



魏珂, 同济大学生命科学与技术学院教授, 附属东方医院再生医学研究所特聘研究员。于清华大学生物科学与技术系获得学士学位, 于美国加利福尼亚大学洛杉矶分校分子细胞综合生理专业获得博士学位。在美国桑福德伯纳姆普利贝司医学研究所进行博士后科学研究, 入选国家海外高层次人才青年项目及同济大学基础学科高水平领航人才计划, 主持并参与多项国家自然科学基金项目, 参与两项科技部重点研发项目。主要研究方向为心脏发育与再生, 发表SCI论文20余篇, 其中以第一作者及通讯作者身份在*Nature*、*Cardiovasc Res*、*Protein Cell*杂志上发表论文12篇。通过High Content Screen筛选发现了影响心肌细胞增殖的旁分泌分子、miRNA以及小分子抑制剂; 发现了心肌细胞成熟过程的新颖分子机制, 为开发创新性针对心肌细胞再生的药物提供了新的方向, 获得了两项美国专利授权。

心肌细胞的成熟及其转录调控

王皓存 欧阳兆惠 魏珂*

(上海市东方医院再生医学研究所, 同济大学生命科学与技术学院, 细胞干性与命运编辑前沿科学中心, 上海市信号转导与疾病研究重点实验室, 上海 200092)

摘要 哺乳动物心肌细胞在出生后经历了一系列巨大的转变, 由胚胎期的不成熟细胞转变为成熟心肌细胞。这些转变包括细胞形态、细胞周期、代谢模式、电生理等许多方面。心肌细胞的成熟过程决定了成年心肌细胞的状态和功能, 包括其微弱的再生能力。在多种先天性心脏病中, 这一过程都受到了影响, 诱发成年心脏疾病。因此, 解析出生后心肌细胞成熟这一发育生物学重要现象的具体转变过程, 以及调控这些转变的分子机制, 不仅可以鉴定心肌细胞失去增殖能力的机制, 也可能加深人们对先天性心脏病的理解, 从而找到促进心脏再生或者治疗先天性心脏病的药物靶点。心肌细胞在出生后的成熟由出生后的多种体内外环境的改变所诱导, 经过高度协同的转录程序通过基因表达的改变来实现。随着多种新工具的出现, 心肌细胞成熟的分子机制研究正在进入数据和理论层出不穷的崭新时代。该综述回顾了过去几十年里来对心肌细胞成熟多方面表型变化的探索, 着重总结了近年来对心肌细胞成熟的转录调控的研究成果, 并对未来可能的新发现和新理论进行了探讨。

关键词 心肌细胞; 成熟; SRF; PGC1 α ; Hif-1 α ; AP-1; calcineurin

Transcriptional Regulation of Cardiomyocyte Maturation

WANG Haocun, OUYANG Zhaohui, WEI Ke*

(Institute for Regenerative Medicine, Shanghai East Hospital, Shanghai Institute of Stem Cell Research and Clinical Translation, Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, Frontier Science Center for Stem Cell Research, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

收稿日期: 2022-06-26

接受日期: 2022-08-05

科技部重点研发项目(批准号: 2017YFA0105601)和国家自然科学基金(批准号: 32070823、92168205)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65981041, E-mail: keweitongji.edu.cn

Received: June 26, 2022

Accepted: August 5, 2022

This work was supported by the Key Research and Development Program, Ministry of Science and Technology of China (Grant No.2017YFA0105601) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32070823, 92168205)

*Corresponding author. Tel: +86-21-65981041, E-mail: keweitongji.edu.cn

Abstract Immature embryonic cardiomyocytes in mammals undergo a series of transformation after birth to become mature adult cardiomyocytes. The size and shape, cell cycle, metabolism, and electrophysiology of the cardiomyocytes all go through drastic changes during the maturation process, which determines the state and function of adult cardiomyocytes, and especially their limited regenerative capacity. And the maturation process is affected in multiple congenital heart diseases, predisposing the patients to adult heart conditions. Therefore, it is crucial to examine this important process in detail, and dissect the underlying molecular mechanisms, for better understanding the limited proliferative capacity of adult cardiomyocytes, and congenital heart diseases, as well as finding drug targets for treating heart diseases. The maturation process of cardiomyocytes is induced by multiple postnatal stimuli, and is regulated by a highly orchestrated transcriptional program. Currently, the research on the molecular mechanism of this process is entering a new era of massive new data and new theories, thanks to new technologies and new tools available. This review summarizes the explorations in the last few decades on the phenotypic changes during cardiomyocyte maturation, with an emphasis on the transcriptional regulation of the process, and discusses possible future discoveries and theories.

Keywords cardiomyocyte; maturation; SRF; PGC1 α ; Hif-1 α ; AP-1; calcineurin

心血管疾病一直是世界和中国人口健康的大问题之一^[1]。其中以心肌梗死为代表的缺血性心脏病死亡率高,预后差,这主要由成年人心肌细胞几乎没有增殖能力所致^[2],没有可分化为心肌的干细胞^[2],受损的心肌会被纤维化瘢痕组织所取代,多数心肌梗死患者最终会发展为进行性心力衰竭^[2]。除了心脏移植外,现阶段心肌梗死缺少治愈方法,且治疗需花费大量社会医疗成本。因此,理解成熟心肌细胞无法增殖与再生能力的分子机制,寻找促进心肌细胞增殖、增强心梗后心脏再生的治疗手段,也成为社会发展尤其是社会老年化过程中迫切需要解决的关键问题。

虽然成年哺乳动物的心肌细胞大部分缺乏增殖能力^[2],但是新生哺乳动物的心肌细胞在出生后短暂的时间内(小鼠为一周以内)仍具有增殖能力,其增殖能力伴随着心肌细胞的成熟而迅速消失^[3]。而许多低等脊椎动物比如斑马鱼、蝾螈等在成年阶段依然保留有心肌细胞的增殖和心脏的再生能力^[4-5]。这些差异表明,成年哺乳动物心肌细胞在进化和个体发育过程中失去了增殖的能力,而哺乳动物心肌细胞在出生后的成熟过程被认为是阐明该现象具体分子机制的关键^[6]。

此外,人类多能干细胞来源的心肌细胞(hPSC-CMs)可以被用于人类心脏疾病的体外疾病模型,以及可作为外源心肌细胞治疗心脏疾病^[6]。但在体外获得的hPSC-CMs表型类似胚胎心肌细胞,成熟程度与出生后或成年心肌细胞相差甚远^[6]。其在非人灵

长类心脏中的移植会由于其不成熟的电生理特征导致心率不齐^[7]。阐明哺乳动物出生后心肌细胞成熟的机制,也可以帮助我们在体外获得成熟的hPSC-CMs以更好地模拟成年心脏疾病,以及用于细胞治疗。

