

# 新生小鼠心肌再生: 模型与机制

向晨莹 聂宇\*

(北京协和医学院, 中国医学科学院阜外医院, 国家心血管病中心, 心血管疾病国家重点实验室, 北京 100037)

**摘要** 既往的观点认为, 哺乳动物的心肌受损后只能进行瘢痕修复, 无法实现组织再生, 最终诱发心力衰竭。近年来的大量报道则指出, 哺乳动物在出生早期具备基于心肌细胞增殖的再生能力, 其强度足以修复受损的心脏组织, 恢复心脏的正常功能; 但这一能力会在出生后早期快速丢失。新生小鼠心肌再生现象的发现, 为探讨心肌再生的分子机制提供了理想的动物模型, 继而有助于心肌再生修复干预靶点的开发。目前, 已经广泛应用的新生小鼠心肌损伤再生模型包括: 心尖切除模型、心肌梗死模型、冷冻损伤模型等。该文总结了构建新生小鼠心肌损伤后再生模型的不同方法, 并综述了利用新生小鼠心肌再生模型研究取得的心肌再生机制进展。

**关键词** 心脏再生; 心肌损伤; 心力衰竭; 心肌细胞; 细胞增殖; 动物模型

## Myocardial Regeneration in Neonatal Mice: Models and Mechanisms

XIANG Chenying, NIE Yu\*

(State Key Laboratory of Cardiovascular Disease, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

**Abstract** It used to be believed that the injured myocardium of mammalian could only be repaired by scar repair, which would not achieve tissue regeneration, and eventually induce heart failure. In recent years, a large number of reports have pointed out that mammals have the ability of cardiac regeneration based on the proliferation of cardiac myocytes in the early stage of life, which is strong enough to repair the damaged cardiac tissue and restore the normal function of the heart. However, this ability will be rapidly lost in the early postnatal period. The discoveries of myocardial regeneration in neonatal mice provide ideal animal models for exploring the molecular mechanisms of myocardial regeneration, and then contribute to the development of intervention targets for myocardial regeneration and repair. At present, the widely used neonatal mice models of myocardial injury and regeneration include apical resection model, myocardial infarction model, cryoinjury model, and so on. In this paper, the different methods to construct the regeneration models of neonatal mice after myocardial injury are summarized, so as the research progress of myocardial regeneration mechanisms by using neonatal mice myocardial regeneration models.

**Keywords** cardiac regeneration; myocardial injury; heart failure; cardiomyocyte; cell proliferation; animal model

成年个体功能成熟的心肌细胞增殖更新能力极为有限<sup>[1]</sup>。JONAS等<sup>[1]</sup>利用<sup>14</sup>C放射标记DNA证实

20岁成年人心肌以每年1%左右的速度更新, 且随着年龄的递增, 心肌细胞更新的速度会越来越慢, 75岁

收稿日期: 2020-12-01

接受日期: 2021-02-02

中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(批准号: 2016-I2M-1-015)和国家自然科学基金(批准号: 81970243、81770308)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 010-88396139, E-mail: nieyu@fuwaihospital.org

Received: December 1, 2020

Accepted: February 2, 2021

This work was supported by the Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Innovation Fund for Medical Sciences (Grant No.2016-I2M-1-015) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970243, 81770308)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-88396139, E-mail: nieyu@fuwaihospital.org

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5515>

的成年人心肌更新的速度下降至每年约0.3%。由此可推论: 对于一个50岁的成年人, 出生后新生的心肌细胞仅占构成心脏心肌细胞总量的40%, 而60%的心肌细胞出生前就已发育形成并被一直保留下来。

心血管疾病会造成心脏损伤, 损伤部位心肌细胞的大量丢失<sup>[2]</sup>可引起心室重塑和肥大, 进而造成心脏的收缩和/或舒张功能障碍, 心脏泵出的血液不能满足机体营养需要<sup>[2]</sup>, 最终导致心力衰竭(heart failure)。心力衰竭是当今世界医疗难题, 全球约有3 800万心力衰竭患者<sup>[3]</sup>, 且该数字仍在不断增加。现有治疗手段<sup>[4]</sup>虽能缓解症状, 但无法完全治愈<sup>[2]</sup>, 同时高昂的治疗费用加重了患者的经济负担<sup>[5]</sup>。如果能够心肌损伤后补充足量的功能心肌细胞, 促进心肌组织再生修复, 将能够有效改善心肌损伤预后, 预防甚至治愈心力衰竭。

心肌再生医学手段的开发有赖于深入的基础医学研究。新生小鼠心肌再生模型的建立及应用<sup>[6]</sup>, 使心肌再生机制的基础研究更加规范和有效<sup>[7]</sup>。近年来, 研究人员利用新生小鼠心肌损伤模型, 鉴定出多个心肌再生相关的分子信号通路, 为临床改善心力衰竭预后、实现心肌再生提供更多新的治疗靶点<sup>[1]</sup>。新生小鼠心肌损伤模型已经成为评估哺乳动物心肌再生能力和识别心脏再生因素的标准方法<sup>[4]</sup>, 为人类心肌再生的研究提供了新的有效途径。

## 1 新生小鼠心肌再生现象

心肌再生是指心脏受损后, 及时补充足量的功能性心肌细胞, 以此修复心脏的受损部位, 从而使心脏恢复正常结构和功能<sup>[8]</sup>的过程。心肌再生现象最初在低等脊椎动物, 如硬骨鱼类和两栖类动物中被发现<sup>[9]</sup>。这些低等脊椎动物在一生中都拥有心肌再生的能力。手术切除成年斑马鱼心脏的20%心室肌组织之后, 斑马鱼的心脏会在60天之内完全再生而且没有产生明显的纤维化瘢痕<sup>[6,10]</sup>。

2011年, SADEK课题组<sup>[9]</sup>在 *Science* 上发表文章证实: 切除1日龄小鼠15%左心室心尖(apical resection), 术后3周小鼠心脏实现了心肌再生。新生小鼠心肌再生的过程包括: 心肌损伤早期心尖切除处出现了将整个尖端封闭起来的血凝块, 同时触发强烈的炎症反应。之后切除部位血凝块会逐渐被吸收, 心肌细胞增殖被激活。到术后第21天, 受损心肌组织实现了完全再生, 恢复了正常心功能。通过将磷

酸组蛋白H3(phospho-histone 3, pH3)和Aurora B激酶分别与心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)共定位分析, 对心肌细胞有丝分裂和胞质分裂进行评估, 他们发现, 在术后第7天, 切除组心脏中显示pH3阳性和Aurora B激酶阳性的心肌细胞数量明显高于假手术组。利用5-溴-2'-脱氧尿苷(5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)进行的脉冲追踪实验, 以及遗传谱系示踪(genetic fate mapping)得出的结果均证实了: 被切除的心尖区和边缘区长出了新的心肌细胞, 而新产生的心肌细胞中, 绝大部分是来自原有心肌细胞的增殖。值得注意的是, 这种再生能力在出生后1周之内就会丢失: 7天龄小鼠心尖切除后, 无法检测到明显的心肌细胞增殖, 其心脏出现了明显的、不可逆转的纤维化<sup>[9]</sup>。上述实验成功构建了新生小鼠心肌再生模型, 并证实: 哺乳动物心肌再生过程中, 新产生的心肌细胞来源于心肌细胞的自我增殖。

