上缓解症状,但并不能替代在发病期间丢失的心肌细胞,因此死亡心肌细胞的更新和替代正在成为再生医学研究的主要目标。

1 心脏再生的模型

哺乳动物成年后心脏再生能力极低,而低等脊椎动物(斑马鱼和部分硬骨鱼类、全部两栖类)具有强大的心脏再生能力。对比分析不同再生能力的动物之间心脏损伤后再生修复过程的分子和细胞机制可以帮助开发相应的治疗策略,限制瘢痕形成,增强心脏损伤后心肌细胞再生。

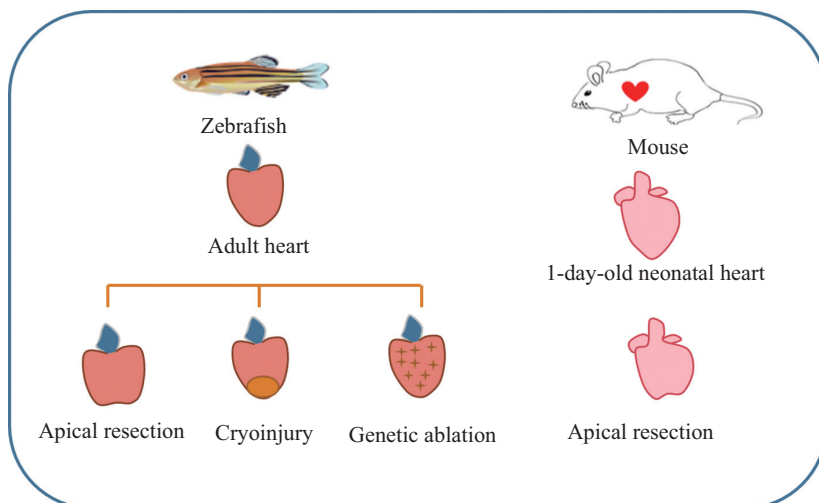
斑马鱼的生长发育速度快、繁殖力强、转基因技术成熟高效等优点,使其成为低等脊椎动物中研究心脏再生的主要模型^[4]。2002年, Poss等^[5]利用手术切除成年斑马鱼20%的心脏,几秒后伤口处形成血块,2~4天血块开始逐渐被胶原纤维取代,并在7~9天达到最高水平,形成富含基质的瘢痕。与哺乳动物心肌细胞丢失后形成不可逆转性纤维化瘢痕不同,斑马鱼在手术后第9~30天新生的心肌细胞开始逐渐包围胶原纤维疤痕,手术后30天胶原纤维基本消失,新生的心肌细胞最终取代血凝块形成了连续的肌肉组织,手术后60天斑马鱼心脏实现完全再生。通过溴脱氧尿苷(BrdU)掺入评估斑马鱼心肌细胞增殖,标记7天后发现假手术组的心脏中约7%的致密层心肌细胞核有BrdU掺入,肌小梁层心肌细胞无掺入。相反,在手术组的心脏中,损伤区域附近约17%的致密层和肌小梁层心肌细胞表达BrdU,14天达到

的峰值,32%的心肌细胞核具有BrdU的掺入^[5],说明斑马鱼心脏损伤后心肌细胞的增殖明显增加。研究斑马鱼心脏再生的细胞和分子机制,将为心脏修复和再生医学提供新的治疗靶标^[6]。

手术切除部分心脏的再生模型与哺乳动物心肌梗后引起心室壁细胞大量死亡并迅速引起炎症反应有一定区别,随后又建立了斑马鱼心脏冷冻损伤模型模拟哺乳动物心梗。用液氮或干冰预冷的探头直接接触斑马鱼心尖,24小时后可以导致20%~30%的心肌细胞死亡,这与哺乳动物缺血损伤后损伤区域大量细胞死亡类似;第4天开始受损心肌被非心肌组织包围,初步检测到心肌细胞的增殖;第7天出现明显的瘢痕结构、成纤维细胞和胶原沉积,同时心肌细胞的增殖明显增加;在随后的两个月内,纤维化瘢痕组织细胞逐渐凋亡消除,最终被新生的心肌取代(图1)^[7]。斑马鱼心脏冷冻损伤模型与哺乳动物心肌梗死模型更相似,为利用低等脊椎动物研究哺乳动物心肌梗死后的修复与再生提供了另一种选择。

手术切除心脏再生模型与心脏冷冻损伤再生模型均通过外力损伤部分细胞(包括心肌细胞和非心肌细胞)研究心脏的再生。为研究特异性杀死心肌细胞后心肌细胞再生的机制与机械损伤后是否相同,已在斑马鱼中建立了一种遗传细胞杀伤模型,通过Cre-LoxP系统特异性在心肌细胞中表达白喉毒素杀死心肌细胞,发现特异性破坏60%的心室心肌细胞后,心脏表现出心力衰竭的症状,大量心肌损失激活了心内膜、心外膜、血管细胞和免疫细胞的强烈细胞和分子反应,接下来几天心肌细胞迅速增殖并完成再生(图1)^[8]。斑马鱼心肌细胞杀伤后再生模型操作方便、无侵入损伤,且可以特异性诱导大量心肌细胞的死亡,是斑马鱼心脏再生模型的重要补充。

与斑马鱼相似,1日龄新生小鼠在心脏损伤后也可以完全再生。1日龄小鼠心脏在左心室尖端切除15%后,损伤区域出现血凝块和强烈的炎症反应,接着损伤区域心肌细胞增殖显著上升,血凝块逐渐被新生的心肌细胞取代,损伤21天后切除的部分完全被新生的心肌取代,同时观察到很多新生血管。手术后2个月超声心动图显示,再生心室具有正常的收缩功能。然而对7日龄的小鼠进行心脏尖端切除手术,损伤区域无再生心肌,并发生不可逆转性纤维化,心脏失去再生能力(图1)^[9]。那么,是什么阻止了出生后7天小鼠等哺乳动物的心肌细胞的增殖进而



模型: 斑马鱼心脏再生模型(手术切除、心脏冷冻损伤及遗传细胞消融后再生)、小鼠乳鼠心脏再生模型(手术切除后再生)。

Models: zebrafish (apical resection, cryoinjury model, genetic cell ablation model) and mouse (neonatal apical resection) heart regeneration model.