近年来的研究使得我们对出生后心肌细胞成熟过程的理解逐渐深入。心肌细胞在多层面的成熟表型变化及其相应的分子调控机制被越来越清晰地阐明^[6]。这些研究将帮助我们鉴定调控心肌细胞成熟的重要分子和通路,开发治疗先天性心脏病和促进成年心脏再生的创新性药物以及治疗手段。本文将介绍出生后哺乳动物体内心肌细胞成熟的过程为主,介绍心肌细胞成熟的表型特征,以及其主要调控通路和转录程序。

1 心肌细胞成熟的表型特征

哺乳动物心肌细胞在出生后的成熟是一个复杂的过程。细胞在短时间内发生了多个方面的广泛变化,包括肌节结构的组织完善和细胞肥大性生长,代谢底物由葡萄糖转为脂肪酸,钙储存和钙瞬变的增强,兴奋收缩耦联的效率提高和区块化,以及退出细胞周期、多核化等^[8]。本节将就心肌细胞成熟的不同表型展开介绍。

1.1 形态学变化

小鼠等哺乳动物胚胎心脏的生长主要通过心肌细胞增殖来实现,而在出生后逐渐转变为肥大性生长从而增加心脏体积^[9]。心肌细胞成熟过程中形

状从圆形或棒状变为细长的各向异性的形状, 与相邻心肌细胞通过闰盘紧密相连。肌节结构从较无规律到高度有组织, 肌节的整体长度增加, 占据心肌细胞绝大部分细胞质^[10]。

横管或称T小管(T-tubules), 是沿肌节Z线区域的膜内陷形成的结构。T小管使成年心肌细胞可产生快速的电兴奋, 启动和同步触发肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)钙释放, 协调整个细胞质收缩。小鼠的胚胎心肌细胞缺乏T小管, 在出生后心肌细胞肌膜下区域逐渐出现T小管样亚细胞结构, 而T小管系统完全发育并表现为成年心肌细胞的模式需要大约一个月的时间^[11]。

1.2 代谢底物与线粒体变化

代谢底物的变化是心肌成熟和心脏发育成熟的关键组成部分。心脏发育早期, 糖酵解途径是代谢产能的主要来源。随着心肌细胞成熟和最终分化, 线粒体氧化能力增加, 脂肪酸 β -氧化途径成为主要的能量来源, 产生了约80%的总能量^[8]。

随着代谢模式的转换, 心肌细胞成熟过程中线粒体的形态也发生了巨大的变化。胚胎心肌细胞中线粒体以网络状分布在整个细胞质中, 仅占细胞体积的一小部分^[12]。此时线粒体数量少且体积小, 形状呈圆形, 没有完整的嵴, 细胞主要通过糖酵解产能。随着心肌成熟, 线粒体最终呈椭圆形, 并在大小和数量上均显著增加, 约占成熟心肌细胞细胞体积的30%^[13]。线粒体在肌原纤维和肌膜下整齐排列, 可以高效地为心肌细胞的肌节收缩以及质膜和肌浆网膜上的离子泵提供ATP^[14]。

1.3 电生理和钙处理特征

心肌细胞由动作电位引发收缩的兴奋收缩耦联机制在成熟心肌细胞中具有极高的效率, 需要细胞膜和肌浆网膜上的不同种类离子通道以及离子泵高度协调工作。胚胎早期不成熟心肌细胞由于存在HCN4离子通道的表达, 仍具有自主节律, 而在发育晚期HCN4局限于窦房结细胞表达控制心脏节律, 而成熟心肌细胞不再表达HCN4, 其收缩受窦房结起始的电信号控制^[15]。由于离子通道表达量的变化和亚型转变, 成熟心肌细胞与胚胎时期不成熟心肌细胞相比, 动作电位的各项指标均有显著不同, 成熟心肌细胞具有较低的静息膜电位、较快的去极化速度、去极化后存在的持续时间较长的平台期^[15-16]。介导心肌细胞中动作电位与肌节收缩的钙离子浓度的瞬

时变化(钙瞬变)^[6], 在成熟细胞中也更加快速高效, 即成熟心肌细胞具有更强的钙处理能力, 体现为肌浆网中更高的钙储存, 由T小管结构介导的高效钙诱导钙释放, 以及更加迅速且可调控的由SERCA2钙泵介导的钙回收^[6]。

1.4 细胞周期和倍性变化

对小鼠和人类等哺乳动物的研究表明, 胚胎和出生后早期的心肌细胞仍具有分裂能力, 但在成熟过程中经历了多倍体化, 成年心肌细胞中以退出细胞周期的双核和多核细胞为主, 具备增殖能力的单核双倍体细胞比例极少^[17-18]。心肌细胞可能通过多种方式变成多倍体。例如细胞进行核分裂但不进行胞质分裂产生多核多倍体; 在S期复制其DNA但不进行核分裂的核内复制过程也可形成单核多倍体细胞^[19]。成年小鼠心肌细胞双核比例较高, 而成年人类心肌细胞核的倍性在正常心脏中可达到8N, 在高负荷心脏中更高, 可高达64N^[20]。

越来越多研究显示, 心肌细胞的多倍体与再生潜力呈负相关。与小鼠心肌多倍体化相反的是, 斑马鱼心脏终生再生, 其几乎只包含单核二倍体心肌细胞^[21]; 若诱导这些心肌细胞多倍体化和双核化会损害其再生能力^[22], 并且啮齿动物心脏中单核二倍体心肌细胞比例与损伤后心脏功能修复呈正相关^[18]。

1.5 蛋白和基因的亚型转换

在心肌细胞成熟过程中, 部分肌节结构蛋白和代谢相关蛋白会发生亚型转换, 以适应成年心肌细胞的收缩功能和代谢水平^[17]。

心肌细胞肌节中核心的肌球蛋白和肌动蛋白在成熟过程中均发生了显著的转换。肌球蛋白重链在小鼠中由 β MHC(*Myh7*基因编码)转变为 α MHC(*Myh6*基因编码), 而在人心室心肌细胞中则转变为 β MHC始终高表达, 而 α MHC在成熟过程中表达水平下降^[11,23]; 肌球蛋白轻链则在心室肌细胞成熟过程中由与心房肌细胞共表达的Mlc2a(由*Myl7*基因编码)转变为Mlc2v(由*Myl2*基因编码); 肌动蛋白的心肌细胞亚型 α -cardiac-actin(由*Acta1*基因编码)虽然一直是心肌细胞中主要的亚型, 但在胚胎心肌细胞中高表达的 α -smooth muscle-actin(由*Acta2*基因编码)在成熟过程中会逐渐消失^[24]。而在肌节中起调控作用的蛋白也有相应的亚型转变。如肌联蛋白Titin由N2BA亚型转变为N2B亚型^[8,25]; 肌钙蛋白中的抑制性肌钙蛋白由胚胎期的ssTnI(*Tnni1*基因编码)逐渐变为成熟的

cTnI(*Tnni3*基因编码)^[26], 而其他肌钙蛋白TnC和TnT, 以及原肌凝蛋白Tropomyosin的不同亚型比例在成熟过程中也有特定的变化^[24]。