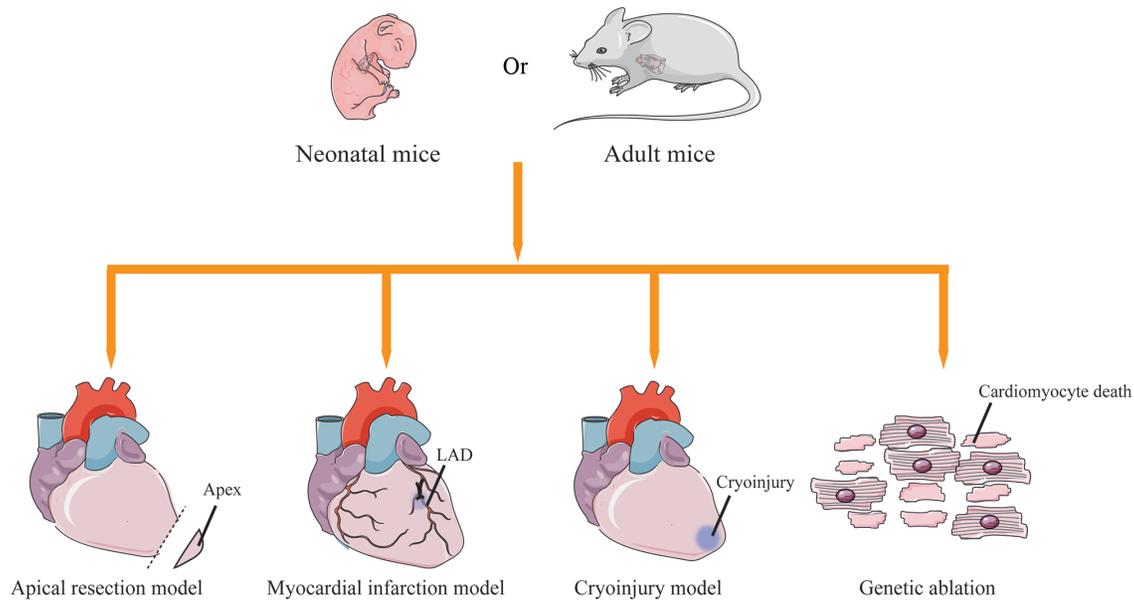
## 2 新生小鼠心肌损伤模型

当下, 新生小鼠心肌再生模型是研究心肌再生的有力工具, 在发掘受损心脏修复靶点方面发挥重要作用。以下介绍几种最常见的新生小鼠心肌损伤模型(图1)。

### 2.1 新生小鼠心尖切除模型

如上所述, 2011年, PORRELLO等<sup>[9]</sup>首次构建了新生小鼠心尖切除模型, 并利用该模型首次证实了哺乳动物心脏的再生潜能。此后该模型成为研究新生小鼠心肌再生最为常用的模型之一<sup>[11]</sup>, 并被多个课题组复制和应用<sup>[6]</sup>。但也有课题组对新生小鼠心尖切除后的再生能力提出了质疑<sup>[12]</sup>。SADEK等<sup>[13]</sup>认为该模型的稳定性与手术技术、切除心肌大小(超过40%)、使用的切除和再生心肌定量方法、评估心肌细胞增殖方法等有关。

鉴于新生小鼠心尖切除模型存在的不稳定性和领域争议, LI等<sup>[14]</sup>对心尖切除模型进行了改进和优化, 即: 在手术过程中横向切开小鼠胸腔第4肋间皮肤和肋间肌肉后, 使用显微手术镊对胸部和腹部交替施加压力, 同时用眼科镊引导心脏跳出胸腔, 使跳动的心脏在不受到机械损伤的情况下, 从胸腔中弹出, 从而成功实施开胸术。用镊子撕开心包可以解决心脏被心包固定很难外部化的问题。相较于之前的方法而言, 该方案能有效地暴露心脏, 并减少不必要的损伤, 有助于心室尖端的定位; 如上操作能有



LAD: (左冠状动脉)左前降支。

LAD: (left coronary artery) left anterior descending artery.

图1 小鼠心肌再生模型示意图

Fig.1 Schematic representation of mouse heart regeneration models

效保证心尖切除大小的统一。同时该文指出了新生小鼠心尖切除操作过程中需要注意的问题: (1) 在开胸术的操作过程中要避免肺的损伤; (2) 胸部切口过大会导致更多的失血, 额外的缝合还会延长手术时间, 增加死亡风险; (3) 避免用镊子夹住心尖将心脏拉出胸腔, 否则会造成严重的心脏损伤<sup>[14]</sup>。

对于心尖切除模型来说, 通常根据被切除部分的重量来衡量切除大小是否合适(所切除心尖占心室重量的10%~15%)。然而, 手术中出血使得准确测量切除部分的重量更加困难, 且活体状态下要根据切除部分重量占心脏重量的比重来确定切除部分的大小也很难实施。在手术中, 手术者可使用心室切除部分的长度而不是重量作为测量标准<sup>[14]</sup>: 于左心室尖端切除直径为1 mm的心尖组织是合适的, 手术后小鼠的再生率大于90%。但应注意直径小于0.5 mm的轻度切除术可能导致假阳性结果, 过度切除半径超过1.5 mm可能导致心肌再生能力受到影响甚至死亡, 手术后小鼠再生率小于45%。在心尖切除模型中, 切割角度是影响再生能力的另一个重要因素, 心尖切除的最佳角度是和心脏长轴成60~80°。小于60°或大于80°的倾斜度不足以暴露左室, 即使切割直径合适(1 mm), 也会导致假阳性结果; 而切割角度大于90°, 右心室组织会被切除, 可能导致严重的心脏损伤而阻碍再生。在手术过程中, 应该只切除一次心

尖, 心肌组织的多次剪切会造成过度的心脏损伤, 同样会阻碍心肌再生。整个手术过程尽量保证在5 min内完成, 这样可保证小鼠较高的存活率。

另外, 心尖切除后心肌再生能力测定方法的准确性对评价心尖切除模型是否成功建立至关重要。先前的研究通过少量组织切片的病理染色评价新生小鼠心脏再生<sup>[15]</sup>, 但如果没有选择适当区域进行心肌组织切片, 将有可能忽略未成功诱导再生部位的纤维化瘢痕, 从而导致对心肌再生的评估不准确。为了避免对心尖切除损伤后心脏再生能力的错误判断, LI等<sup>[14]</sup>提出了全心脏切片的心肌再生评估方法, 即: 每隔3~4 μm将心脏组织从前向后纵向切片, 共切约90片, Masson染色后, 用显微镜进行观测分析。以这种方法实施检测, 可以成功捕捉到所有的瘢痕, 获得与超声检测结果一致的心脏切片结果<sup>[15]</sup>。以上优化的操作方法能够有效地避免假阴性或假阳性结果, 减少新生小鼠心尖切除模型构建的争议, 有助于新生小鼠心尖切除后再生模型的推广与应用<sup>[14]</sup>。

## 2.2 新生小鼠心肌梗死模型

哺乳动物心肌梗死模型能够较好地模拟临床上缺血性心脏病中MI的相关症状<sup>[16]</sup>, 是目前最具病理生理学意义的动物心脏损伤模型<sup>[6]</sup>。2013年, PORRELLO等<sup>[17]</sup>将1天龄小鼠的左前降支冠状动脉(left anterior descending coronary artery)永久结扎, 成

功构建了1天龄小鼠的心肌梗死(myocardial infarction)模型。心梗手术后1周内可检测到小鼠大量心肌细胞的丢失以及心脏收缩功能障碍。术后2周,小鼠心脏受损区域出现纤维化减少的趋势。术后3周,95%以上受损心肌都完成了再生修复,心脏功能也基本恢复到正常水平。据此,他们得出结论:新生的哺乳动物心脏在心肌梗死后,可以通过心肌细胞增殖而实现再生。然而,7天龄和14天龄小鼠构建心梗模型后,心脏产生纤维化瘢痕,心室壁变薄,心室扩张,无法实现心肌再生;与成年个体心梗后的表现一致。这一结果再次证实,新生小鼠具备心肌再生能力的时间窗非常短暂,只有不到7天。

### 2.3 新生小鼠心肌组织冷冻损伤模型

新生小鼠心肌组织冷冻损伤模型(cryo-injury)是指使用液氮冷冻探针非透壁接触1天龄小鼠左心室尖端的心脏表面,使接触部位出现冷冻损伤的心肌损伤动物模型。JESTY等<sup>[18]</sup>构建了该模型,并观察到了从损伤后第5天到损伤后3周之内越来越多的横纹心肌细胞在梗死区域聚集的现象。到损伤后的第94天,纤维化区域仍在进一步被重塑;冷冻损伤模型会在接触的心脏部位表面形成大小、形状一致的疤痕,使手术造成的伤口大小差异减小,从而减小实验误差。冷冻探针的接触避免了手术容易导致心脏破裂的情况,为心肌修复过程留下细胞外基质支架,降低了术后小鼠的死亡率<sup>[16]</sup>。冷冻损伤的小鼠心脏表现出左心室功能丧失,动作电位传导速度减慢,与心肌梗死后的病理变化一致<sup>[16]</sup>,因此也是能够模拟心力衰竭的模型之一。STRUNGS等<sup>[16]</sup>观察到在1天龄小鼠心脏尖端受到冷冻损伤后,受损部位心肌在3周后完全再生,而7天龄小鼠的损伤部位则出现了明显的透壁瘢痕组织,损伤3周后未能成功再生心肌。RUBIN等<sup>[19]</sup>也指出,相较于心尖切除模型和冠状动脉结扎模型,经历严重的冷冻损伤的1天龄小鼠心肌再生失败;以上工作提示:新生小鼠心肌组织冷冻损伤模型是否适用于探讨心肌再生机制,需要更多的实验来进一步确认。