图1 心脏再生动物模型

Fig.1 The heart regeneration models

影响再生呢? 解析心肌细胞增殖的调控机制, 发现调控心脏再生的开关是心脏再生研究的主要目标。

2 新生心肌细胞的来源

无论是斑马鱼还是新生乳鼠心脏再生, 损伤区域均伴随着疤痕组织纤维块被新生的心肌细胞取代的过程, 损伤后新生心肌细胞的来源是研究者关心的问题之一。一般认为, 新生的心肌细胞有两种可能来源: 一种来源于心脏中干细胞或者前体细胞的分化; 另一种是原有的心肌细胞去分化后重新进入细胞周期进行分裂。

在低等动物(如斑马鱼和蝾螈)中, 心肌细胞可以进行去分化和增殖产生新的心肌细胞, 从而帮助这些低等动物完成心脏再生修复。Belmonte课题组^[10]利用谱系追踪的遗传学手段, 发现在斑马鱼心脏再生过程中新生的心肌细胞来源于已有心肌细胞的增殖, 并且这些增殖的心肌细胞表现出了肌节解体等去分化表型, 同时这些细胞内细胞周期相关基因表达上调, 说明原有的心肌细胞去分化、进入细胞周期增殖, 并进一步分化形成新的心肌细胞。Poss课题组^[11]也用类似的研究手段证明斑马鱼新生的心肌细胞来源于已有心肌细胞的去分化和增殖。与斑马鱼相似, 蝾螈心脏也可以完成再生过程, 而原有心肌细胞的增殖在这个过程中也发挥了重要作用。体外培养分离的蝾螈心肌细胞全部可以进入细胞周期S期, 并且有三分之一的细胞可以完成有丝分

裂过程, 说明蝾螈心肌细胞也保持能够继续增殖的能力^[12]。此外, 新生哺乳动物的心肌细胞也有同样的增殖能力, 新生1天的小鼠心脏可以再生。谱系追踪的结果显示, 新产生的心肌细胞来源于原有细胞的去分化和增殖^[9]。离体培养的成年小鼠心肌细胞会发生去分化现象, 而这种现象源于心肌细胞表观基因组的重编程过程, 表现为心脏结构和功能相关基因下调以及进入细胞周期和细胞增殖相关基因上调^[13]。

尽管成年哺乳动物心脏不再具有再生能力, 研究人员发现在成年哺乳动物心脏中, 仍有极少数的心肌细胞可以增殖。利用谱系追踪技术结合多同位素成像质谱技术, 发现尽管大多数小鼠的心肌细胞在成熟和损伤修复过程中表现为多倍体或多核化, 仍有极少数心肌细胞可以增殖产生新的心肌细胞, 10周以上幼年小鼠每年新生心肌细胞比例为0.76%^[14]。人类心脏中的心肌细胞同样具有自我更新能力。通过计算冷战期间核弹测试产生的¹⁴C结合DNA在细胞中的比例发现, 25岁成年人的心肌细胞以每年不到1%的速度更新, 并且随着年龄的增长, 心肌细胞的更新和增殖能力下降, 到75岁时, 心肌细胞的更新速率降低到0.45%。按照这种速率计算, 有约45%的心肌细胞是在出生后才形成的^[15-16]。在1岁婴儿心脏中, 有0.040% pH3阳性的增殖心肌细胞, 暗示此时的心脏可能具有再生能力。而到20岁时, 该比例降低为0.009%。在此期间, 心脏中心肌细胞数

目增加了3.4倍, 这些增加的心肌细胞被推测主要来自于心肌细胞增殖^[17]。尽管成年哺乳动物心肌细胞具有极其有限的增殖能力, 但也暗示可能存在某种策略可以刺激心肌细胞重新进入细胞周期并促进心脏再生。

除了来源于已有心肌细胞的增殖, 心肌细胞也可能来源于其他类型细胞(如心脏前体细胞)的分化。一些研究显示, 在心脏中存在一些内源性有干细胞特征的细胞群, 这些细胞可能分化为心肌细胞, 发挥内源性的再生能力^[18]。在新生小鼠心脏中的一些细胞表达c-Kit等干细胞表面蛋白并具有能够形成克隆等干细胞特有表型, 这些细胞在静息状态下位于心房和心室尖端, 在损伤后进行细胞分裂并迁移至损伤部位^[19-20]。如果在心脏组织中去除这些干细胞和它们的后代细胞, 心脏再生和功能修复过程将无法进行^[21]。除了c-Kit外, 一些其他的标记蛋白如Islet1、Scal和ABCG1都可以标记一类具有干细胞表型的心脏前体细胞^[22-24]。然而在这些不同的研究中, 由于被标记的细胞群体存在重叠, 因此很难对这些数据进行综合性的整合分析。此外, TBX18阳

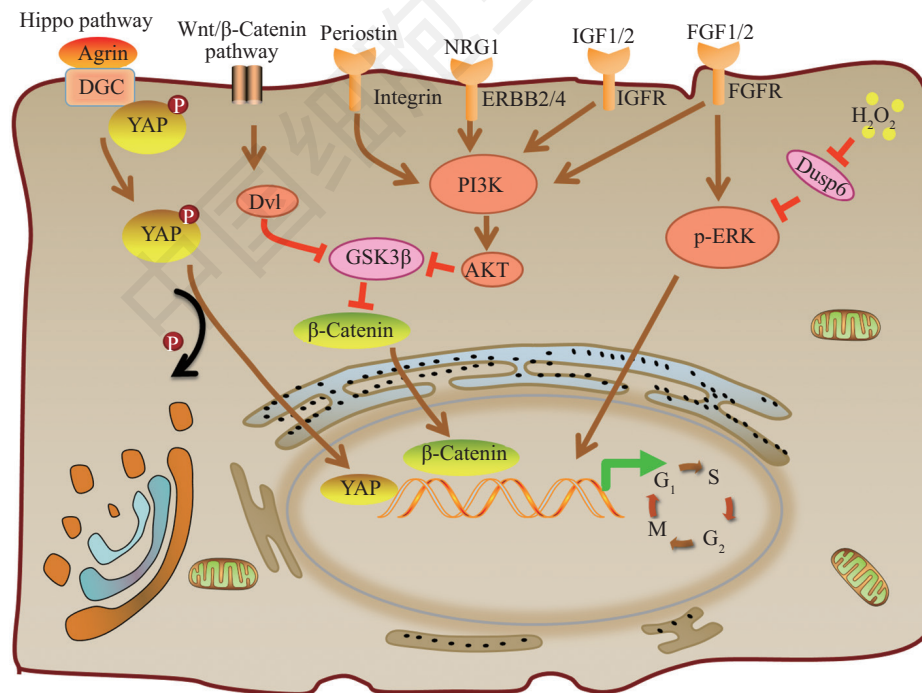
性的内皮细胞也可以作为心脏前体细胞产生心肌细胞^[25]。尽管上述研究认为, 心脏中存在内源性的心脏干细胞或心脏前体细胞, 但是一些最近的研究利用谱系追踪的遗传学技术发现, 内源性c-Kit阳性细胞对成年心肌细胞群的贡献微乎其微^[26-27]。因此, 目前对于心脏干细胞的存在及其作用仍有较大争议。