代谢基因方面, 脂肪酸结合蛋白Fabp3在出生后表达水平逐渐下降, Fabp4表达水平逐渐升高^[27], 而代谢长链脂肪酸的乙酰辅酶A合成酶Acsl1在出生后逐渐上升^[28]。在线粒体成熟过程中, 胚胎期高表达的己糖激酶1(HK1)也在出生后转换为己糖激酶2(HK2)^[29]。编码电子传递链蛋白Cox8b在胚胎心肌细胞中高表达, 而在出生后则被成年的Cox8a亚型取代^[27]。

值得一提的是, 一些胚胎时期的基因亚型会在成年心脏疾病状态下被重新激活, 这些基因亚型也成为部分心脏疾病的标志物^[17]。

2 心肌细胞成熟的转录调控

围产期的各种体内外环境的变化, 包括氧浓度的升高、甲状腺素水平的提高、代谢底物的转变和心脏压力负荷的提高, 被认为是导致出生后心肌细胞成熟的诱导因素^[21,30-32]。近年来连接这些环境信号和心肌细胞各方面表型趋向成熟转变的关键转录因子和转录程序也逐渐被发现和阐明, 但是这些信号和转录程序以及表型变化之间的具体关联, 以及各类表型之间是否存在因果关系尚未被完全阐明。可以确定的是, 心肌细胞成熟过程中多种表型的改变具有很高的协同性。心肌细胞成熟的主要标志, 肌节、线粒体、横管等, 并不是互相独立的, 某些表型的改变会导致其他表型的同步改变, 相关基因表达也发生共同的变化。这表明, 心肌细胞成熟过程的转录事件是被高度协同调控的。本章节将总结近期研究发现的调控心肌细胞成熟的转录程序。

2.1 细胞骨架与血清响应因子SRF及相关转录调控因子

编码肌节结构蛋白的基因的大量表达是心肌细胞形态成熟和功能成熟的必要条件, 而在心肌细胞成熟过程中, 血清响应因子(serum response factor, SRF)^[33]被认为是控制编码肌节结构蛋白基因表达的关键转录因子。SRF是MADS家族的转录因子, 可以与启动子上的*CArG* Box元件结合, 促进基因表达^[34]。而SRF的转录活性的调控主要由其共激活因子Myocardin家族转录调控蛋白(MYOCD、MRTFA、MRTFB)来实现^[34]。MRTF家族成员在细胞质中

与肌动蛋白单体G-Actin结合, 在细胞骨架形成过程中, G-Actin聚合成F-Actin, MRTF被释放, 转移入核, 与SRF结合, 促进基因表达^[34]。因此, MRTF-SRF信号轴可以将机械力信号转导到细胞核内调控基因转录。而在心肌细胞中, 肌节蛋白基因*Actn2*的缺陷被发现是通过MRTF-SRF信号轴影响心肌细胞的整体成熟的^[35], 表明MRTF-SRF可能介导了机械力信号对心肌细胞成熟的促进。

*Srf*敲除导致胚胎早期致死^[36], 而在心脏发育过程中敲除*Srf*导致心肌细胞发育不全, 亦可导致胚胎致死^[37]。一系列编码肌节蛋白的基因启动子上发现有*CArG* Box元件, 其在*Srf*敲除后表达下降或消失, 导致心肌细胞肌小节发育不全^[38]。这些研究虽然表明了SRF对心肌细胞发育的重要性, 但是无法阐明其在心肌细胞成熟过程中的功能及分子调控机制。最近的一个研究工作在出生后的心脏中通过CASA AV系统在部分心肌细胞中条件性敲除与心脏发育相关的多个转录因子, 发现敲除*Srf*对心肌细胞成熟影响最大^[33], 不仅导致了肌节结构蛋白表达紊乱, 肌节发育不良, T小管生成不全, 也导致了脂肪酸代谢、线粒体生成、氧化磷酸化, 以及电生理和钙调控相关基因的全面下调^[33]。而在心肌细胞成熟阶段, SRF主要结合肌节结构相关基因的启动子并激活其表达^[33]。因此, 代谢和电生理表型可能至少部分依赖于SRF控制的肌节成熟。

心肌细胞特异性*Myocd*敲除可导致晚发性致死性心肌病^[39], 而心肌细胞特异性*MRTFA*和*MRTFB*双敲除小鼠在出生一个月内致死^[40], 但*Srf*的心脏敲除导致胚胎致死, 表型比其共激活因子敲除更严重^[37], 提示SRF和这三个共激活因子在心脏成熟过程中存在协同作用, 但SRF是最为关键的转录因子。在心肌细胞成熟过程中, 这一信号轴介导了机械力信号对心肌细胞成熟过程中转录的调控, 如心肌细胞的机械拉伸和胞外基质的硬度弹性等。

2.2 脂肪酸与PGC1 α 及核受体

心肌细胞在出生后生成大量线粒体, 并由糖酵解转为脂肪酸氧化代谢, 以满足迅速增加的能量需求^[6]。而最近的研究也发现, 线粒体能量代谢方式的转变对心肌细胞退出细胞周期是至关重要的^[31]。调控线粒体新生以及脂肪酸氧化的重要转录共激活因子是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ

coactivator-1 α , PGC1 α)及PGC1 β ^[41-42], 两者的功能有一定冗余, 但PGC1 α 一般被认为更重要^[43]。运动可以通过肾上腺素/cAMP通路激活PGC1 α ^[44], 使后者在出生后的心肌细胞中大量表达^[41]。它通过与多种核受体包括过氧化物酶体增殖物活化受体PPARs及雌激素相关受体ERRs相互作用, 激活多种脂肪酸氧化、线粒体生成相关基因表达^[43,45-46]。PPAR家族中的PPAR α 和PPAR δ 也在出生后的心肌细胞中大量表达^[42,47], 被认为直接调控了心肌细胞出生后的代谢转变。过表达PPAR α 不仅促进脂肪酸氧化, 也下调糖酵解, 而在心肌细胞中条件性敲除PPAR α 则会导致线粒体氧化磷酸化水平下降^[45,48-49]。PPARs的配体是脂肪酸代谢物^[45], 因此PPARs可能介导了脂肪酸对心肌细胞成熟的影响。ERRs也可以激活脂肪酸氧化、三羧酸循环、电子传递链以及ATP合成等代谢相关基因的表达^[46,50], 但它们是孤儿受体, 其配体仍未被确认。ERR γ 敲除小鼠在出生后第一周就因为严重线粒体缺陷而死亡^[51], 而ERR α 敲除小鼠的心脏在压力过载后收缩功能下降的心衰表型更加严重^[52], AAV9-Cre介导的新生小鼠心肌细胞中ERR α 和ERR γ 的部分敲除导致线粒体成熟受阻, 而在胚胎期的部分敲除则导致心肌细胞成熟的全面受阻和围产期死亡^[53], 表明不同ERRs可能都对线粒体代谢有冗余的功能, 而其中ERR γ 对出生后心肌细胞线粒成熟可能是至关重要的。在hPSC-CMs中的ChIP-Seq实验表明, ERR α 和ERR γ 不仅可以激活能量代谢成熟相关基因表达, 也可以促进部分肌节和离子通道基因的表达, 而且作为转录抑制因子, ERR α 和ERR γ 可以抑制胚胎心肌细胞特异性基因和成纤维化基因的表达^[53], 是控制心肌细胞成熟的核心转录因子。