### 2.4 其他新生小鼠损伤模型

除了以上3种模型之外,新生小鼠的心肌缺血再灌注损伤模型(myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI或I/R)<sup>[20]</sup>以及细胞消融模型(genetic ablation)<sup>[21]</sup>也被应用于相关实验。小鼠的心肌缺血再灌注损伤模型(myocardial ischemia-reperfusion

injury model),即在小鼠身上模拟了再灌注损伤(reperfusion injury):缺血造成心肌受损,长期缺血后冠脉再通会导致组织损伤程度进一步加剧。2014年PUENTE等<sup>[20]</sup>报告了他们从小鼠出生后即开始每天注射N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC),并在3周龄小鼠身上诱导缺血再灌注损伤,成功使心脏再生窗延长至产后7天。小鼠的细胞消融模型是在小鼠体内通过转基因技术靶向消融特定类型的心肌细胞,造成心肌细胞的广泛性、弥散性丢失,进而使心脏受到一定程度的损伤<sup>[21]</sup>。

## 3 利用新生小鼠心肌损伤模型探索心肌再生机制

研究心肌再生,首先要明确心肌再生过程中的心肌细胞来源<sup>[4]</sup>。目前认为,再生过程中心肌细胞主要来源于内源性心肌细胞的自我增殖<sup>[9]</sup>,以及非心肌细胞(如成纤维细胞)重编程<sup>[22-23]</sup>。启动心肌细胞增殖的因素与路径,是心肌再生机制研究的重要环节。下文将对涉及心肌细胞增殖,且目前已有研究结论的心肌再生影响因素进行总结(表1)。

### 3.1 心肌细胞的细胞周期调控

SENYO等<sup>[24]</sup>基于<sup>15</sup>N-胸腺嘧啶核苷标记心肌细胞的多同位素成像质谱(multi-isotope imaging mass spectrometry, MIMS)等方法,从细胞重新进入细胞周期的角度证明了出生时已有的心肌细胞是心肌细胞更替的主要来源;而ALI等<sup>[25]</sup>利用GFP、RFP荧光蛋白标记的双标记系统镶嵌分析(mosaic analysis of double markers, MADM)模型,从细胞分裂完成情况的角度证实了出生后更新的绝大多数心肌细胞源于现存的心肌细胞。PORRELLO等<sup>[9]</sup>利用谱系示踪技术和新生小鼠心肌再生模型证实,新生小鼠心肌损伤后的再生修复的心肌细胞来源于现存心肌细胞的自我增殖。XIAO等<sup>[26]</sup>建立了一种新的、基于p53基因的谱系追踪系统,这种系统能够更灵敏、更准确地追踪小鼠在出生以后心肌细胞的增殖。他们利用该系统揭示了在小鼠体内p53心肌细胞谱系保持长期且相对较强的增殖潜能,且在新生小鼠身上诱导的三种损伤(左心室非透壁低温损伤、心尖切除和左冠状动脉结扎)均显著激活了p53心肌细胞的细胞周期再进入,以此证明了心肌细胞的自我更新和增殖是实现心肌再生重要机制<sup>[26]</sup>。

2009年BERSELL等<sup>[27]</sup>证实,生长因子神经调节

表1 有关新生小鼠心肌再生的研究情况

Table 1 Researches on myocardial regeneration of neonatal mice

作者 Authors	年份 Years	研究对象 Research subjects	对心肌再生的影响(+/-) Effect on myocardial regeneration (+/-)
BERSELL, et al <sup>[27]</sup>	2009	NRG1/ERBB4	+
MAHMOUD, et al <sup>[29]</sup>	2013	Meis1	-
AURORA, et al <sup>[47]</sup>	2014	Monocytes/Macrophages	+
LIU, et al <sup>[56]</sup>	2014	T $\beta$ 4	+
PUENTE, et al <sup>[20]</sup>	2014	ROS	-
D'UVA, et al <sup>[28]</sup>	2015	NRG1/ERBB2	+
HAN, et al <sup>[44]</sup>	2015	Acute inflammation (IL-6, STAT 3, etc.)	+
KIMURA, et al <sup>[67]</sup>	2015	Hif-1 $\alpha$	+
YU, et al <sup>[31]</sup>	2016	GATA4	+
NAKADA, et al <sup>[65]</sup>	2016	O <sub>2</sub>	-
TAO, et al <sup>[68]</sup>	2016	Pitx2	+
XIAO, et al <sup>[26]</sup>	2017	p53	+
BASSAT, et al <sup>[60]</sup>	2017	Agrin	+
MOHAMED, et al <sup>[32]</sup>	2018	CDK1/CCNB/CDK4/CCND	+
ZHAO, et al <sup>[11]</sup>	2018	T <sub>reg</sub>	+
WANG, et al <sup>[45]</sup>	2018	LncRNA NR-045363	+
WANG, et al <sup>[33]</sup>	2018	Mydgd	+
PICCOLO, et al <sup>[37]</sup>	2014	Hippo pathway	-
PORRELLO, et al <sup>[38]</sup>	2018	Hippo pathway	-
LIU, et al <sup>[69]</sup>	2018	Hippo pathway	-
YUE, et al <sup>[34]</sup>	2019	PDGFR- $\beta$ /Ezh2	+
LI, et al <sup>[48]</sup>	2020	Macrophages	+
LI, et al <sup>[39]</sup>	2020	OSM	+
WU, et al <sup>[35]</sup>	2020	LRP6	-
SHEN, et al <sup>[36]</sup>	2020	IGF2	+
LI, et al <sup>[59]</sup>	2020	ECM	+
PEI, et al <sup>[70]</sup>	2020	H <sub>2</sub> S	+
CARDOSO, et al <sup>[71]</sup>	2020	Fatty acid $\beta$ oxidation	-

+: 表示对心肌再生具有促进作用; -: 表示对心肌再生具有抑制作用。

+: indicates the facilitation to myocardial regeneration; -: indicates the inhibition to myocardial regeneration.

蛋白1(neuregulin 1, NRG1)及其受体蛋白ERBB4的信号通路能够诱导已分化的心肌细胞重新进入细胞周期,从而促进新生小鼠心肌细胞增殖。在体外实验中, NRG1促进单核心肌细胞进行有丝分裂,以及诱导分化的心肌细胞从S期重新进入细胞周期,并完成胞质分裂。在体内, ERBB4是正常出生后心肌细胞增殖所必需的,激活NRG1/ERBB4信号可诱导已分化的心肌细胞进入分裂周期,并经历有丝分裂。连续12周给成年小鼠注射NRG1可诱导其体内心肌细胞周期活动,促进心肌再生,改善心肌梗死后的功能。D'UVA等<sup>[28]</sup>报道NRG1的另一个受体ERBB2也是心肌细胞增殖所必需的,激活后能够促进心肌细胞的肥大、去分化和增殖,有利于心肌梗死后的

心肌再生,该作用过程由位于ERBB2下游的ERK、AKT和GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin控制的信号网络介导。

MAHMOUD等<sup>[29]</sup>发现, Meis1在心脏中的表达从小鼠出生后第1天起就逐渐增加,并且其表达一直贯穿了整个成年期。Meis1是调节心肌细胞周期的关键调节因子,协同周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinases inhibitor, CDKI) P15、P16、P21的转录激活。Meis1的过表达会使心肌细胞的周期提前停止,其被敲除则能实现心肌细胞再生窗口的延长,甚至使成年个体心肌细胞重新开始有丝分裂。NGUYEN等<sup>[30]</sup>于2020年揭示了在出生后的心肌细胞中作为Meis1的辅助因子, Hoxb13直接与钙调神经磷酸酶相互作用,促进细胞周期阻滞。心肌

