



肖成路, 中国农业大学动物医学院基础兽医系讲师。主要研究斑马鱼心脏再生的细胞及分子机制, 以及细胞应激的信号转导及分子机制, 发现Brg1等分子参与调控斑马鱼心肌细胞增殖和再生。

再生过程中心肌细胞去分化和增殖的研究进展

肖成路*

(中国农业大学动物医学院, 北京 100193)

摘要 心肌梗死严重威胁人类生命健康。损伤的成体哺乳动物心脏无法进行再生, 最终导致心力衰竭。多种临床治疗手段可以缓解心肌梗死症状, 但无法修复死亡的心肌细胞。斑马鱼等低等脊椎动物以及一些新生哺乳动物心脏受到损伤后可以再生。研究心脏再生的细胞和分子机制可为成体心脏损伤修复提供理论基础。越来越多的研究表明, 心脏损伤后心肌细胞的修复依赖于心肌细胞的去分化和增殖。该文简单概述心脏再生过程中心肌细胞的来源以及心肌细胞去分化和增殖的分子机制。

关键词 心脏再生; 心肌细胞去分化; 心肌细胞增殖

Recent Advances on Cardiomyocyte Dedifferentiation and Proliferation during Heart Regeneration

XIAO Chenglu*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Myocardial infarction is a serious threat to human life and health. The damaged adult mammalian heart is unable to regenerate, eventually leading to heart failure. A variety of clinical treatments can relieve the symptoms of myocardial infarction, but they cannot repair the dead heart cells. Lower vertebrates such as zebrafish and some newborn mammals can regenerate damaged hearts. Research on cellular and molecular mechanisms of cardiac regeneration can provide theoretical basis for the repair of adult cardiac injury. More and more studies have shown that cardiomyocyte repair after cardiac injury depends on the dedifferentiation and proliferation of cardiomyocytes. In this paper, the origin of cardiomyocytes during cardiac regeneration and the molecular mechanisms of the dedifferentiation and proliferation of cardiomyocytes are briefly reviewed.

Keywords heart regeneration; cardiomyocyte dedifferentiation; cardiomyocyte proliferation

收稿日期: 2022-06-01

接受日期: 2022-07-13

国家自然科学基金(批准号: 32172829、32072848)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-62733484, E-mail: chengluxiao2016@163.com

Received: June 1, 2022

Accepted: July 13, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation (Grant No.32172829, 32072848)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62733484, E-mail: chengluxiao2016@163.com

心血管疾病,尤其是心肌梗死,在全球范围内仍然是造成人类死亡和医疗成本上升的主要原因^[1]。由于缺乏血液供应,大约四分之一的心肌细胞在心肌梗死后的几个小时内会发生凋亡和坏死,且成体哺乳动物心肌细胞再生能力差,这种大量的心肌细胞损失最终会造成心脏纤维化、心脏收缩功能丧失和心力衰竭。心肌梗死的常规疗法包括药物治疗、动脉搭桥、使用左心室辅助装置等,这些治疗手段可在一定程度上缓解症状,却不能修复死亡的心肌细胞;此外,心脏移植治疗手段也因供体的短缺严重受到限制^[2]。因此基于再生生物学的再生疗法可能会为心力衰竭患者提供更佳的解决方案。

尽管BERGMANN等^[3]研究发现,人类心脏能以低速率进行心肌细胞的更新,但发育完善的哺乳动物心脏受到损伤后并没有再生的能力。与成体哺乳动物不同,部分低等脊椎动物(例如斑马鱼和蝾螈)的成体心脏在受到损伤后依然能够再生^[4-5]。PORRELLO等^[6]的研究发现,新生哺乳动物心脏也具有再生能力,但该再生能力会在出生7天后消失。研究者们一直致力于探究新生心肌细胞的来源,尽管有众多假设,目前普遍认为包括c-Kit阳性心脏干细胞在内的成体心脏干细胞,并不直接参与心脏损伤修复,新生的心肌细胞主要来源于已有心肌细胞的去分化和增殖^[7-8]。本文着重对心脏再生过程中心肌

细胞去分化和增殖的分子机制进行概述。

1 再生过程中新生心肌细胞来源

心脏再生过程中,损伤区域虽然会形成疤痕组织,但是这些组织随后逐渐会被心肌等组织取代。心肌细胞的再生一直备受瞩目,其中非常重要的一个科学问题是新生心肌细胞的来源,其可能的来源包括:干细胞或前体细胞的分化、已有心肌细胞的去分化、其他类型细胞的转分化。早期在斑马鱼心脏再生中的研究提示,新生的心肌细胞来源于未分化的心脏前体细胞,LEPILINA等^[9]利用由*cmlc2*启动子驱动的定位红色荧光蛋白(nuclear-localized DsRed2, *nRFP*)和增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, *eGFP*)双转基因鱼对新生心肌细胞进行追踪,他们认为新生心肌来自类似于芽基(blastemal)的未分化细胞团,该细胞团由心肌细胞相关的祖细胞组成,这些祖细胞表达心前标记物(*nkx2.5*、*tbx20*和*hand2*),随后分化为增殖性的心肌细胞。