除PPARs和ERRs外, 其他核受体, 如甲状腺素受体(thyroid hormone Receptor, TR)^[54]和糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)^[55]也介导了甲状腺素和糖皮质激素对心肌细胞成熟的诱导, 而它们对心肌细胞代谢基因的激活也都需要PGC1 α ^[55-56]。因此, PGC1 α 是整合核受体在心肌细胞中响应其配体, 调控代谢功能的关键转录辅助因子。

2.3 氧气、活性氧与Hif-1 α 及NRF

在胚胎时期低氧环境中, 转录因子低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , Hif-1 α)在心肌细胞中稳定存在, 维持心肌细胞增殖^[57]。而在新生期的高氧环境中, Hif-1 α 被氧依赖性泛素蛋白酶降解

途径所降解, 其活性在出生后迅速下降^[57-58]。而在出生后维持低氧环境, 稳定Hif-1 α 可以抑制心肌细胞退出细胞周期, 促进其增殖^[58]。出生后Hif-1 α 的降解对心肌细胞线粒体的成熟也非常重要。在持续激活Hif-1 α 信号活性的小鼠模型中, 心肌细胞线粒体在出生后仍维持不成熟的状态^[59]。而在心梗后的成年小鼠中激活Hif-1 α 活性则诱导了心肌细胞重新进入细胞周期^[58], 这一发现将心肌细胞的增殖表型与线粒体能量代谢直接联系起来。

当出生后心肌细胞的环境氧气浓度升高, 线粒体开始产生大量ATP的同时, 它们也会同时产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS被认为激活了ATM蛋白介导的DNA损伤修复途径, 继而激活G₂-M细胞周期检查点, 导致心肌细胞退出细胞周期^[30], 而清除ROS可以促进出生后心肌细胞的增殖^[30]。正常的成年心肌细胞通过一系列氧化还原酶对升高的ROS浓度进行代偿。转录因子Nrf2在无应激条件下会被迅速地泛素化, 并由蛋白酶体降解途径所降解^[60], 但当细胞中ROS浓度升高时, Nrf2会稳定化, 并入核与小Maf蛋白形成二聚体^[61], 这些二聚体结合增强子上的抗氧化反应元件(antioxidant response elements, AREs), 激活了一系列抗氧化酶基因如*Gsta1*和*HO-1*的表达^[62]。Nrf2也会激活转录因子其同家族成员Nrf1的表达, 而Nrf1与其共激活因子PGC1 α 结合, 在心肌细胞发育成熟和氧化应激条件下促进线粒体生成相关基因的表达^[60]。最近的单细胞转录组测序工作发现, Nrf1对新生小鼠心肌细胞的增殖是必需的^[63], 而其对心肌细胞增殖的促进可能是通过对蛋白降解和抗氧化基因的激活来实现的^[64]。Nrf1对线粒体生成和心肌细胞增殖均有促进作用, 但在心肌细胞成熟过程中线粒体生成与心肌细胞退出细胞周期是同时发生的, 因此氧化还原状态和Nrf1在心肌细胞成熟中作用机制及其调控仍需要进一步研究, 以解释这一矛盾。

2.4 激活蛋白-1(activating protein-1, AP-1)

AP-1转录因子是一类参与多种细胞过程调控的二聚体转录复合物, 它们的转录活性几乎参与所有细胞功能和生理活动, 在细胞增殖、凋亡、衰老、分化、迁移、炎症等过程中均是至关重要的^[65]。AP-1二聚体是由Fos、Jun、ATF以及MAF家族转录因子单体相互结合组成的转录因子超家族^[65]。

最近的两个独立的工作通过单细胞测序技术,

发现AP-1家族成员在新生小鼠和大鼠的心肌细胞成熟过程中均出现短暂高表达^[66-67], 并发现其抑制或敲低导致心肌细胞成熟受损^[66-67]。虽然AP-1在斑马鱼心肌细胞中被发现可以通过改变染色质可及性促进细胞去分化, 从而介导心肌细胞的损伤响应^[68], 但在哺乳动物心肌细胞成熟过程中AP-1则被发现可能通过直接促进脂肪酸氧化基因的表达、线粒体代谢的成熟从而促进心肌细胞在双核化、电生理等多方面的成熟^[66]。

与PGC1/PPAR α 响应肾上腺素信号^[44]和脂肪酸及其代谢物^[45]类似, AP-1可以被多种上游信号所激活。压力过载和肾上腺素刺激可以刺激心肌细胞中Fos和Jun的表达^[69-70], 脂肪酸则可以激活心肌细胞中的Atf3的表达^[71], 而压力负荷、肾上腺素和脂肪酸水平都在哺乳动物出生后升高^[66,72], 因此AP-1可能是整合了出生后环境中的多种变化对心肌细胞成熟的促进作用。

2.5 钙离子、calcineurin及下游转录因子

Calcineurin是钙离子依赖的磷酸酶, 通过去磷酸化激活活化T细胞核因子NFAT, 从而启动下游基因表达^[73]。抑制calcineurin被发现可以抑制心肌细胞肥大性生长, 而过表达NFAT则可以促进心肌细胞肥大^[74]。NFAT家族成员包括NFATc1~4和NFAT5^[73], 根据其表达特征在包括免疫细胞和血管内皮细胞在内的不同细胞中均有重要功能^[75]。其中NFATc3的敲除导致心肌细胞出生后肥大性生长缺陷^[76], 而多个