3 诱导内源心肌细胞的增殖

哺乳动物心肌梗后, 心肌细胞增殖能力有限。然而斑马鱼等却能够依靠自身心肌细胞去分化和增殖来修复受损的部位, 因此通过揭示心肌细胞增殖的分子机制, 利用这些机制激活哺乳动物内源性心肌细胞重新进入细胞周期, 可能为心脏再生医学提供新的靶点或思路。关于调控心肌细胞增殖的因素已经有一些报道, 主要包括细胞周期因子、分泌因子、转录因子、信号通路和microRNAs等(图2)。

3.1 细胞周期调控

哺乳动物细胞周期活性是影响出生后心肌细胞增殖能力的重要因素。早期胚胎发育结束后, 细胞周期调节因子如细胞周期蛋白(cyclin)和细胞周期



其中分泌因子包括Periostin、NRG1、IGF1/2、FGF1/2、WNT等; 信号通路包括IGF-PI3K-AKT、Wnt/β-Catenin、Hippo-YAP、FGF-MAPK等。棕色箭头指加强; 红色箭头指抑制。

The secretory factors include Periostin, NRG1, IGF1/2, FGF1/2, WNT, etc. The signal pathways include IGF-PI3K-AKT, Wnt/β-Catenin, Hippo-YAP, FGF-MAPK, etc. Brown arrow stands for inhibitory effect and red arrow for activating effect.

图2 诱导心肌细胞增殖的信号通路

Fig.2 Major signaling pathways on inducing cardiomyocyte proliferation

蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)的心脏表达基本上被抑制^[28]。最近的研究者正在研究调控两大蛋白家族以促进心肌细胞重新进入细胞周期的方法。

Cyclin D是G₁期细胞周期蛋白,驱动G₁/S期转变。小鼠心肌梗死后持续表达cyclin D2可以促进DNA合成和梗死减少^[29]。Cyclin B是G₂期细胞周期蛋白,它调控细胞进入和离开细胞周期M期。过表达cyclin B1-CDC2复合物可以刺激成年心肌细胞细胞分裂,并且cyclin B1-CDC2复合物缺乏导致成年心肌细胞停留在G₂/M期^[30]。在成年猪心脏中过表达cyclin A2能促进心肌细胞分裂,使梗死后心肌细胞数量增加,心脏功能改善^[31-32]。这意味着cyclin D2、cyclin B和cyclin A2的过表达可能是刺激损伤后心肌细胞增殖的潜在靶标。

多个研究结果显示,细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂与CDK结合,并使cyclin B1-CDC2复合物失活,从而负调节细胞周期活性以及抑制心肌细胞增殖。CIP/KIP家族成员(p21、p27和p57)存在于成体心肌细胞,调节多个CDK成员以关闭细胞周期^[33-34]。CDK抑制剂p27和p57协同作用使细胞退出细胞周期发生分化^[35]。

小鼠出生后p21/p27与cyclin E/cyclin A-CDK结合促进细胞退出细胞周期。p21和p27敲除小鼠出生后心肌细胞的细胞周期分布模式显示,G₁期细胞周期退出失败并发生DNA复制,这些结果表明,p21(CIP1)和p27(KIP)在出生后心肌细胞的细胞周期退出中起重要作用^[36]。

最近研究者发现一组细胞周期调节因子的组合CDK1/CCNB/CDK4/CCND(cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1/cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1)简称四因子的过表达可以有效诱导成年小鼠、大鼠或人心肌细胞的增殖。体内谱系追踪实验显示:发生细胞分裂、急性心肌梗死后过表达这四个因子可以明显改善心功能;此外,用Wee1和TGFβ抑制剂替代CDK1/CCNB可以进一步促进心肌细胞进入细胞周期^[37-38]。以上研究表明,调控细胞周期调节因子阻止心肌细胞退出细胞周期或使退出细胞周期的细胞重新进入细胞周期可能成为心脏修复的治疗策略之一。

3.2 分泌因子调控

越来越多的信号转导研究表明,除细胞周期调

节因子外,细胞外和旁分泌因子可刺激心肌细胞表面受体,从而诱导心肌细胞重新进入细胞周期及促进心脏再生。

NRG1(neuregulin1)是一种表皮生长因子,可以通过心肌中的ERBB2/4酪氨酸激酶受体调节心脏发育^[39]。近期研究发现,NRG1通过激活PI3K-AKT和ERBB2/ERBB4依赖性激活的YAP信号通路,诱导分化的心肌细胞从S期重新进入细胞周期并经历核分裂和胞质分裂,从而促进心肌细胞增殖。成年小鼠外源给予NRG1同样导致心肌细胞增殖。此外,在冠脉左前降支结扎造成缺血性损伤后,瞬时过表达ERBB2可以显著改善心功能促进心脏再生。相反,胚胎或新生儿心肌细胞中敲除ERBB2导致心肌细胞数目减少,因此外源使用NRG1成为心脏再生和功能修复的新策略^[40-42]。此外,值得注意的是,NRG1激活的程度需要被严格调控,持续激活NRG1导致动物心肌肥大并最终导致心力衰竭^[43-44](图2)。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)属于分泌蛋白家族中的一员,参与了体内多种器官发育和疾病发生过程,多种FGF被证实与胎儿和新生儿心肌细胞增殖的调节相关^[45]。在左前降支结扎致心梗的小鼠中,FGF2的缺失导致成纤维细胞增殖和间质胶原沉积减少,内皮细胞增殖和血管密度降低,心肌细胞肥大减少,最终导致梗死面积增加。相反,FGF2的过表达增加了成纤维细胞的增殖和胶原沉积,加速了内皮细胞增殖,这些变化抑制了梗死面积的扩张并改善了左心室功能。这些结果表明,使用FGF2可以促进心肌梗死后修复并增强心肌梗死患者的心脏功能^[46]。成年大鼠心肌细胞体外实验表明,FGF1与p38 MAPK抑制剂共同作用可以促进出生后心肌细胞增殖^[47]。在心梗手术后,用FGF1和p38 MAPK抑制剂同时处理可以在梗死区和梗死区边缘引发心肌细胞有丝分裂,从而减少瘢痕并改善心功能;该研究还发现,单独使用p38 MAPK抑制剂也能在一定程度上促进心肌细胞增殖,但是不能改善心功能^[48]。与这篇报道一致,2016年一项临床试验结果显示,p38 MAPK抑制剂losmapimod未能改善急性心梗患者的心功能^[49]。此外有研究显示,将带有FGF或NRG1的微粒通过导管输送到缺血再灌注模型猪心脏后,血管新生和心肌重塑增加,并伴随着心脏功能的改善^[50](图2)。