细胞特异性缺失Hoxb13可以激活心肌细胞重新进入周期,防止心肌梗死后收缩功能的减弱,能短暂激活心肌细胞的有丝分裂,但受损心脏并不能恢复正常功能;而Hoxb13和Meis1的同时缺失能够减缓受损心脏生理和病理性肥厚生长,强烈且持续地诱导心肌细胞有丝分裂。另外,钙调神经磷酸酶功能的获得和丧失对出生后心肌细胞的增殖和心脏再生也具有调节作用。

YU等<sup>[31]</sup>研究发现,GATA4作为一种心脏转录因子,可通过调节成纤维细胞生长因子16(fibroblast growth factor 16, FGF16)的表达来促进新生小鼠心脏再生<sup>[31]</sup>。研究者在新生小鼠心尖切除和冷冻损伤模型中特异性敲除GATA4,发现GATA4缺失会导致胞质分裂的心肌细胞数量减少,心脏在受损后无法修复,表现出肥大和纤维化。2018年,MOHAMED等<sup>[32]</sup>证实细胞周期蛋白依赖激酶1、细胞周期蛋白B1、细胞周期蛋白依赖激酶4和细胞周期蛋白D1(cyclin-dependent kinase 1/cyclin B1/cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1, CDK1/CCNB1/CDK4/CCND1)组合的过表达,可以将已退出细胞周期心肌细胞的增殖潜能重新激活。成年小鼠个体心肌细胞表达这4种因子后,其体内显示有15%~20%的心肌细胞分裂增殖,心功能明显改善。WANG等<sup>[33]</sup>报道在小鼠心尖切除后,髓源性生长因子(myeloid-derived growth factor, Mydgf)主要由内皮细胞而不是巨噬细胞所表达,其由Akt介导,通过激活c-Myc/FoxM1通路促进心肌细胞增殖,有利于新生和成年小鼠心脏损伤后心脏再生,而Mydgf的缺乏会使心肌细胞有丝分裂减弱和倍性增加。YUE等<sup>[34]</sup>发现,血小板衍生生长因子受体 $\beta$ (platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ , PDGFR- $\beta$ )信号在体内随着年龄的增加而减少,其通过PI3K/p-Akt途径控制心肌细胞中Ezh2的表达,进而促进心肌细胞的增殖。无论是对于新生个体或是PDGFR- $\beta$ 特异性激活的7天龄小鼠,Ezh2的条件性敲除都会阻断其心肌细胞增殖和心脏再生的过程,说明在PDGFR- $\beta$ 诱导心脏再生的过程中,Ezh2的参与是必要的。因此,PDGFR- $\beta$ /Ezh2通路对促进心肌细胞增殖和心脏再生也至关重要,为心脏修复提供了潜在的干预靶点。WU等<sup>[35]</sup>研究发现,在Wnt/ $\beta$ -catenin信号传导途径中起关键作用的低密度脂蛋白受体相关蛋白6(low-density lipoprotein receptor-related protein 6, LRP6)也可能参与了心肌细胞周期

的调控:当新生、幼年和成年小鼠缺乏LRP6时,其体内的心肌细胞周期活动显著增加;且心肌细胞的LRP6特异性缺失可以诱导MI后强烈的再生反应,具体表现为小鼠心脏的心肌梗死面积减小,左心室收缩功能也得到显著改善。SHEN等<sup>[36]</sup>发表文章证实,胰岛素生长因子2(insulin-like growth factor 2, IGF2)是影响1天龄小鼠心尖切除模型早期心肌细胞增殖的重要因素,IGF2缺失导致心尖切除后的1天龄小鼠体内心肌细胞几乎无法进入细胞周期。而轻度缺氧、mCAT表达和近交系A/J品系背景这3种情况都可以挽救缺失IGF2造成的心肌再生不足。

Hippo通路在组织内稳态和器官大小的调控中起着重要作用,抑制Hippo通路能够促进心肌细胞的增殖<sup>[7]</sup>。Hippo信号通路首先在果蝇中被发现,是哺乳动物心肌细胞增殖和心脏再生的关键调节因子。在哺乳动物中,Hippo通路包括核心激酶:哺乳动物STE20样蛋白激酶1和2(Mst1和Mst2)、肿瘤抑制因子1和2(LATS1和LATS2)激酶、支架蛋白Salvador同源物1(SAV1)以及MOB结构域激酶激活剂MOB1A和MOB1B。Yap/TAZ是Hippo信号级联的效应因子,也是癌症和再生医学中有吸引力的治疗靶点<sup>[37]</sup>,其未发生磷酸化时与转录因子TEAD1~4(TEA结构域家族成员1~4)结合,诱导细胞内增殖相关基因的表达<sup>[38]</sup>。抑制Hippo通路会导致Yap信号的激活,继而促进心肌细胞增殖和心肌再生<sup>[38]</sup>。近来,LI等<sup>[39]</sup>的研究提示,Yap也可能通过不依赖Hippo通路的方式,被gp130-Src通路直接激活参与心肌细胞增殖和心肌再生。

目前领域内一项比较重要的共识是单核二倍体心肌细胞相对于多核心肌细胞更加有利于心肌再生<sup>[9]</sup>。在小鼠出生后的前3天<sup>[40]</sup>,小鼠心脏的心肌细胞几乎都是单核二倍体细胞。4天龄以后,小鼠的心脏心肌细胞开始逐渐退出细胞周期,只有DNA复制,没有胞质分裂,即进行双核化和多核化<sup>[41]</sup>,这和小鼠心脏失去再生潜能的时间阶段相吻合<sup>[42]</sup>。到出生后11天以后,随着多核化的进一步进行,DNA合成占比继续减少,心肌细胞的数量基本不会再增加。成年斑马鱼一直具备心脏再生能力,可能与其体内心脏心肌细胞大多为单核二倍体有关<sup>[43]</sup>。综上,从目前对多种实验对象的研究中可以初步得出结论,单核二倍体心肌细胞占心脏中心肌细胞总数的比例大小与心脏受损之后心肌细胞增殖、心脏再生的能力强弱之间存在显著的相关性<sup>[36]</sup>。

### 3.2 炎症反应在心肌再生中的作用

HAN等<sup>[44]</sup>发现, 在小鼠心尖微量注射酵母多糖(zymosan A, ZA)能够促进炎症反应并诱导心肌细胞增殖, 而用地塞米松(dexamethasone, Dex)抑制免疫反应则会使心肌再生反应丢失, 证明了急性心肌炎症是新生小鼠心脏损伤后心脏再生反应的必要一环; 作者还发现促进炎症反应的细胞因子IL-6及其下游的转录激活因子STAT3(signal transducer and activator of transcription 3)可能是减少纤维化瘢痕形成和改善心脏功能的重要靶点<sup>[44]</sup>。WANG等<sup>[45]</sup>报道, 长链非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA) NR-045363能够激活JAK2-STAT3信号通路促进心肌细胞增殖和心肌再生, 其作用机制是: NR-045363对miR-216进行吸附, 进而阻断miR-216a对JAK2蛋白的表达抑制, 进一步证实了STAT3对于心肌再生的促进作用。赵文静等<sup>[11]</sup>发现, 心尖切除7天和14天后, 心尖处均会聚集大量调节性T(regulatory T, Treg)细胞。与假手术组相比, 实验组中Treg的特异转录因子Foxp3在心尖处的表达量显著增加。使用白喉毒素DT特异敲除小鼠体内的Treg细胞, 再进行心尖切除后, 检测到抑炎因子(如IL-10)表达下调, 而促炎因子(如IL-6)表达增加, 以至炎症加剧, 心肌未能成功再生<sup>[46]</sup>。以上结果说明, Treg细胞在心肌再生过程中具有负调节炎症反应的作用, 使炎症反应及时停止是实现心肌再生的必要环节。

AURORA等<sup>[47]</sup>将新生小鼠心肌梗死模型与单核细胞/巨噬细胞耗竭方法相结合, 发现巨噬细胞在小鼠心脏中能够促进血管生成, 该结果表明免疫系统成分, 特别是单核细胞/巨噬细胞, 在心脏再生中发挥重要作用。2020年LI等<sup>[48]</sup>从新生小鼠心脏中分离出巨噬细胞, 将其移植到成年小鼠MI损伤的部位, 之后观察到成年小鼠受损的心肌被显著修复, 心脏功能也得到改善, 该实验证明了巨噬细胞募集的炎症反应是新生小鼠受损心脏心肌再生的关键反应, 为改善心脏病患者的预后提供了潜在的干预思路。同年, LI等<sup>[39]</sup>于*Circulation*上发表文章, 揭示了炎症反应发生过程中, 巨噬细胞分泌的抑瘤素M(oncostatin M, OSM)是小鼠新生心脏再生过程中心肌细胞增殖的关键上游调节因子: OSM与其受体OSMR介导激活gp130, 而gp130作为OSM的共受体, 在心脏再生过程中通过Src激活Yap, 进而促进心肌细胞增殖。心肌细胞中OSMR和gp130的条件性敲除会使心肌细胞的