编码肌节结构蛋白的基因是NFAT的直接靶点^[77], 表明其对心肌细胞的形态学成熟是必需的。

转录因子Meis1被发现在出生后心肌细胞中表达水平升高, 通过促进细胞周期抑制基因的表达, 促进了心肌细胞退出细胞周期^[78], 在心肌细胞中敲除Meis1可以延长出生后心肌细胞增殖的时间窗口^[78]。而最近的研究发现, 除了可以激活NFAT外, calcineurin在出生后的心肌细胞中还可以对Hoxb13去磷酸化, 导致后者入核, 与Meis1转录因子共同激活细胞周期抑制因子, 致使细胞退出细胞周期, 转而进行肥大性生长^[79]。因此, 响应心肌细胞中钙离子浓度的calcineurin可以通过激活不同转录因子NFAT和Hoxb13, 导致心肌细胞在肥大性生长和细胞周期两个方面的成熟。

图1总结了由机械力、钙离子、氧气、活性氧、脂肪酸和激素等因素引起的调控心肌细胞成熟的转录程序。

2.6 心肌细胞成熟中的其他转录调控机制

包括前文介绍的SRF在内, 一系列在心肌细胞分化和心脏胚胎发育中起到重要作用的转录因子, 在出生后仍有表达, 其中的一些也对心肌细胞成熟必不可少。比如, 对心脏早期发育很重要的转录调控因子HOPX^[80-81]可以促进心肌细胞的成熟^[82]。在心肌细胞中过表达HOPX导致进行性心肌肥大^[83], Hopx敲除则导致部分胚胎致死表型^[80-81], 而存活到出生后的小鼠心肌细胞由于细胞周期退出的缺陷而过

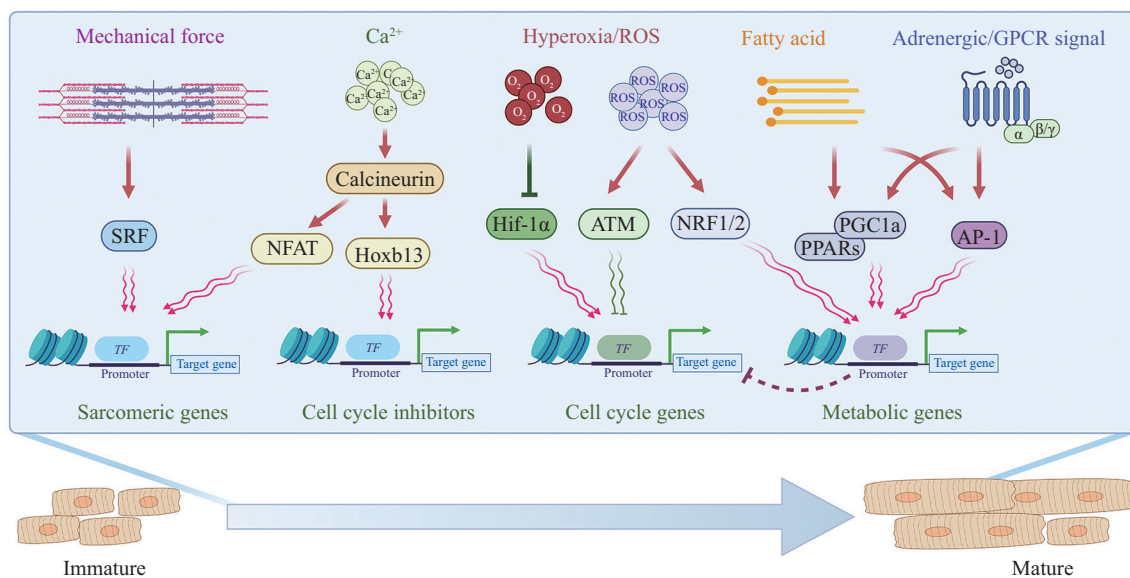


图1 介导环境因素调控心肌细胞成熟的转录程序

Fig.1 Transcription programs mediating cardiomyocyte maturation induced by environmental stimuli

度增殖^[81]。但在胚胎心脏发育过程中, HOPX被认为抑制了SRF的转录活性^[80-81], 因此其在心肌细胞成熟阶段的作用机制可能与在胚胎中不同。此外, GATA家族转录因子在发育过程中调控多种细胞的命运决定, 其中GATA4、GATA6是在心肌细胞中表达的主要GATA转录因子^[84], 而它们对新生心肌细胞的成熟是必需的^[84-85]。在心肌细胞成熟过程中, 通过CASA系统条件性敲除*Gata4*和*Gata6*基因均导致不成熟表型的维持^[84-85], 而在所有心肌细胞中对*Gata4*和*Gata6*的敲除则导致进行性心衰^[84]。有趣的是, 与Nrf1类似^[60,64], GATA4对新生小鼠心肌细胞增殖与再生也是必需的^[86], 表明在出生后心肌细胞成熟过程中, 成熟与增殖表型不一定是互斥的。

最近十年来, 表观遗传对细胞命运及表型的影响越来越被重视, 表观遗传修饰, 如DNA甲基化和组蛋白修饰, 对转录调控有深刻的影响。DNA高甲基化与心肌细胞成熟过程中胚胎基因的沉默相关, 而DNA去甲基化则导致成熟相关基因表达的激活^[87-89]。激活性的组蛋白修饰如H3K27ac、H3K4me1、H3K4me3、H3K9ac等与成熟过程中的基因表达相关^[88,90], 而抑制性的组蛋白修饰如H3K27me3和H3K9me2则在发育和成熟过程中在被沉默的基因上维持或积累^[88,90-93]。染色质结构的改变也与心肌细胞成熟过程中的转录变化相关。比较新生和成年的小鼠心脏ATAC-Seq结果发现, 在心肌细胞成熟过程中被沉默的基因, 如细胞周期基因等, 其染色质可及性在成熟过程中下降, 而代谢和肌肉收缩相关基因的位点则变得更为开放^[94]。而对染色质结构至关重要的CTCF突变则会导致在胚胎心肌细胞中成熟基因的过早激活^[95]。限于篇幅, 本文只详细介绍了转录因子介导的心肌细胞成熟, 关于表观遗传在心肌细胞发育与成熟中的功能, 在其他综述中有更加深入和完善的回顾和展望^[96]。

3 讨论与展望

越来越多的调控心肌细胞成熟的分子机制在近年来被发现, 越来越多的证据也表明心肌细胞成熟的不同表型之间是存在依赖性的。比如对代谢成熟的影响会导致心肌细胞退出细胞周期受损^[31,66], 钙信号的改变也调控了心肌细胞增殖表型^[79], 而细胞肌节的成熟则影响包括代谢、电生理在内的多种成熟表型^[33]。在这些研究中, 细胞骨架与代谢往往

是细胞增殖的上游决定因素, 表明在转录层面可能是肌节和线粒体的成熟调控了细胞增殖相关基因的表达, 而增殖表型的改变是结果而不是原因。我们可能不会发现哪一个方面的成熟是整体成熟最上游的启动因素, 因为出生后心肌细胞的体内外环境改变是多样的。氧气浓度、血液脂肪酸水平、肾上腺素水平以及机械力信号强度的升高都各有其下游信号通路和相应转录因子分别调控部分成熟相关基因的表达, 而这些刺激也都成功地被应用于促进人类干细胞来源的心肌细胞的体外成熟^[6]。