心外膜生长因子1(follistatin-like 1, FST1)也已

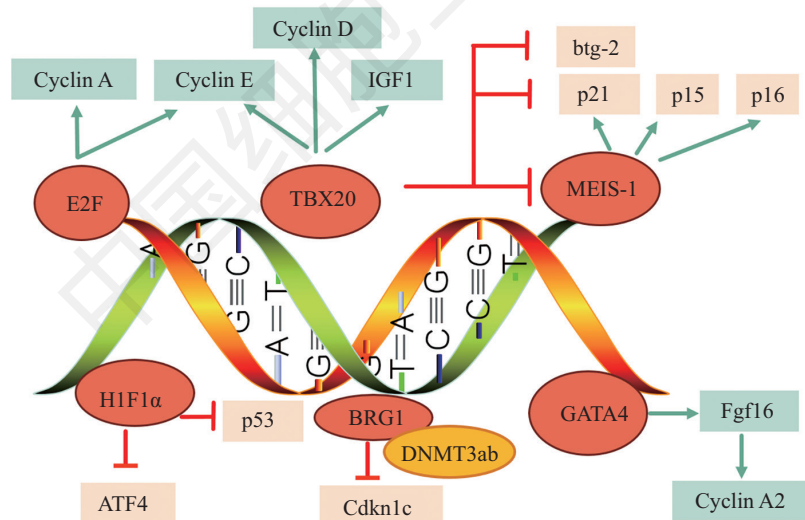
被证明可促进心肌细胞增殖。将FST1心外膜贴片递送至猪和小鼠梗死模型可促进已有心肌细胞的增殖,从而改善心脏功能和心梗后的存活率。值得注意的是,只有心外膜产生的FST1具有促心肌增殖效果,表明信号因子的时空调节在诱导心肌细胞增殖中起关键作用^[51]。此外,心外皮细胞中DUOX在再生过程中被激活,产生的H₂O₂作为一个新的信号分子促进心肌细胞增殖并抑制纤维化,从而促进斑马鱼心脏再生^[52]。生长因子IGF家族也参与了细胞增殖调控。IGF1是一种有丝分裂原,它可以与IGF1受体结合引发细胞内信号传导。之前文献报道,IGF1可以连接Wnt、Hippo和PI3K通路,从而协助调控心腔形态发生和胚胎心脏大小^[53-54]。在转基因小鼠中过表达IGF1可以刺激心肌细胞增殖并引起心脏重量的增加。持续过表达IGF1可以防止心肌梗死后的细胞死亡并限制心室扩张^[55-56]。在左前降支结扎的猪心梗模型中,将生长激素释放激素(IGF1的激活剂)注射到猪心脏中导致瘢痕形成显著减少,但是心功能却未改善^[57]。类似地,小鼠发育过程中心外膜中的IGF2信号是心室心肌细胞增殖所必需的。生长因

子IGF1和肝细胞生长因子HGF的共同给药改善了猪心梗后的心脏功能,并刺激了心肌细胞的增殖和毛细血管新生^[58](图2)。

Periostin是一种分泌的细胞外基质蛋白。研究发现,它在胚胎心脏中表达,但在健康的成年心室中不表达。它在损伤后在成年心室心肌细胞中重新被激活^[59]。Periostin可以通过PI3K途径诱导已经分化的心肌细胞重新进入细胞周期;通过Aurora-B和BrdU检测发现,已分化的心肌细胞可以实现完全的细胞分裂。Periostin递送可以减少心肌梗死后的纤维化,减小梗死面积,促进血管生成并改善心功能^[60]。2017年研究发现,Periostin对于心肌细胞增殖、血管生成和心肌梗死后的心脏再生是必需的。Periostin通过PI3K/AKT/GSK3b信号介导心肌梗死后的心肌细胞增殖^[61](图2)。

3.3 转录因子调控

近年来,研究人员已经确定了许多调节心脏再生的信号传导途径,多种转录因子可以调控细胞周期从而调控心肌细胞的增殖。目前发现的相关转录因子有E2F、MEIS1、GATA4、TBX20、HIF1 α 等(图3)。



E2F、TBx20通过上调细胞周期蛋白cyclin A、cyclin D、cyclin E以激活心肌细胞增殖。Tbx20还可以通过关闭MEIS1、btg-2和p21的表达诱导成年心肌细胞的增殖。MEIS1转录激活p15、p16和p21以抑制心肌细胞增殖。GATA4通过上调旁分泌因子FGF16激活细胞周期蛋白cyclin A2,促进心肌细胞进入细胞周期。HIF1 α 抑制ATF4和p53促进心肌细胞增殖。BRG1与DNMT3ab协同负调控Cdkn1c,从而促进心肌细胞增殖。红色箭头指抑制;绿色箭头指加强。

E2F and TBX20 up-regulate expression of cyclin A, cyclin D, and cyclin E to activate cardiomyocyte proliferation. Tbx20 induces proliferation of adult cardiomyocytes by inhibiting the expression of MEIS1, btg-2 and p21. MEIS1 activates p15, p16 and p21 to inhibit cardiomyocyte proliferation. GATA4 activates cyclin A2 by up-regulating the paracrine factor FGF16 to promote cardiomyocytes into the cell cycle. HIF1 α represses ATF4 and p53 to promote cardiomyocytes proliferation. BRG1 promotes heart regeneration by repressing cyclin-dependent kinase inhibitors through DNMT3ab-dependent DNA methylation. Red arrow stands for inhibitory effect and green arrow for activating effect.

图3 转录因子调节心肌细胞增殖

Fig.3 Transcription factors regulate cardiomyocyte proliferation

研究发现, E2F与细胞周期其他蛋白形成复合物调节心肌细胞增殖和分化^[28]。体内实验发现, 通过直接注射E2F1的腺病毒到心肌中可以有效刺激大鼠心室肌细胞中的DNA合成, 导致心肌细胞在细胞周期的G₂/M期积累, 细胞凋亡和死亡率上升^[62](图3)。小鼠中E2F2的过表达造成S期心肌细胞数量显著增加, Aurora-B和BrdU阳性心肌细胞显著增加, 表明心肌细胞完成整个细胞周期, 可以进行有丝分裂和胞质分裂^[63]。

最近的心脏再生研究发现, 转录因子MEIS1是出生后心肌细胞增殖的关键调节因子^[64]。Meis1缺失的乳鼠心肌细胞中心肌细胞增殖的时间窗口延长。在成年小鼠心脏中, Meis1缺失激活心肌细胞重新进行有丝分裂而不损害心肌细胞功能, 而Meis1的过表达抑制乳鼠心脏再生, 同时他们还发现, CDK抑制剂p15、p16和p21是Meis1转录激活靶点(图3), MEIS1对于p15、p16和p21转录激活是必需的^[64]。

GATA4是锌指蛋白转录因子, 在心脏发育过程中起关键作用^[65]。在乳鼠心尖切除手术或冷冻损伤手术后, 心肌细胞中Gata4缺失导致心肌细胞增殖降低, GATA4通过调节旁分泌因子FGF16促进心脏损伤后的修复, 过表达FGF16可以部分挽救GATA4缺失引起的心脏损伤后修复的缺陷(图3)^[66]。