增殖水平降低, 导致新生小鼠心脏损伤后心肌的再生受到阻碍。实验证明, gp130是改善心脏损伤后心脏再生的潜在治疗靶点, 而gp130-Src-Yap信号通路能够诱导心肌细胞去分化和增殖, 这为急性炎症反应促进心肌再生修复提供了进一步机制解释。

### 3.3 非心肌细胞和胞外基质在新生小鼠心肌再生中的作用

近年来, 非心肌细胞在心肌再生中的作用逐步被揭示<sup>[49]</sup>: 心肌成纤维细胞不仅直接影响心肌细胞的功能和细胞增殖所必需的细胞外基质沉积的组成, 还能够一定条件下直接转化为心肌细胞; 心外膜细胞主要通过分泌一系列有效成分, 如生长因子受体等发挥作用, 对心脏发育、修复和再生也至关重要; 免疫细胞参与炎症反应可刺激新生小鼠心脏损伤后的再生反应。另外, 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)包含大量对细胞行为, 如生长、迁移、分化和增殖等至关重要的信号分子, 在心脏再生和修复中起着重要作用。

心外膜是一层位于心肌外面的光滑浆膜, 心外膜细胞是包裹心脏的一层间皮细胞。心外膜细胞可以通过分泌可溶性生长因子和受体, 如胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor receptor, IGF<sup>R</sup>)<sup>[50]</sup>、成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)<sup>[51]</sup>、血小板衍生生长因子受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)<sup>[52]</sup>和NRG1<sup>[53]</sup>等, 从而促进心肌细胞的增殖和新生血管的形成。SMART等<sup>[54]</sup>认为, 成年个体的心外膜细胞在受到刺激转变为间充质细胞后, 会迁移并分化为平滑肌细胞和内皮细胞, 促进损伤部位血管的形成, 从而有利于心肌细胞的存活, 发挥对心脏的保护作用。ZHOU等<sup>[55]</sup>的研究指出, 心外膜细胞可通过上皮细胞向间充质细胞转换(epithelial to mesenchymal transition, EMT)的过程成为心肌细胞的来源之一。他们利用遗传谱系示踪等方法追踪到了表达Wt1的心外膜细胞亚群在正常心脏发育过程中最终分化为心肌细胞, 确定了心脏中先前未被识别的潜在心肌祖细胞群, 提出了新的促进心脏再生和修复的路径<sup>[55]</sup>。LIU等<sup>[56]</sup>报道利用胸腺素beta 4(thymosin beta 4, Tβ4)维持心外膜细胞中*Wt1*基因的表达, 并保留EPDCs在新生小鼠中的迁移特征, 促进血管新生和心肌再生。

近年来的越来越多的证据表明, 心脏的细胞外

基质在心脏损伤后的再生和修复中起着重要作用。在蝾螈身上的实验表明, 心外膜中上调的特殊细胞外基质成分在心脏祖细胞的增殖和迁移过程中发挥重要作用<sup>[57]</sup>; 而斑马鱼实验证明, 由心外膜细胞合成和分泌的纤维连接蛋白在心脏受损部位的沉积促进了心肌修复<sup>[58]</sup>。细胞外基质重塑有利于心脏结构修复、功能适应和预防心室破裂。然而, 细胞外基质的过度沉积会导致广泛的心肌纤维化, 导致心功能受损<sup>[59]</sup>。

Agrin作为细胞外基质的组成部分, 其在7日龄小鼠心脏中表达量下调的趋势, 表达时间点与小鼠心脏再生潜能在一周内逐渐丧失相一致<sup>[60]</sup>。这一现象提示, Agrin与新生小鼠心脏完全再生密切联系<sup>[61]</sup>。BASSAT等<sup>[60]</sup>通过液相色谱-质谱分析等方法从1天龄小鼠细胞外基质中富集了包括Agrin在内的几种蛋白, 并发现: 敲除Agrin的新生小鼠心肌细胞会提前成熟, 心尖切除之后纤维化增加, 心功能减弱, 无法实现再生。体内注射Agrin可以使成年心梗小鼠模型的瘢痕面积减少, 心功能得到改善。他们还解释了Agrin促进心肌细胞增殖分裂的具体机制, 提出了Agrin-DGC-Yap轴模型: 在小鼠新生时期, Agrin通过Dag1(心肌细胞表达的Agrin的受体<sup>[62]</sup>)与DGC(dystrophin-glycoprotein complex)结合并降低其稳定性, 促进DGC的分解。DGC的作用包括参与微丝和质膜的锚定, 其分解会导致肌原纤维的分解, 诱导Yap等下游信号分子的激活。肌纤维分解退化, 使新生个体心肌细胞的成熟被延迟。另一方面, 如果Yap没有和DGC结合, 就可以转移到细胞核内, 促进心肌细胞重新进入细胞周期<sup>[60]</sup>。在此基础上, SARIG等<sup>[63]</sup>通过将Agrin注射到不同年龄小鼠心梗心脏的心肌壁上, 发现Agrin在损伤区域和心外膜中都能够诱导短暂的再生性衰老。p53-S23作为受损心脏中衰老细胞的标记, 其表达活性可被Agrin诱导增强。2020年, BAEHR等<sup>[62]</sup>在之前探究Agrin促进心梗小鼠心脏再生的基础上, 继续评估Agrin对心梗猪的心脏的治疗潜力。他们构建了猪的心脏缺血再灌注损伤模型, 通过冠状动脉内顺行注射rhAgrin(recombinant human Agrin)到心肌梗死区域。结果显示, Agrin给药能有效降低心肌梗死区及其边缘的纤维化面积及心肌细胞肥大, 且Agrin能够从多方面促进心肌再生, 包括促进血管新生<sup>[62]</sup>。他们的实验结果提示, rhAgrin对成年猪心梗后的心肌细胞

群具有保护作用, 甚至促进其增殖。近年来, Agrin已被证明是促进心肌细胞增殖的关键调节因子<sup>[7]</sup>, 进一步确认给药方案及评估其临床应用的价值将成为下一步研究方向。

### 3.4 能量代谢模式调控心肌再生

小鼠出生后, 心肌细胞的主要代谢途径从糖酵解代谢转变为氧化代谢, 线粒体NADH氧化酶活性从出生后第1天到第7天显著增加<sup>[20]</sup>, 这个过程中线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生增加, 损伤细胞内的蛋白质、脂类和DNA, 导致细胞周期停滞、凋亡或细胞衰老。ROS带来的氧化损伤是心肌细胞细胞周期停滞的重要驱动因素<sup>[7]</sup>。SADEK课题组<sup>[64]</sup>一直致力于探索有氧代谢在出生后心肌细胞周期停滞中发挥的作用。他们提出的一套系统性缺氧方法为研究环境缺氧对哺乳动物心脏再生的影响提供了借鉴。

PUENTE等<sup>[20]</sup>提出, 出生后主要代谢途径在适应富氧环境的过程中发生的转变是导致心肌细胞细胞周期停滞的上游信号。他们证实出生后低氧血症、清除ROS或抑制DNA损伤反应(DNA damage response, DDR)都延长了心肌细胞的出生后增殖窗, 而高氧血症和ROS产生则能够缩短增殖窗口。这一发现揭示了一种保护机制, 即出生后不久, 哺乳动物心脏的代谢转换成为氧化代谢, 显著提高了能量效率, 然而这是以牺牲心肌细胞增殖能力为代价的。随后, 该团队<sup>[65]</sup>进一步指出: 3个月大的成年小鼠暴露于低氧(7% O<sub>2</sub>)环境中2周, 并在2周内逐渐将吸入氧气(FiO<sub>2</sub>)的比例从20.9%(室内空气氧)每天减少1%直至达到7%, 于7%的氧气中再暴露2周。相关结果显示, 心肌细胞线粒体嵴密度和线粒体DNA拷贝数显著降低, 线粒体电子传递链活性显著降低。另外, 缺氧导致杆状心肌细胞数量显著增加, 且缺氧心肌细胞的BrdU掺入量比正常氧心肌细胞增加了8倍。在有丝分裂水平的评估上, 缺氧暴露小鼠心脏中有丝分裂标记物pH3阳性心肌细胞显著增加。以及缺氧也会诱导胞质分裂标志物Aurora B激酶在心肌细胞分裂沟中的定位显著增加。小鼠吸入氧逐渐减少引起的慢性严重低氧血症减少了心肌细胞中的ROS和DNA氧化损伤<sup>[66]</sup>。