由于篇幅原因, 本文主要以啮齿类动物的心肌细胞出生后成熟为例, 介绍了心肌细胞的成熟过程。但是在不同哺乳动物之间, 心肌细胞成熟的某些特征具有明显的差异。比如小鼠心率由胚胎早期的低于200 bpm, 上升到出生后的300~800 bpm^[97], 而人类心率则由出生前的高于100 bpm下降到出生后的低于100 bpm^[98]。种属之间对成年动物心脏收缩功能需要的不同, 可能导致了心肌细胞离子通道和肌节蛋白的不同表达, 因此相对类似的胚胎期心肌细胞在出生后成熟的方向不一定一致。此外, 在妊娠期较长的大动物中, 心肌细胞的部分成熟过程在出生前已经开始, 比如T小管在如羊、牛和人等大动物的胚胎晚期心肌细胞中已经出现^[99], 而肥大性生长、双核化和多倍体化在晚期胚胎羊^[100]和人类心脏中也已经开始^[101]。这些区别表明, 出生时的某些特定刺激, 比如氧气浓度升高, 不是心肌细胞启动成熟程序的必要因素, 而某些在妊娠期较长的动物胚胎晚期就出现的体内环境变化, 比如激素和代谢底物, 可能是心肌细胞成熟的必要条件。

一些在心脏发育过程中重要的转录因子, 包括SRF、HOPX等, 被发现在成熟过程中也很重要。从发育生物学角度来看这很正常, 出生后的成熟是连续的发育过程的最后一步^[8]。最近几年, 单细胞转录组学的应用使得更多的调控心肌细胞成熟的转录调控机制被发现^[63-64,66-67,82], 包括一些没有心脏特异性的转录因子如NRF和AP-1等, 说明这些转录因子在不同类型细胞的发育或者命运决定或者改变过程中可能有共性的作用。这种共性在AP-1家族转录因子中有较多体现, 如在巨噬细胞发育过程中, AP-1结合的DNA环形成了细胞特异性的转录激活增强子, 调控巨噬细胞命运决定, 而最近的研究发现AP-1家族成员JUNB对造血细胞命运决定是必需的^[103]。这些

证据表明, AP-1可能在表观遗传层面上的多种细胞的命运决定过程中起到了关键作用。AP-1在心脏中是否也通过表观遗传机制调控心肌细胞成熟, 需要进一步研究来发现。

除单细胞转录组学研究外, 空间转录组学、表观遗传组学等更多组学手段, 以及将其互相结合的多组学研究, 也正在多个发育生物学领域被迅速应用^[104]。在心脏领域, 这些新技术被更早地用于成年心脏疾病的研究^[104]。但预计在不久的将来, 我们可以看到在心肌细胞成熟过程中, 多组学研究被用来深入解析心肌细胞成熟的分子机制, 那么将会有更多新的调控蛋白和机制被发现, 各种通路和转录程序之间的交互作用也将被更清楚地阐明, 而更多可能被干预的药物靶点也将被发现。这些研究将帮助我们鉴定出更多更新的调控心肌细胞成熟的重要分子和通路, 为开发治疗先天性心脏病和促进成年心脏再生的创新性药物和治疗手段提供新的理论基础。

参考文献 (References)

- [1] ZHAO D, LIU J, WANG M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(4): 203-12.
- [2] SADEK H, OLSON E N. Toward the goal of human heart regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(1): 7-16.
- [3] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart [J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-80.
- [4] WITMAN N, MURTUZA B, DAVIS B, et al. Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury [J]. *Dev Biol*, 2011, 354(1): 67-76.
- [5] POSS K D, WILSON L G, KEATING M T. Heart regeneration in zebrafish [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188-90.
- [6] KARBASSI E, FENIX A, MARCHIANO S, et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(6): 341-59.
- [7] CHONG J J, YANG X, DON C W, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts [J]. *Nature*, 2014, 510(7504): 273-7.
- [8] GUO Y, PU W T. Cardiomyocyte maturation: new phase in development [J]. *Circ Res*, 2020, 126(8): 1086-106.
- [9] 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.
- [10] LUNDY S D, ZHU W Z, REGNIER M, et al. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(14): 1991-2002.
- [11] MAHDAVI V, LOMPRES A M, CHAMBERS A P, et al. Cardiac myosin heavy chain isozyemic transitions during development and under pathological conditions are regulated at the level of mRNA availability [J]. *Eur Heart J*, 1984, 5(Suppl F): 181-91.
- [12] SCUDERI G J, BUTCHER J. Naturally engineered maturation of cardiomyocytes [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 50.
- [13] DAI D F, DANOVIZ M E, WICZER B, et al. Mitochondrial maturation in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 5153625.
- [14] PALMER J W, TANDLER B, HOPPEL C L. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252(23): 8731-9.
- [15] LIU J, LAKSMAN Z, BACKX P H. The electrophysiological development of cardiomyocytes [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 96: 253-73.
- [16] SARTIANI L, BETTIOL E, STILLITANO F, et al. Developmental changes in cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells: a molecular and electrophysiological approach [J]. *Stem Cells*, 2007, 25(5): 1136-44.
- [17] PADULA S L, VELAYUTHAM N, YUTZEY K E. Transcriptional regulation of postnatal cardiomyocyte maturation and regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3288.
- [18] PATTERSON M, BARSKE L, VAN HANDEL B, et al. Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(9): 1346-53.
- [19] DERKS W, BERGMANN O. Polyploidy in cardiomyocytes: roadblock to heart regeneration [J]? *Circ Res*, 2020, 126(4): 552-65.
- [20] BRODSKY V, CHERNYAEV A L, VASILYEVA I A. Variability of the cardiomyocyte ploidy in normal human hearts [J]. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1991, 61(4): 289-94.
- [21] HIROSE K, PAYUMO A Y, CUTIE S, et al. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition [J]. *Science*, 2019, 364(6436): 184-8.
- [22] 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, e7.
- [23] ENGLAND J, LOUGHNA S. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(7): 1221-39.
- [24] YIN Z, REN J, GUO W. Sarcomeric protein isoform transitions in cardiac muscle: a journey to heart failure [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(1): 47-52.
- [25] NEAGOE C, KULKE M, DEL MONTE F, et al. Titin isoform switch in ischemic human heart disease [J]. *Circulation*, 2002, 106(11): 1333-41.
- [26] SIEDNER S, KRÜGER M, SCHROETER M, et al. Developmental changes in contractility and sarcomeric proteins from the early embryonic to the adult stage in the mouse heart [J]. *J Physiol*, 2003, 548(Pt 2): 493-505.
- [27] DELAUGHTER D M, BICK A G, WAKIMOTO H, et al. Single-cell resolution of temporal gene expression during heart development [J]. *Dev Cell*, 2016, 39(4): 480-90.
- [28] LI Y, YANG M, TAN J, et al. Targeting ACSL1 promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration [J]. *Life Sci*, 2022, 294: 120371.