TBX20是发育过程中心肌细胞增殖所必需的转录因子, 它一方面启动cyclin D、cyclin E和IGF1驱动心肌细胞进入细胞周期, 另一方面关闭MEIS1、btg-2和p21的表达以诱导成体心肌细胞的增殖^[67](图3)。心肌梗死后在心肌细胞中过表达Tbx20可以明显减少梗死面积改善心脏功能, 提高存活率^[68]。

BRG1作为BAF复合物(brahma-associated factor complex)的核心亚基, 可辅助结合DNA的调控因子。BRG1在心脏发育过程中尤为重要, 在心内皮中特异性敲除Brg1后, E9.5天的胚胎出现了严重的心肌小梁形成缺陷^[69]。在再生过程中, BRG1可以和DNMT3ab相互作用, 提高Cdkn1c启动子区域的DNA甲基化水平, 进而抑制Cdkn1c的转录, 从而促进再生过程中斑马鱼心肌细胞的增殖^[70]。

HIF1 α 是一种转录因子, 可调节细胞对缺氧的反应^[71]。关于HIF1 α 在心肌细胞增殖中的研究显示, 在斑马鱼心室切除后, 产生快速强烈的缺氧诱导刺激, 抑制HIF1 α 功能后, 心肌细胞增殖被抑制进而无法实现心脏再生, 证明HIF1 α 是斑马鱼心脏再生过程

中关键调控因子^[72]。HIF1 α 通过直接调节能量代谢、细胞周期、胞外基质沉积、p53和ATF4信号传导, 促进胚胎期心肌细胞的增殖^[73](图3)。

3.4 信号通路调控

在过去20年中, 关于PI3K-AKT、Wnt/ β -Catenin、Hippo-YAP和JAK/STAT等信号通路在心肌细胞增殖中的调控作用也有很多报道。PI3K-AKT是细胞内信号传导途径, 是细胞周期的驱动因子之一。对心肌细胞的研究表明, PI3K-AKT信号激活后, 乳鼠和成年心肌细胞有丝分裂增加, 心肌细胞数量增加^[74]。Wnt/ β -Catenin信号传导是调节心脏发育和再生过程的主要信号传导途径之一。Wnt信号抑制可以改善成年小鼠心肌梗损伤后的心脏功能。其抑制心肌肥大的作用可能与Ca²⁺依赖性途径有关, 这是非经典Wnt信号传导的一部分。Wnt信号传导可以通过PKB/AKT和Gaq影响心肌细胞凋亡和存活。血管生成祖细胞可以通过 β -Catenin促进血管生成。Wnt信号通路可以影响金属蛋白酶的分泌, 从而改变心脏纤维化和细胞外基质组成^[75]。此外, Wnt抑制剂或基因敲除Wnt/ β -Catenin信号传导途径中的GSK3b诱导细胞进入S期和增加心肌细胞更新, 提高心肌细胞的增殖。在小鼠中敲除GSK3b会导致心肌细胞过度增殖引起肥厚性心脏病^[76-77]。Hippo-YAP信号通路在进化上是保守的, 近年来, 研究人员已经确定了Hippo在心脏发育、疾病、心肌细胞稳态和再生中的关键作用。在发育期间, Hippo信号传导通过抑制心肌细胞增殖以维持心脏的适当大小^[78]。胚胎发育过程中, 在心脏中特异性敲除Hippo信号通路中的成分Salv(Salvador)后, 心肌细胞会过度生长从而出现心脏扩大^[79]。相反地, 心脏发育过程中的Yap缺失会导致明显的心室壁变薄以及胚胎死亡^[78,80]。此外, 最近报道显示, Hippo效应子Yap与肌营养不良蛋白-糖蛋白复合物DGC以及细胞外蛋白Agrin相互作用来调节心肌细胞增殖, 小鼠心肌梗后给予Agrin可以促进心脏再生^[81-83]。机制研究显示, DGC(dystrophinglyco protein complex)的组成成分之一DAG1(dystroglycan 1)与YAP结合抑制心肌细胞增殖, 而Hippo引起YAP磷酸化, 会增强DAG1与YAP之间的结合, 抑制心肌细胞增殖, 所以通过抑制DAG1和Hippo可以使YAP释放到核内, 促进心肌细胞增殖。JAK/STAT信号通路是与心脏再生密切相关的信号通路之一, 在斑马鱼中抑制该信号通路导致心肌损伤后心肌细胞增殖减少和瘢痕形成增

加^[84]。在小鼠的心肌炎模型中发现, 心肌炎损伤的恢复由已有心肌细胞通过STAT3重新进入细胞周期进行增殖而实现。通过用细胞周期标志物Ki-67和Aurora-B免疫荧光发现, 高比例的单核心肌细胞进入细胞周期并重新进行细胞分裂。细胞命运图谱分析(fate mapping)进一步证实了STAT3不仅是一种保护因子而且还是哺乳动物成年心肌细胞增殖的调控因子^[85](图3)。

3.5 microRNAs调控

miRs(microRNAs)是一种小的非编码RNAs, 在抑制基因表达、维持心肌细胞的稳态中发挥了重要作用。成年小鼠心肌中产生miRs的关键酶Dicer基因敲除导致扩张型心肌病和心力衰竭。终末期心力衰竭患者的DICER表达降低, 提示DICER和miRs在心脏发育和心力衰竭中具有重要作用^[86]。通过高通量功能筛选发现204种miRs可促进新生心肌细胞增殖, 331种miRs可抑制心肌细胞增殖而不影响细胞存活。其中40种miRs在DNA复制和胞质分裂中起到了重要作用, 人miR-590和miR-199a可促进新生小鼠和成年小鼠心肌细胞重新进入细胞周期, 促进心肌细胞增殖, 心肌梗死后, 递送miR-590/199a会刺激心脏再生并改善心脏功能^[87]。miR-17-92和miR302-367的miRNA簇调控胚胎时期和出生后心肌细胞的增殖。miR-17-92通过增加CDK1的表达促进成年心肌细胞增殖, 这种增殖上调与PTEN的抑制有关^[88]。在发育过程中, miR302-367是心肌细胞增殖的必需因子, 在成年心脏中过表达miR302-367可以减少心肌梗死后的纤维化瘢痕。然而, 这些心脏出现心肌细胞去分化、心室扩张和心脏功能降低现象。有趣的是, miR302-367靶向Hippo通路的Mst和Lats激酶, 表明miR302-367对心肌细胞更新和再生的调节至少部分通过抑制Hippo信号^[89]。新生和成年小鼠心脏左前降支结扎手术后, 抑制miR-15家族可以促进心肌细胞增殖, 减小心肌梗死面积, 改善心功能^[90]。在小鼠和猪中使用靶向miR-15的抗-miR寡核苷酸治疗可以减少缺血再灌注后梗死面积^[91]。综上所述, 这些研究表明, 靶向miRNAs仍然是诱导心脏修复过程的一种有前途的治疗策略(图3)。