SADEK课题组<sup>[67]</sup>利用Cre-loxP技术, 对缺氧应答因子Hif-1 $\alpha$ 的缺氧细胞进行标记, 证实Hif-1 $\alpha$ 的稳定和缺氧信号的维持有关。Hif-1 $\alpha$ 主要受翻译后修

饰的调节,是缺氧应激反应的主调节器。在常氧条件下,泛素-蛋白酶体介导的Hif-1 $\alpha$ 的ODD结构域中的两个脯氨酸残基被羟甲基化。Hif通过E3泛素-蛋白酶体依赖途径降解,而在缺氧条件下,ODD结构域不羟甲基化,Hif-1 $\alpha$ 稳定存在。他们发现,在出生后前5天进行间歇性缺氧(6% O<sub>2</sub>)处理后,缺氧的心肌细胞和非心肌细胞数量显著增加;在后续实验处理中,缺氧心肌细胞的氧化性DNA损伤水平较低,细胞内CDK/Cyclins水平上调,负性细胞周期调节因子如CDK抑制剂、细胞周期检查点基因和DNA损伤反应基因等,以及包括Meis1在内的Meis家族成员均出现了下调。

TAO等<sup>[68]</sup>发现在心肌细胞中,Pitx2(成对同源结构域转录因子2)的转录水平在出生后降低,而在损伤后显著升高。Pitx2与Hippo信号合作调节氧化还原相关基因<sup>[69]</sup>。Pitx2与Hippo效应器Yap结合,协同激活抗氧化基因的表达,即Pitx2招募Yap进而靶向应答氧化应激的基因,保护细胞免受ROS损伤,促进心肌保护和损伤后的再生。Pitx2、Nrf2和Yap对氧化应激反应的机制模型为:当氧化应激较低时,Nrf2通过组成降解复合物(Cul3,Keap1)被降解,不进入细胞核,而Pitx2停留在细胞质中或维持低表达水平。当氧化还原平衡受到ROS干扰时,Nrf2脱离降解复合物,结合细胞质Pitx2并将其穿梭到细胞核,进入细胞核上调细胞核Pitx2。当Pitx2在心肌细胞中过度表达时,足够数量的Pitx2招募低水平的Yap,以协同作用的方式诱导抗氧化基因的表达,保护细胞免受ROS损伤,促进心肌损伤后的再生,新生小鼠心肌细胞中的Pitx2或Nrf2基因的敲除会导致心肌再生能力丢失,表明了抗氧化应激反应对心肌细胞增殖乃至心脏再生的重要性。

PEI等<sup>[70]</sup>证实,H<sub>2</sub>S能够通过清除ROS促进心肌细胞进入周期,从而成为又一个心脏再生的有利因素。以PAG(H<sub>2</sub>S合成酶CSE抑制剂)阻断H<sub>2</sub>S合成,会使2天龄小鼠心肌梗死或心尖切除后的心肌细胞增殖减弱,ROS沉积;而NaHS作为H<sub>2</sub>S的供体则能够促进7天龄小鼠在心肌梗死后心肌细胞的增殖和ROS的清除,减轻ROS导致的心肌细胞损伤,进而促进心脏的再生修复。心肌线粒体脂肪酸 $\beta$ 氧化具有能量优势,但会产生大量活性氧,进而导致DNA损伤和心肌细胞周期阻滞的假设,CARDOSO等<sup>[71]</sup>用不含脂肪酸的牛奶喂养小鼠,可以延长其心脏的增殖窗,他们建立了心肌细胞特异性丙酮酸脱氢酶激酶

4(pyruvate dehydrogenase kinase 4, *Pdk4*)基因敲除小鼠模型,条件性PDK4缺失使丙酮酸脱氢酶活性增加,从而导致葡萄糖代谢相对于脂肪酸氧化水平的提高。PDK4的缺失导致DNA损伤减少,心肌细胞变小,增殖增强;心肌梗死后1周诱导PDK4的缺失,使得心肌细胞pH3和Aurora B激酶阳性率在心肌梗死后2周显著增加,并且左心室功能得到了改善。如上研究提示,抑制心肌细胞中脂肪酸的利用也可能是心脏再生疗法的一个可行的靶点。同年,AHMED和SADEK<sup>[72]</sup>共同评述了YE等<sup>[73]</sup>在病人身上所得出的结论,该研究采集法洛四联症患者心室的心肌组织,分为轻度、中度、重度缺氧的标本;发现中度缺氧(75%~85%)的心肌组织会减少线粒体氧化性DNA损伤,促进心肌细胞增殖。该研究同时也证明了缺氧、DNA损伤减少和人体内心肌细胞增殖之间的相关性<sup>[73]</sup>。

### 3.5 心脏干细胞的争议

MOLKENTIN课题组<sup>[74]</sup>于2014年发表在*Nature*上的一篇文章指出,他们检测到内源性c-Kit阳性细胞大量分化为心脏内皮细胞,而对于新的心肌细胞的贡献比例极低,意味着这类干细胞对于心肌再生的研究是没有意义的。SULTANA等<sup>[75]</sup>证明,c-Kit阳性细胞从胚胎期到成年期在心脏中广泛分布,且在急性心肌损伤后,c-Kit阳性细胞并不能转化成为肌源性祖细胞或心肌细胞。

LIU等<sup>[76]</sup>证明,c-Kit阳性细胞无论是在体内稳态或者损伤后对成年小鼠心脏心肌细胞的贡献都微乎其微,并指出Kit遗传谱系示踪过度估计了c-Kit细胞的作用,因为大多数长期标记的心肌细胞是已经存在的表达Kit的心肌细胞,而不是从CSCs中重新形成的心肌细胞。随后,HE等<sup>[77]</sup>利用Cre-loxP和Dre-rox双重重组酶系统提高遗传谱系追踪的精度,并提出了c-Kit<sup>+</sup>非心肌细胞在稳态和损伤后不会在出生后的心脏中分化为新的心肌细胞,与MOLKENTIN课题组的研究结论一致。KRETZSCHMAR等<sup>[78]</sup>通过单细胞测序和遗传谱系追踪技术构建了小鼠心脏增殖细胞及其后代的图谱,发现在心脏受到损伤时,在所有其他心脏细胞系中都存在细胞的增殖,这表明这些细胞系的维持通过细胞系内的细胞分裂来实现而不是依靠干细胞,他们也没有发现证据表明存在CSC群体发挥向心肌细胞分化的作用。2019年,SADEK课题组<sup>[79]</sup>报道,c-Kit阳性细胞在小鼠出生后

早期的心脏生长过程以及新生小鼠心尖切除后的心脏再生过程中, 都没有显著的贡献。同年HE等<sup>[80]</sup>使用新的谱系追踪策略标记Kit阳性心肌细胞和非心肌细胞获得结论: 心肌梗死后Kit阳性非心肌细胞对心肌细胞的增加没有贡献, 内源性Kit阳性细胞在成人心脏更新修复中没有发挥作用。

#### 4 新生小鼠心肌再生研究的机遇与挑战

迄今为止, 诸多研究已经揭示了一系列促进心肌细胞产生的关键因素, 推动了心肌再生研究领域的发展。如前所述, 目前在心肌再生研究领域主要有两种更新心肌的路径, 包括内源心肌细胞增殖和体细胞(主要为成纤维细胞)重新编程为新的心肌细胞。其中, 主流观点支持心脏再生是通过原本存在的心肌细胞自身增殖实现的<sup>[9,47]</sup>, 该方面的研究已经取得了较大进展, 多个相关的关键途径和机制已被揭示。

新生小鼠的心肌再生为开发新的心脏修复手段提供了思路, 具有重要的研究价值和借鉴意义。然而, 在人类利用新生小鼠心肌再生模型探索治疗心力衰竭最佳方案的过程中仍存在一些需要解决的难点。