- [29] CALMETTES G, JOHN S A, WEISS J N, et al. Hexokinase-mitochondrial interactions regulate glucose metabolism differentially in adult and neonatal cardiac myocytes [J]. *J Gen Physiol*, 2013, 142(4): 425-36.
- [30] 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.
- [31] CARDOSO A C, LAM N T, SAVLA J J, et al. Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell cycle progression [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(2): 167-78.
- [32] JACOT J G, MCCULLOCH A D, OMENS J H. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Biophys J*, 2008, 95(7): 3479-87.
- [33] GUO Y, JARDIN B D, ZHOU P, et al. Hierarchical and stage-specific regulation of murine cardiomyocyte maturation by serum response factor [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3837.
- [34] POSERN G, TREISMAN R. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction [J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(11): 588-96.
- [35] GUO Y, CAO Y, JARDIN B D, et al. Sarcomeres regulate murine cardiomyocyte maturation through MRTF-SRF signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(2): e2008861118.
- [36] ARSENIAN S, WEINHOLD B, OELGESCHLAGER M, et al. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis [J]. *EMBO J*, 1998, 17(21): 6289-99.
- [37] PARLAKIAN A, TUIL D, HAMARD G, et al. Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(12): 5281-9.
- [38] BALZA R O, JR, MISRA R P. Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(10): 6498-510.
- [39] HUANG J, MIN LU M, CHENG L, et al. Myocardin is required for cardiomyocyte survival and maintenance of heart function [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(44): 18734-9.
- [40] MOKALLED M H, CARROLL K J, CENIK B K, et al. Myocardin-related transcription factors are required for cardiac development and function [J]. *Dev Biol*, 2015, 406(2): 109-16.
- [41] MARTIN O J, LAI L, SOUNDARAPANDIAN M M, et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 in the control of mitochondrial dynamics during postnatal cardiac growth [J]. *Circ Res*, 2014, 114(4): 626-36.
- [42] LAI L, LEONE T C, ZECHNER C, et al. Transcriptional coactivators PGC-1 α and PGC-1 β control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(14): 1948-61.
- [43] DORN G W, 2ND, VEGA R B, KELLY D P. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(19): 1981-91.
- [44] WU Z, PUIGSERVER P, ANDERSSON U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1 [J]. *Cell*, 1999, 98(1): 115-24.
- [45] LEE W S, KIM J. Peroxisome proliferator-activated receptors and the heart: lessons from the past and future directions [J]. *PPAR Res*, 2015, 2015: 271983.
- [46] DUFOUR C R, WILSON B J, HUSS J M, et al. Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERR α and γ [J]. *Cell Metab*, 2007, 5(5): 345-56.
- [47] KAR D, BANDYOPADHYAY A. Targeting peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) for the prevention of mitochondrial impairment and hypertrophy in cardiomyocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 245-59.
- [48] CAMPBELL F M, KOZAK R, WAGNER A, et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPAR α are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(6): 4098-103.
- [49] GUELLICH A, DAMY T, LECARPENTIER Y, et al. Role of oxidative stress in cardiac dysfunction of PPAR α -/- mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 293(1): H93-h102.
- [50] WANG T, MCDONALD C, PETRENKO N B, et al. Estrogen-related receptor α (ERR α) and ERR γ are essential coordinators of cardiac metabolism and function [J]. *Mol Cell Biol*, 2015, 35(7): 1281-98.
- [51] ALAYNICK W A, KONDO R P, XIE W, et al. ERR γ directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart [J]. *Cell Metab*, 2007, 6(1): 13-24.
- [52] HUSS J M, IMAHASHI K, DUFOUR C R, et al. The nuclear receptor ERR α is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload [J]. *Cell Metab*, 2007, 6(1): 25-37.
- [53] SAKAMOTO T, MATSUURA T R, WAN S, et al. A critical role for estrogen-related receptor signaling in cardiac maturation [J]. *Circ Res*, 2020, 126(12): 1685-702.
- [54] CHATTERGOON N N, GIRAUD G D, LOUEY S, et al. Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation [J]. *FASEB J*, 2012, 26(1): 397-408.
- [55] ROG-ZIELINSKA E A, CRAIG M A, MANNING J R, et al. Glucocorticoids promote structural and functional maturation of foetal cardiomyocytes: a role for PGC-1 α [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(7): 1106-16.
- [56] IRRCHER I, ADHIHETTY P J, SHEEHAN T, et al. PPAR γ coactivator-1 α expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, 284(6): C1669-77.
- [57] KRISHNAN J, AHUJA P, BODENMANN S, et al. Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1 α for cardiac morphogenesis and function [J]. *Circ Res*, 2008, 103(10): 1139-46.
- [58] NAKADA Y, CANSECO D C, THET S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 222-7.
- [59] NEARY M T, NG K E, LUDTMANN M H, et al. Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 74(100): 340-52.
- [60] BARTZ R R, SULIMAN H B, PIANTADOSI C A. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 291.
- [61] ITOH K, YE P, MATSUMIYA T, et al. Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria [J].