4 展望

心脏病不仅导致严重的心肌细胞损失, 也表现出心脏重塑。临床上, 目前心肌梗死的治疗手段主

要有药物干预、左室辅助装置植入、心脏移植手术等。左室辅助装置植入、药物干预等手段也只能恢复血液再灌注或改善存活心肌细胞的功能, 而不能修复或替代已经坏死的心肌。心脏移植手术供体稀少、免疫排斥反应等术后问题限制了其发展。细胞移植是另一种可以改善动物心肌梗死后的心脏功能的策略。这种方法主要依赖于胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)或诱导多功能干细胞(induction of pluripotent stem cells, iPSC)定向分化成的心脏前体干细胞或心肌细胞。尽管多项研究结果显示, 利用转录因子或诱导因子如GATA4、MEF2C、TBX5、BMP4、bFGF等可以高效地将皮肤成纤维细胞、胚胎干细胞等诱导分化为成熟心肌样细胞, 并可以表达心肌细胞的特异性标记^[92-94], 但是目前诱导出的心肌细胞移植到小鼠等模式动物体内存在存活率低、很难与宿主心肌细胞发生整合以及引起心律不齐等问题, 因此该策略对于心脏功能的改善存在很大争议。此外研究者还尝试运用组织工程技术构建一个新的组织替换受损组织。2008年有研究者尝试基于全器官脱细胞策略建造了“人工心脏”^[95], 但该策略目前实用性不强。此外, 已经有多种体外构建三维工程化心肌组织(心脏创可贴)的报道。体外重建三维心肌组织经历了心肌细胞片层形成、液态胶原与心肌细胞复合、体外再造有自主收缩功能的心肌环、动物模型上验证移植的细胞生理功能、将细胞与材料结合进行复合移植等过程。可注射性心肌细胞的研究不仅仅考虑细胞的功能, 并且对移植细胞周围的微环境进行了较深入的研究, 目前的研究热点是寻找共同发挥作用的转录因子等物质, 来促进外源心肌细胞在梗死部位发挥功能^[96-97]。但是无论是心脏创可贴还是可注射性心肌细胞在临床上都面临着诸多问题, 例如开胸手术的必要性和注射位置的选择等都有待进一步探讨。

利用动物模型来研究诱导内源性心肌细胞自我更新无疑是产生新的健康的心肌细胞可行的策略。近年来研究人员已经在诱导内源性心肌细胞增殖方面取得了稳步进展。诱导心肌细胞重新进入细胞周期的新的靶点和信号通路不断被发现, 通过促进增殖产生新的心肌细胞, 从而减小梗死面积改善心功能, 逆转心衰的发展。因此鉴定靶向心肌细胞增殖信号传导途径的药物对于开发有效的心脏修复疗法是必不可少的。理想条件下, 这些药物分子

可用于特异性促进心肌细胞增殖, 同时无心脏毒性。病毒传递或直接注射心肌细胞增殖激动剂可能是一种可行的心脏修复策略。然而, 将心脏特异性病毒载体等技术应用于临床需要深思熟虑, 特别是需要考虑其潜在的致癌性。心外膜贴剂递送细胞外因子是刺激内源性修复的补充策略。该方法的优点一方面降低了受体细胞排斥递送因子的可能性, 另一方面递送的效应是短期的, 从而降低了肿瘤形成的可能性。然而此种递送路径有可能刺激非心肌细胞的增殖。类似地, 目前的抗miRs心脏保护策略也缺乏心肌细胞特异性^[98]。尽管目前很多调控心肌细胞增殖的信号开关已经找到, 但是这些信号开关之间的关系, 哪些组合可以有效精准地开启心肌细胞增殖的开关, 如何控制心肌细胞激活的程度等相关问题均需要进一步论证。此外除了心肌细胞, 内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和浦肯野细胞等在挽救心梗后心衰的功能也不容忽视^[67]。因此利用诱导内源性心肌细胞自我更新治疗心衰策略还有很长的路要走。

参考文献 (References)

- Graham E, Bergmann O. Dating the heart: Exploring cardiomyocyte renewal in humans. *Physiology* 2016; 32(1): 33-41.
- Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: Observations on stem cells and cardiac repair. *J. Am Coll Cardiol* 2006; 47(9): 1777-85.
- Thygesen K, Alpert JS, White HD, Thygesen K, Jaffe AS, White HD, *et al.* Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007; 116(22): 2634-53.
- Giardoglou P, Beis D. On zebrafish disease models and matters of the heart. *Biomedicines* 2019; 7(1): 15.
- Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002; 298; (5601): 2188.
- Cao J, Poss KD. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15(10): 631-47.
- Chablais F, Veit J, Rainer G, Jaźwińska A. The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev Biol* 2011; 11: 21.
- Wang J, Panáková D, Kikuchi K, Holdway JE, Gemberling M, Burris JS, *et al.* The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development* 2011; 138(16): 3421-30.
- Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 2011; 331; (6020): 1078-80.
- Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Izpisua Belmonte JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 2010; 464(7288): 606-9.
- Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, *et al.* Primary contribution to zebrafish heart regeneration by GATA4⁺ cardiomyocytes. *Nature* 2010; 464(7288): 601-5.
- Bettencourt-Dias M, Mittnacht S, Brockes JP. Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2003; 116(19): 4001.
- Zhang Y, Zhong JF, Qiu H, MacLellan WR, Marbán E, Wang C. Epigenomic reprogramming of adult cardiomyocyte-derived cardiac progenitor cells. *Sci Rep* 2015; 5: 17686.
- Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, Yang VK, Cai L, Wang M, *et al.* Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 2013; 493(7432): 433-6.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324(5923): 98-102.
- Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, *et al.* Dynamics of cell generation and turnover in the human heart. *Cell* 2015; 161(7): 1566-75.
- Mollova M, Bersell K, Walsh S, Savla J, Das LT, Park SY, *et al.* Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(4): 1446-51.
- Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2013; 12(6): 689-98.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114(6): 763-76.
- Sanada F, Kim J, Czarna A, Chan NY, Signore S, Ogórek B, *et al.* C-kit-positive cardiac stem cells nested in hypoxic niches are activated by stem cell factor reversing the aging myopathy. *Circ Res* 2014; 114(1): 41-55.
- Ellison Georgina M, Vicinanza C, Smith Andrew J, Aquila I, Leone A, Waring Cheryl D, *et al.* Adult c-kitpos cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* 2013; 154(4): 827-42.
- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, *et al.* Postnatal is11⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433(7026): 647-53.
- Uchida S, De Gaspari P, Kostin S, Jenniches K, Kilic A, Izumiya Y, *et al.* Sc1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Rep* 2013; 1(5): 397-410.
- Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, *et al.* Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; 265(1): 262-75.
- Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, *et al.* A myocardial lineage derives from tbx18 epicardial cells. *Nature* 2008; 454(7200): 104-8.
- van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SCJ, *et al.* C-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* 2014; 509(7500): 337-41.
- Sultana N, Zhang L, Yan J, Chen J, Cai W, Razaque S, *et al.* Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun* 2015; 6: 8701.
- Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 2007; 87(2): 521-44.