首先从探究心肌再生的根源出发, 科学家们尚未明确是否存在特定的心肌细胞群体介导心肌再生的情况, 或是所有的心肌细胞都参与了再生反应<sup>[6]</sup>。目前研究来看, 单核心肌细胞比多核细胞更容易被诱导分裂, 且单核心肌细胞的比例存在物种差异。与大型哺乳动物相比, 啮齿动物单核心肌细胞的比例更低<sup>[47,81]</sup>。PORRELLO等<sup>[9]</sup>指出, 在受损部位附近出现的血凝块和炎症反应。但他们随后观察到, 增殖反应在受损1周后达到高峰, 不仅是尖端处, 整个心脏内都存在增殖反应被激活的情况<sup>[9]</sup>。以上实验现象说明新生小鼠心脏受损后可能会发生心肌细胞广泛去分化和增殖的现象。

其次, 从研究过程来讲, 心脏再生还包括了血管<sup>[47]</sup>、细胞外基质等的再生, 学者们尚不明确其他类型的细胞如免疫细胞、干细胞、成纤维细胞等是否也通过产生细胞因子或其他成分发挥重要作用。因此, 研究者在研究过程中不能仅限于研究心肌细胞的增殖, 或只局限于研究某一类分子、某一条通路。未来还需要把握各种细胞、信号分子、通路之间及它们与生理环境的相互作用关系, 多设计“鸡尾酒”实验并积极验证<sup>[8]</sup>。

另外, 确认在实验中观察到的现象是否是真正

的心肌再生仍然较为困难。一般来说, 实验者需要从组织学、解剖学和功能学等角度来进行多个指标参数的确认, 只有当实验结果满足大多数指标时, 才基本上可以确定该实验成功实现心肌再生。目前收集这些证据需要多种技术, 如采用共聚焦显微镜定位、免疫染色分离、心肌细胞特异性核标记、心肌细胞特异性遗传谱系追踪等进行严格判断<sup>[2,6]</sup>, 各类实验成本消耗较大。

在目前心血管疾病的治疗形势仍然非常严峻的情况下, 世界各地都亟需能够彻底改善心脏受损情况的治疗手段。要达到这一目的, 促进人类心肌实现自我修复、自我再生是根本手段。新生小鼠心肌再生现象及模型为成年哺乳动物心肌再生的实现及心力衰竭的治愈带来了希望, 具有重要的研究价值和借鉴意义。在研究者们的不懈努力下, 未来随着基础医学和生物再生医学的研究进展, 同时结合现代医学的研究途径, 找到最佳的治疗心力衰竭的策略终将成为可能。

#### 参考文献 (References)

- [1] BERGMANN O, BHARDWAJ R D, BERNARD S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Science*, 2009, 324(5923): 98-102.
- [2] HEALLEN T R, KADOW Z A, KIM J H, et al. Stimulating cardiogenesis as a treatment for heart failure [J]. *Circ Res*, 2019, 124(11): 1647-57.
- [3] EUGENE B. The war against heart failure: the Lancet lecture [J]. *Lancet*, 2014, 385(9970): 812-24.
- [4] 庞美俊, 朱小君, 熊敬维. 心肌细胞增殖与再生的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*(PANG M J, ZHU X J, XIONG J W. Research progress of cardiomyocyte proliferation and regeneration [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2019, 41(9): 1703-14.
- [5] GRAHAM E, BERGMANN O. Dating the heart: exploring cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Physiology*, 2017, 32(1): 33-41.
- [6] LAM N T, SADEK H A. Neonatal heart regeneration: comprehensive literature review [J]. *Circulation*, 2018, 138: 412-23.
- [7] CARDOSO A C, PEREIRA A H M, SADEK H A. Mechanisms of neonatal heart regeneration [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2020, 22(5): 33.
- [8] 王慷慨, 肖献忠. 心肌再生: 心肌细胞增殖与体细胞转分化[J]. *中国动脉硬化杂志*(WANG K K, XIAO X Z. Myocardial regeneration: cardiomyocyte proliferation and somatic transdifferentiation [J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*), 2017, 25(10): 973-7.
- [9] PORRELLO E, MAHMOUD A, SIMPSON E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-80.
- [10] POSS K D, WILSON L G, KEATING M T. Heart regeneration in zebrafish [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188-90.

- [11] 赵文静, 冯杰, 聂宇. 调节性T细胞参与调控新生小鼠心肌再生[J]. 中国循环杂志(ZHAO W J, FENG J, NIE Y. Regulatory T cells participate in the regulation of cardiac regeneration in neonatal mice [J]. Chinese Journal of Circulation), 2018, 34(11): 1211-20.
- [12] ANDERSEN DITTE C, GANESALINGAM S, JENSEN CHARLOTTE H, et al. Do neonatal mouse hearts regenerate following heart apex resection [J]? Stem Cell Rep, 2014, 2(4): 406-13.
- [13] SADEK H A, MARTIN J F, TAKEUCHI J K, et al. Multi-investigator letter on reproducibility of neonatal heart regeneration following apical resection [J]. Stem Cell Rep, 2014, 3(1): 1.
- [14] LI Y, FENG J, LI Y, et al. Achieving stable myocardial regeneration after apical resection in neonatal mice [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(11): 6500-4.
- [15] BRYANT D M, O'MEARA C C, HO N N, et al. A systematic analysis of neonatal mouse heart regeneration after apical resection [J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 79: 315-8.
- [16] STRUNGS E G, ONGSTAD E L, O'QUINN M P, et al. Cryoinjury models of the adult and neonatal mouse heart for studies of scarring and regeneration [J]. Methods Mol Biol, 2013, 1037: 343-53.
- [17] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family [J]. PNAS, 2012, 110(1): 187-92.
- [18] JESTY S A, STEFFEY M A, LEE F K, et al. C-kit<sup>+</sup> precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart [J]. PNAS, 2012, 109(33): 13380-5.
- [19] RUBIN N, DAREHZERESHKI A, BELLUSCI S, et al. FGF10 signaling enhances epicardial cell expansion during neonatal mouse heart repair [J]. J Cardiovasc Dis Diagn, 2013, 1(1): 101.
- [20] PUENTE B N, KIMURA W, MURALIDHAR S A, et al. The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response [J]. Cell, 2014, 157(3): 565-79.
- [21] IVANOVA A, SIGNORE M, CARO N, et al. *In vivo* genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A [J]. Genesis, 2005, 43(3): 129-35.
- [22] ZHANG Y, ZHONG J F, QIU H, et al. Epigenomic reprogramming of adult cardiomyocyte-derived cardiac progenitor cells [J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 17686.
- [23] QIAN L, HUANG Y, SPENCER C I, et al. *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes [J]. Nature, 2012, 485(7400): 593-8.
- [24] SENYO S E, STEINHAUSER M L, PIZZIMENTI C L, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes [J]. Nature, 2013, 493(7432): 433-6.
- [25] ALI S R, HIPPENMEYER S, SAADAT L V, et al. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice [J]. PNAS, 2014, 111(24): 8850-5.
- [26] XIAO Q, ZHANG G, WANG H, et al. A p53-based genetic tracing system to follow postnatal cardiomyocyte expansion in heart regeneration [J]. Development, 2017, 144(4): 580-9.
- [27] BERSELL K, ARAB S, HARING B, et al. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury [J]. Cell, 2009, 138(2): 257-70.
- [28] D'UVA G, AHARONOV A, LAURIOLA M, et al. ERBB2 triggers mammalian heart regeneration by promoting cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(5): 627-38.
- [29] MAHMOUD A I, KOCABAS F, MURALIDHAR S A, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. Nature, 2013, 497(7448): 249-53.
- [30] NGUYEN N, CANSECO D, XIAO F, et al. A calcineurin-Hoxb13 axis regulates growth mode of mammalian cardiomyocytes [J]. Nature, 2020, 582(7811): 271-6.
- [31] YU W, HUANG X, TIAN X, et al. GATA4 regulates Fgf16 to promote heart repair after injury [J]. Development, 2016, 143(6): 936-49.
- [32] MOHAMED T M A, ANG Y S, RADZINSKY E, et al. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration [J]. Cell, 2018, 173(1): 104-16.
- [33] WANG Y, LI Y, FENG J, et al. Myd8f promotes cardiomyocyte proliferation and neonatal heart regeneration [J]. Theranostics, 2020, 10(20): 9100-12.
- [34] YUE Z, CHEN J, LIAN H, et al. PDGFR- $\beta$  signaling regulates cardiomyocyte proliferation and myocardial regeneration [J]. Cell Rep, 2019, 28(4): 966-78.
- [35] WU Y H, ZHOU L P, LIU H Y, et al. LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. Cell Res, 2020, doi: 10.1038/s41422-020-00411-7.
- [36] SHEN H, GAN P, WANG K, et al. Mononuclear diploid cardiomyocytes support neonatal mouse heart regeneration in response to paracrine IGF2 signaling [J]. eLife, 2020, 9: e53071.
- [37] PICCOLO S, DUPONT S, CORDENONSI M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond [J]. Physiol Rev, 2014, 94(4): 1287-312.
- [38] PORRELLO E R, OLSON E N. A neonatal blueprint for cardiac regeneration [J]. Stem Cell Res, 2014, 13(3 Pt B): 556-70.
- [39] LI Y, FENG J, SONG S, et al. Gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. Circulation, 2020, 142(10): 967-82.
- [40] SOONPAA M H, KIM K K, PAJAK L, et al. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development [J]. Am J Physiol, 1996, 271(5): H2183-9.
- [41] ALKASS K, PANULA J, WESTMAN M, et al. No evidence for cardiomyocyte number expansion in preadolescent mice [J]. Cell, 2015, 163(4): 1026-36.
- [42] LI F, WANG X, CAPASSO J M, et al. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development [J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 28(8): 1737-46.
- [43] GONZÁLEZ-ROSA J M, SHARPE M, FIELD D, et al. Myocardial polyploidization creates a barrier to heart regeneration in zebrafish [J]. Dev Cell, 2018, 44(4): 433-46.
- [44] HAN C, NIE Y, LIAN H, et al. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart [J]. Cell Res, 2015, 25(10): 1137-51.
- [45] WANG J, CHEN X, SHEN D, et al. A long noncoding RNA NR\_045363 controls cardiomyocyte proliferation and cardiac repair [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 127: 105-14.
- [46] SERENA Z, VALENTINA M, SILVIA M, et al. Paracrine effect of regulatory T cells promotes cardiomyocyte proliferation during pregnancy and after myocardial infarction [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 2432.
- [47] AURORA A B, PORRELLO E R, TAN W, et al. Macrophages