- J Clin Biochem Nutr, 2015, 56(2): 91-7.
- [62] ALAM J, STEWART D, TOUCHARD C, et al. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene [J]. J Biol Chem, 1999, 274(37): 26071-8.
- [63] CUI M, WANG Z, CHEN K, et al. Dynamic transcriptional responses to injury of regenerative and non-regenerative cardiomyocytes revealed by single-nucleus RNA sequencing [J]. Dev Cell, 2020, 55(5): 665-7.
- [64] CUI M, ATMANLI A, MORALES M G, et al. Nrf1 promotes heart regeneration and repair by regulating proteostasis and redox balance [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5270.
- [65] SHAULIAN E, KARIN M. AP-1 as a regulator of cell life and death [J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(5): E131-6.
- [66] ZHANG H, PEI L, OUYANG Z, et al. AP-1 activation mediates post-natal cardiomyocyte maturation [J]. Cardiovasc Res, 2022: cvac088.
- [67] LI Z, YAO F, YU P, et al. Postnatal state transition of cardiomyocyte as a primary step in heart maturation [J]. Protein & Cell, 2022, 13: 842-62.
- [68] BEISAW A, KUENNE C, GUENTHER S, et al. AP-1 contributes to chromatin accessibility to promote sarcomere disassembly and cardiomyocyte protrusion during zebrafish heart regeneration [J]. Circ Res, 2020, 126(12): 1760-78.
- [69] IZUMO S, NADAL-GINARD B, MAHDAVI V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(2): 339-43.
- [70] IWAKI K, SUKHATME V P, SHUBEITA H E, et al. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response [J]. J Biol Chem, 1990, 265(23): 13809-17.
- [71] KALFON R, KOREN L, AVIRAM S, et al. ATF3 expression in cardiomyocytes preserves homeostasis in the heart and controls peripheral glucose tolerance [J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(2): 134-46.
- [72] LIU H, ZHANG C H, AMMANAMANCHI N, et al. Control of cytokinesis by β -adrenergic receptors indicates an approach for regulating cardiomyocyte endowment [J]. Sci Transl Med, 2019, 11(513): eaaw6419.
- [73] WILKINS B J, MOLKENTIN J D. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(4): 1178-91.
- [74] MOLKENTIN J D, LU J R, ANTOS C L, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy [J]. Cell, 1998, 93(2): 215-28.
- [75] SCHULZ R A, YUTZEY K E. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development [J]. Dev Biol, 2004, 266(1): 1-16.
- [76] WILKINS B J, DE WINDT L J, BUENO O F, et al. Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(21): 7603-13.
- [77] SCHUBERT W, YANG X Y, YANG T T, et al. Requirement of transcription factor NFAT in developing atrial myocardium [J]. J Cell Biol, 2003, 161(5): 861-74.
- [78] MAHMOUD A I, KOCABAS F, MURALIDHAR S A, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. Nature, 2013, 497(7448): 249-53.
- [79] NGUYEN N U N, CANSECO D C, XIAO F, et al. A calcineurin-Hoxb13 axis regulates growth mode of mammalian cardiomyocytes [J]. Nature, 2020, 582(7811): 271-6.
- [80] CHEN F, KOOK H, MILEWSKI R, et al. Hop is an unusual homeobox gene that modulates cardiac development [J]. Cell, 2002, 110(6): 713-23.
- [81] SHIN C H, LIU Z P, PASSIER R, et al. Modulation of cardiac growth and development by HOP, an unusual homeodomain protein [J]. Cell, 2002, 110(6): 725-35.
- [82] FRIEDMAN C E, NGUYEN Q, LUKOWSKI S W, et al. Single-cell transcriptomic analysis of cardiac differentiation from human PSCs reveals HOPX-dependent cardiomyocyte maturation [J]. Cell Stem Cell, 2018, 23(4): 586-98, e8.
- [83] KOOK H, LEPORE J J, GITLER A D, et al. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop [J]. J Clin Invest, 2003, 112(6): 863-71.
- [84] PRENDIVILLE T W, GUO H, LIN Z, et al. Novel roles of GATA4/6 in the postnatal heart identified through temporally controlled, cardiomyocyte-specific gene inactivation by Adeno-associated virus delivery of Cre recombinase [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128105.
- [85] VANDUSEN N J, LEE J Y, GU W, et al. Massively parallel *in vivo* CRISPR screening identifies RNF20/40 as epigenetic regulators of cardiomyocyte maturation [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 4442.
- [86] YU W, HUANG X, TIAN X, et al. GATA4 regulates Fgf16 to promote heart repair after injury [J]. Development, 2016, 143(6): 936-49.
- [87] SIM C B, ZIEMANN M, KASPI A, et al. Dynamic changes in the cardiac methylome during postnatal development [J]. FASEB J, 2015, 29(4): 1329-43.
- [88] GILSBACH R, PREISSEL S, GRÜNING B A, et al. Dynamic DNA methylation orchestrates cardiomyocyte development, maturation and disease [J]. Nat Commun, 2014, 5: 5288.
- [89] KRANZHÖFER D K, GILSBACH R, GRÜNING B A, et al. 5'-Hydroxymethylcytosine precedes loss of CpG methylation in enhancers and genes undergoing activation in cardiomyocyte maturation [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166575.
- [90] AI S, PENG Y, LI C, et al. EED orchestration of heart maturation through interaction with HDACs is H3K27me3-independent [J]. eLife, 2017, 6: e24570.
- [91] THIENPONT B, ARONSEN J M, ROBINSON E L, et al. The H3K9 dimethyltransferases EHMT1/2 protect against pathological cardiac hypertrophy [J]. J Clin Invest, 2017, 127(1): 335-48.
- [92] DELGADO-OLGUÍN P, HUANG Y, LI X, et al. Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis [J]. Nat Genet, 2012, 44(3): 343-7.
- [93] HE A, MA Q, CAO J, et al. Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart [J]. Circ Res, 2012, 110(3): 406-15.
- [94] QUAIFFE-RYAN G A, SIM C B, ZIEMANN M, et al. Multicellular transcriptional analysis of mammalian heart regeneration [J].

- Circulation, 2017, 136(12): 1123-39.
- [95] GOMEZ-VELAZQUEZ M, BADIA-CAREAGA C, LECHUGA-VIECO A V, et al. CTCF counter-regulates cardiomyocyte development and maturation programs in the embryonic heart [J]. PLoS Genet, 2017, 13(8): e1006985.
- [96] AKERBERG B N, PU W T. Genetic and epigenetic control of heart development [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2020, 12(7): a036756.
- [97] YU Q, LEATHERBURY L, TIAN X, et al. Cardiovascular assessment of fetal mice by in utero echocardiography [J]. Ultrasound Med Biol, 2008, 34(5): 741-52.
- [98] KANNAN S, KWON C. Regulation of cardiomyocyte maturation during critical perinatal window [J]. J Physiol, 2020, 598(14): 2941-56.
- [99] KIM H D, KIM D J, LEE I J, et al. Human fetal heart development after mid-term: morphometry and ultrastructural study [J]. J Mol Cell Cardiol, 1992, 24(9): 949-65.
- [100] JONKER S S, ZHANG L, LOUEY S, et al. Myocyte enlargement, differentiation, and proliferation kinetics in the fetal sheep heart [J]. J Appl Physiol (1985), 2007, 102(3): 1130-42.
- [101] BOTTING K J, WANG K C, PADHEE M, et al. Early origins of heart disease: low birth weight and determinants of cardiomyocyte endowment [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(9): 814-23.
- [102] PHANSTIEL D H, VAN BORTLE K, SPACEK D, et al. Static and dynamic DNA loops form AP-1-bound activation hubs during macrophage development [J]. Mol Cell, 2017, 67(6): 1037-48, e6.
- [103] CHEN X, WANG P, QIU H, et al. Integrative epigenomic and transcriptomic analysis reveals the requirement of JUNB for hematopoietic fate induction [J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 3131.
- [104] LEON-MIMILA P, WANG J, HUERTAS-VAZQUEZ A. Relevance of multi-omics studies in cardiovascular diseases [J]. Front Cardiovasc Med, 2019, 6: 91.