- 29 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): 110-8.
- 30 Bicknell KA, Coxon CH, Brooks G. Forced expression of the cyclin B1-CDC2 complex induces proliferation in adult rat cardiomyocytes. *Biochem J* 2004; 382; (Pt 2): 411-6.
- 31 Shapiro SD, Kawase Y, Cheng RK, Kara RJ, Bhattacharya R, Guzman-Martinez G, *et al.* Cyclin a2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction through cytokinesis of adult cardiomyocytes. *Sci Transl Med* 2014; 6(224): 224ra27.
- 32 Woo YJ, Panlilio Corinna M, Cheng Richard K, Liao George P, Atluri P, Hsu Vivian M, *et al.* Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure. *Circulation* 2006; 114(1_supplement): I-206-I-13.
- 33 Ikenishi A, Okayama H, Iwamoto N, Yoshitome S, Tane S, Nakamura K, *et al.* Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Dev Growth Differ* 2012; 54(8): 731-8.
- 34 Tane S, Okayama H, Ikenishi A, Amemiya Y, Nakayama KI, Takeuchi T. Two inhibitory systems and CKIs regulate cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes after birth. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 466(2): 147-54.
- 35 Zhang P, Wong C, DePinho RA, Harper JW, Elledge SJ. Co-operation between the CDK inhibitors p27 (KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev* 1998; 12(20): 3162-7.
- 36 Tane S, Ikenishi A, Okayama H, Iwamoto N, Nakayama KI, Takeuchi T. CDK inhibitors, p21CIP1 and p27KIP1, participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 443(3): 1105-9.
- 37 Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, Zhou P, Huang Y, Eifenbein A, *et al.* Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. *Cell* 2018; 173(1): 104-16.e12.
- 38 Heallen Todd R, Kadow Zachary A, Kim Jong H, Wang J, Martin James F. Stimulating cardiogenesis as a treatment for heart failure. *Circ Res* 2019; 124(11): 1647-57.
- 39 Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: Towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(7): 505-16.
- 40 Bersell K, Arab S, Haring B, Kühn B. Neuregulin1/ERBB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell* 2009; 138(2): 257-70.
- 41 Wadugu B, Kühn B. The role of neuregulin/ERBB2/ERBB4 signaling in the heart with special focus on effects on cardiomyocyte proliferation. *Am J Physiol* 2012; 302(11): H2139-H47.
- 42 Lin Z, Zhou P, von Gise A, Gu F, Ma Q, Chen J, *et al.* Pi3kcb links Hippo-YAP and PI3K-Akt signaling pathways to promote cardiomyocyte proliferation and survival. *Circ Res* 2015; 116(1): 35-45.
- 43 Vagnozzi RJ, Molkentin JD, Houser SR. New myocyte formation in the adult heart: Endogenous sources and therapeutic implications. *Circ Res* 2018; 123; (2): 159-76.
- 44 Yutzey KE. Neuregulin 1 makes heart muscle. *Nature* 2015; 520: 445.
- 45 Itoh N, Ohta H, Nakayama Y, Konishi M. Roles of FGF signals in heart development, health, and disease. *Front Cell Dev Biol* 2016; 4: 110.
- 46 Virag JAI, Rolle ML, Reece J, Hardouin S, Feigl EO, Murry CE. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: Effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. *Am J Pathol* 2007; 171(5): 1431-40.
- 47 Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, *et al.* p38 map kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 2005; 19(10): 1175-87.
- 48 Engel FB, Hsieh PCH, Lee RT, Keating MT. FGF1/p38 map kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(42): 15546-51.
- 49 O'Donoghue ML, Glaser R, Cavender MA, Aylward PE, Bonaca MP, Budaj A, *et al.* Effect of losmapimod on cardiovascular outcomes in patients hospitalized with acute myocardial infarction: A randomized clinical trial effect of losmapimod on cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *JAMA* 2016; 315; (15): 1591-9.
- 50 Garbayo E, Gavira JJ, de Yebenes MG, Pelacho B, Abizanda G, Lana H, *et al.* Catheter-based intramyocardial injection of FGF1 or NRG-loaded MPs improves cardiac function in a preclinical model of ischemia-reperfusion. *Sci Rep* 2016; 6: 25932.
- 51 Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cuñado M, Zhao M, Maruyama S, *et al.* Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* 2015; 525(7570): 479-85.
- 52 Han P, Zhou XH, Chang N, Xiao CL, Yan S, Ren H, *et al.* Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism. *Cell Res* 2014; 24(9): 1091-107.
- 53 Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Schwartz RJ, *et al.* Regulation of insulin-like growth factor signaling by yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Sign* 2011; 4(196): ra70-ra.
- 54 Hertig CM, Kubalak SW, Wang Y, Chien KR. Synergistic roles of neuregulin-1 and insulin-like growth factor-I in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway and cardiac chamber morphogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274(52): 37362-9.
- 55 Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, Li B, *et al.* Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(16): 8630-5.
- 56 Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Anversa P. The IGF-1-IGF-1 receptor system modulates myocyte proliferation but not myocyte cellular hypertrophy *in vitro*. *Exp Cell Res* 1994; 215(2): 273-83.
- 57 Bagno LL, Kanashiro-Takeuchi RM, Suncion VY, Golpanian S, Karantalis V, Wolf A, *et al.* Growth hormone-releasing hormone agonists reduce myocardial infarct scar in swine with subacute ischemic cardiomyopathy. *J Am Heart Association* 2015; 4; (4): e001464.
- 58 Koudstaal S, Bastings MM, Feyen DA, Waring CD, van Slochteren FJ, Dankers PY, *et al.* Sustained delivery of insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor stimulates endogenous cardiac repair in the chronic infarcted pig heart. *J Cardiovasc Transl Res* 2014; 7; (2): 232-41.
- 59 Snider P, Hinton RB, Moreno-Rodriguez RA, Wang J, Rogers R, Lindsley A, *et al.* Periostin is required for maturation and

- extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart. *Circ Res* 2008; 102(7): 752-60.
- 60 Kühn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang Y-S, Lebeche D, Arab S, *et al.* Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. *Nat Med* 2007; 13: 962.
- 61 Chen Z, Xie J, Hao H, Lin H, Wang L, Zhang Y, *et al.* Ablation of periostin inhibits post-infarction myocardial regeneration in neonatal mice mediated by the phosphatidylinositol 3 kinase/glycogen synthase kinase 3 β /cyclin d1 signalling pathway. *Cardiovasc Res* 2017; 113(6): 620-32.
- 62 Agah R, Kirshenbaum LA, Abdellatif M, Truong LD, Chakraborty S, Michael LH, *et al.* Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in post-mitotic adult myocardium *in vivo*. *J Clin Invest* 1997; 100(11): 2722-8.
- 63 Ebel H, Zhang Y, Kampke A, Xu J, Schlitt A, Buerke M, *et al.* E2F2 expression induces proliferation of terminally differentiated cardiomyocytes *in vivo*. *Cardiovasc Res* 2008; 80(2): 219-26.
- 64 Muralidhar SA, Sadek HA. Etiology and morphogenesis of congenital heart disease: From gene function and cellular interaction to morphology. Springer: New York, 2016: 93-101.
- 65 Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997; 11(8): 1061-72.
- 66 Yu W, Huang X, Tian X, Zhang H, He L, Wang Y, *et al.* GATA4 regulates FGF16 to promote heart repair after injury. *Development* 2016; 143(6): 936-49.
- 67 Hashmi S, Ahmad HR. Molecular switch model for cardiomyocyte proliferation. *Cell Regen* 2019; 8(1): 12-20.
- 68 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): 1081-92.
- 69 Stankunas K, Hang CT, Tsun ZY, Chen H, Lee NV, Wu JI, *et al.* Endocardial Brg1 represses *adamts1* to maintain the microenvironment for myocardial morphogenesis. *Dev Cell* 2008; 14(2): 298-311.
- 70 Xiao C, Gao L, Hou Y, Xu C, Chang N, Wang F, *et al.* Chromatin-remodelling factor *brg1* regulates myocardial proliferation and regeneration in zebrafish. *Nat Commun* 2016; 7: 13787.
- 71 Semenza GL. Hif-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88(4): 1474-80.
- 72 Jopling C, Sune G, Faucherre A, Fabregat C, Izpisua Belmonte JC. Hypoxia induces myocardial regeneration in zebrafish. *Circulation* 2012; 126(25): 3017-27.
- 73 Guimaraes-Camboa N, Stowe J, Aneas I, Sakabe N, Cattaneo P, Henderson L, *et al.* Hif1 α represses cell stress pathways to allow proliferation of hypoxic fetal cardiomyocytes. *Dev Cell* 2015; 33(5): 507-21.
- 74 Beigi F, Schmeckpeper J, Pow-Anpongkul P, Payne JA, Zhang L, Zhang Z, *et al.* C3orf58, a novel paracrine protein, stimulates cardiomyocyte cell-cycle progression through the PI3K-AKT-CDK7 pathway. *Circ Res* 2013; 113(4): 372-80.
- 75 Bergmann MW. Wnt signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling: Lessons learned from cardiac development. *Circ Res* 2010; 107(10): 1198-208.
- 76 Tseng AS, Engel FB, Keating MT. The GSK-3 inhibitor bio promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes. *Chem Biol* 2006; 13(9): 957-63.
- 77 Kerkela R, Kockeritz L, Macaulay K, Zhou J, Doble BW, Beahm C, *et al.* Deletion of GSK-3 β in mice leads to hypertrophic cardiomyopathy secondary to cardiomyoblast hyperproliferation. *J Clin Invest* 2008; 118(11): 3609-18.
- 78 von Gise A, Lin Z, Schlegelmilch K, Honor LB, Pan GM, Buck JN, *et al.* YAP1, the nuclear target of hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(7): 2394-9.
- 79 Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL, *et al.* Hippo pathway inhibits wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 2011; 332(6028): 458-61.
- 80 Xin M, Kim Y, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Schwartz RJ, *et al.* Regulation of insulin-like growth factor signaling by YAP governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Signal* 2011; 4(196): ra70.
- 81 Lin Z, Zhou P, von Gise A, Gu F, Ma Q, Chen J, *et al.* Pi3kcb links Hippo-YAP and PI3K-AKT signaling pathways to promote cardiomyocyte proliferation and survival. *Circ Res* 2015; 116(1): 35-45.
- 82 Bassat E, Mutlak YE, Genzelinakh A, Shadrin IY, Baruch Umansky K, Yifa O, *et al.* The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature* 2017; 547(7662): 179-84.
- 83 Morikawa Y, Heallen T, Leach J, Xiao Y, Martin JF. Dystrophin-glycoprotein complex sequesters yap to inhibit cardiomyocyte proliferation. *Nature* 2017; 547(7662): 227-31.
- 84 Fang Y, Gupta V, Karra R, Holdway JE, Kikuchi K, Poss KD. Translational profiling of cardiomyocytes identifies an early JAK1/STAT3 injury response required for zebrafish heart regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(33): 13416-21.
- 85 Miyawaki A, Obana M, Mitsuhashi Y, Orimoto A, Nakayasu Y, Yamashita T, *et al.* Adult murine cardiomyocytes exhibit regenerative activity with cell cycle reentry through STAT3 in the healing process of myocarditis. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1407.
- 86 Chen JF, Murchison EP, Tang R, Callis TE, Tatsuguchi M, Deng Z, *et al.* Targeted deletion of *Dicer* in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(6): 2111-6.
- 87 Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, Zentilin L, Sinagra G, Zaccagna S, *et al.* Functional screening identifies mirnas inducing cardiac regeneration. *Nature* 2012; 492(7429): 376-81.
- 88 Chen J, Huang ZP, Seok HY, Ding J, Kataoka M, Zhang Z, *et al.* MiR-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res* 2013; 112(12): 1557-66.
- 89 Tian Y, Liu Y, Wang T, Zhou N, Kong J, Chen L, *et al.* A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci Transl Med* 2015; 7(279): 279ra38.
- 90 Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Johnson BA, Grinsfelder D, Canseco D, *et al.* Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci*

- USA 2013; 110(1): 187-92.
- 91 Hullinger TG, Montgomery RL, Seto AG, Dickinson BA, Semus HM, Lynch JM, *et al.* Inhibition of miR-15 protects against cardiac ischemic injury. *Circ Res* 2012; 110(1): 71-81.
- 92 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- 93 Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, *et al.* Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(32): 11474-9.
- 94 Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014; 510(7504): 273-7.
- 95 Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, Black LD, Kren SM, Netoff TI, *et al.* Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008; 14(2): 213-21.
- 96 Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, *et al.* Tissue-engineered lungs for *in vivo* implantation. *Science* 2010; 329(5991): 538-41.
- 97 Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, *et al.* Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 2010; 16(7): 814-20.
- 98 Heallen TR, Kadow ZA, Kim JH, Wang J, Martin JF. Stimulating cardiogenesis as a treatment for heart failure. *Circ Res* 2019; 124(11): 1647-57.