- are required for neonatal heart regeneration [J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(3): 1382-92.
- [48] LI Y, LI H, PEI J, et al. Transplantation of murine neonatal cardiac macrophage improves adult cardiac repair [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(2): 492-4.
- [49] JIE F, YANDONG L, YU N. Non-cardiomyocytes in heart regeneration [J]. *Curr Drug Targets*, 2018, 19(9): 1077-86.
- [50] HUANG Y, HARRISON M R, OSORIO A, et al. Igf signaling is required for cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart development and regeneration [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67266.
- [51] LEPILINA A, COON A N, KIKUCHI K, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration [J]. *Cell*, 2006, 127(3): 607-19.
- [52] KIM J, WU Q, ZHANG Y, et al. PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(40): 17206-10.
- [53] REISCHAUER S, ARNAOUT R, RAMADASS R, et al. Actin binding GFP allows 4D *in vivo* imaging of myofilament dynamics in the zebrafish heart and the identification of Erbb2 signaling as a remodeling factor of myofibril architecture [J]. *Circ Res*, 2014, 115(10): 845-56.
- [54] SMART N, RISEBRO C A, MELVILLE A A D, et al. Thymosin  $\beta$ 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization [J]. *Nature*, 2007, 445(7124): 177-82.
- [55] ZHOU B, MA Q, RAJAGOPAL S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart [J]. *Nature*, 2008, 454(7200): 109-13.
- [56] LIU R, NIE Y, LIAN H, et al. Extending the time window of mammalian heart regeneration by thymosin beta 4 [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(12): 2417-24.
- [57] MERCER S E, ODELBERG S J, SIMON H G. A dynamic spatiotemporal extracellular matrix facilitates epicardial-mediated vertebrate heart regeneration [J]. *Dev Biol*, 2013, 382(2): 457-69.
- [58] WANG J, KARRA R, DICKSON A L, et al. Fibronectin is deposited by injury-activated epicardial cells and is necessary for zebrafish heart regeneration [J]. *Dev Biol*, 2013, 382(2): 427-35.
- [59] LI H, BAO M, NIE Y. Extracellular matrix-based biomaterials for cardiac regeneration and repair [J]. *Heart Fail Rev*, 2020, doi: 10.1007/s10741-020-09953-9.
- [60] BASSAT E, MUTLAK Y E, GENZELINAKH A, et al. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice [J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 179-84.
- [61] EROGLU E, CHIEN K R. Heart regeneration 4.0: matrix medicine [J]. *Dev Cell*, 2017, 42(1): 7-8.
- [62] BAEHR A, UMANSKY K B, BASSAT E, et al. Agrin promotes coordinated therapeutic processes leading to improved cardiac repair in pigs [J]. *Circulation*, 2020, 142(9): 868-81.
- [63] SARIG R, RIMMER R, BASSAT E, et al. Transient p53-mediated regenerative senescence in the injured heart [J]. *Circulation*, 2019, 139(21): 2491-4.
- [64] NAKADA Y, SADEK H. Experimental hypoxia as a model for cardiac regeneration in mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2158: 337-44.
- [65] NAKADA Y, CANSECO D, THET S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 222-7.
- [66] KIMURA W, NAKADA Y, SADEK H. Hypoxia-induced myocardial regeneration [J]. *J Appl Physiol*, 2017, 123(6): 1676-81.
- [67] KIMURA W, XIAO F, CANSECO D, et al. Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart [J]. *Nature*, 2015, 523(7559): 226-30.
- [68] TAO G, KAHR P C, MORIKAWA Y, et al. Pitx2 promotes heart repair by activating the antioxidant response after cardiac injury [J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 119-23.
- [69] LIU S, MARTIN J F. The regulation and function of the Hippo pathway in heart regeneration [J]. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2019, 8(1): e335.
- [70] PEI J, WANG F, PEI S, et al. Hydrogen sulfide promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration via ROS scavenging [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 1412696.
- [71] CARDOSO A, LAM N, SAVLA J, et al. Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell cycle progression [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(2): 167-78.
- [72] AHMED M, SADEK H. Hypoxia induces cardiomyocyte proliferation in humans [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2020, 5(5): 461-2.
- [73] YE L, QIU L, FENG B, et al. Role of blood oxygen saturation during post-natal human cardiomyocyte cell cycle activities [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2020, 5(5): 447-60.
- [74] BERLO J V, KANISICAK O, MAILLET M, et al. C-Kit<sup>+</sup> cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart [J]. *Nature*, 2014, 509(7500): 337-41.
- [75] SULTANA N, ZHANG L, YAN J, et al. Resident c-kit<sup>+</sup> cells in the heart are not cardiac stem cells [J]. *Nat Commun*, 2015, 6(1): 8701.
- [76] LIU Q, YANG R, HUANG X, et al. Genetic lineage tracing identifies *in situ* Kit-expressing cardiomyocytes [J]. *Cell Res*, 2016, 26(1): 119-30.
- [77] HE L, LI Y, LI Y, et al. Enhancing the precision of genetic lineage tracing using dual recombinases [J]. *Nat Med*, 2017, 23(12): 1488-98.
- [78] KRETZSCHMAR K, POST Y, BANNIER-HÉLAOUËT M, et al. Profiling proliferative cells and their progeny in damaged murine hearts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115(52): E12245-54.
- [79] ELHELALY W M, CARDOSO A C, PEREIRA A H M, et al. C-Kit cells do not significantly contribute to cardiomyogenesis during neonatal heart regeneration [J]. *Circulation*, 2019, 139(4): 559-61.
- [80] HE L, HAN M, ZHANG Z, et al. Reassessment of c-Kit<sup>+</sup> cells for cardiomyocyte contribution in adult heart [J]. *Circulation*, 2019, 140(2): 164-6.
- [81] SHAPIRO S D, RANJAN A K, KAWASE Y, et al. Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction through cytokinesis of adult cardiomyocytes [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(224): 224ra27.