随着研究的深入,越来越多的研究表明,新生心肌细胞来源于已有的心肌细胞的去分化和增殖^[7,10]。BELMONTE^[7]和POSS^[10]课题组均利用相似的谱系追踪方法,对已有的斑马鱼心肌细胞进行荧光标记,发现了新生的心肌细胞均表达该荧光蛋白,证明了新生心肌细胞来自于已有的心肌细胞(图1)。增殖的

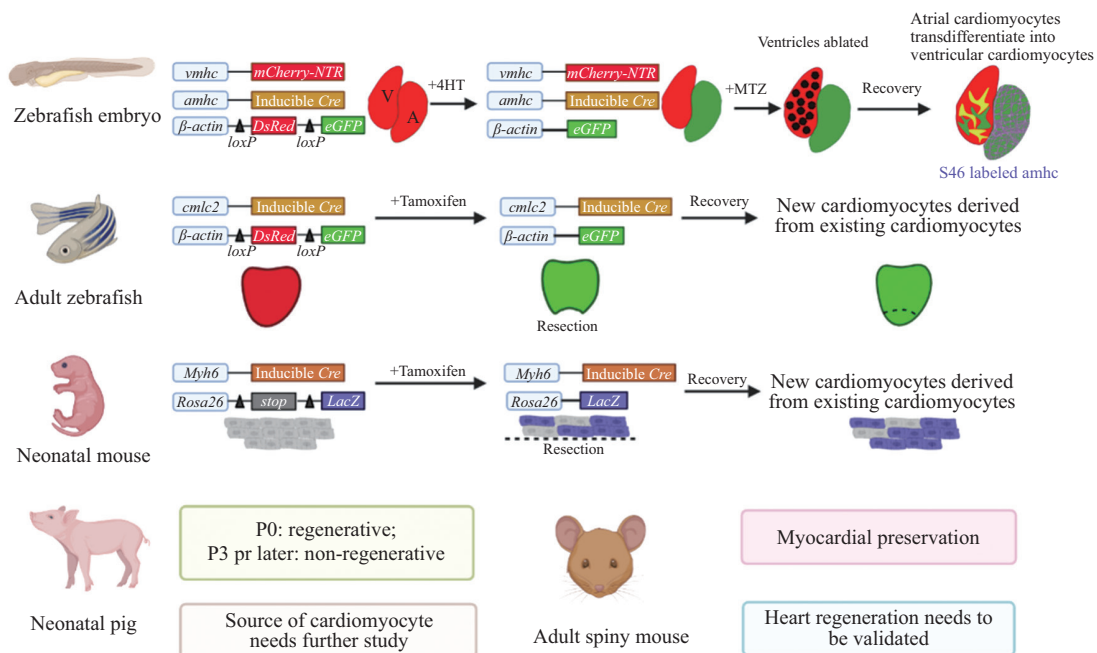


图1 心脏再生过程中新生心肌细胞来源

Fig.1 Cellular source of regenerating cardiomyocytes during heart regeneration

心肌细胞主要集中在伤口周围,且发生了去分化^[7]。在新生乳鼠心脏再生中的研究,也得到了同样的结论^[6](图1)。出生后2天的猪的心脏也具有再生能力,虽然缺乏心肌细胞谱系追踪的实验数据,但是新生猪心脏修复过程同样具有心肌细胞增殖与肌节解体的现象^[11]。另外,HAUBNER等^[12]报道了一例新生儿心肌损伤后心功能恢复正常的病例,他们的研究数据提示,新生人类可能具有修复受损心肌细胞的能力。

成体哺乳动物心脏虽然缺乏再生能力,但具有一定的更新能力。研究发现,成体心肌细胞其实可以进行低水平的更替,一些内源性的心肌细胞群保留了增殖的能力以便维持心脏稳态,成体人类心脏,从20岁时的每年以1%的速率,到75岁时每年以0.3%的速率进行心肌细胞更新,在正常生命周期内,有将近50%的心肌细胞发生了更替^[3]。DENYO等^[8]结合遗传谱系追踪和多同位素成像质谱(multi-isotope imaging mass spectrometry, MIMS)的方法,发现在心脏正常衰老和损伤过程中,心肌细胞可以进入细胞周期,这不仅可以导致心肌细胞的多核化,也可以导致新的二倍体单核心肌细胞的形成,且这些新形成的细胞主要来自于已有的心肌细胞。

有趣的是,近期研究发现,成体哺乳动物刺毛鼠,其心脏可以在损伤后修复^[13]。成体刺毛鼠心脏在损伤后,损伤边缘区域周围的增殖细胞增多,部分增殖的细胞可被肌动蛋白标记,这提示心肌细胞发生了增殖^[13]。但是目前还没有直接的证据来表明成体刺毛鼠心脏损伤修复是通过再生实现的。已有的研究提示,刺毛鼠在心肌梗死后具备缺血耐受和心肌细胞保护能力,并且与成体鼠心肌细胞相比,成体刺毛鼠二倍体单核心肌细胞的比例更高,并且分化程度较低^[14-15]。成体刺毛鼠心肌细胞是否发生了再生,及其新生心肌细胞的来源还有待进一步研究。值得关注的是,目前的研究提示,二倍体单核心肌细胞再生能力更强,斑马鱼心脏心肌细胞中99%是单核二倍体,如果人为地将斑马鱼心脏中部分心肌细胞多倍体化,将抑制心脏再生^[16];在哺乳动物心脏中,通过敲除*Tnni3k*来增加二倍体单核心肌细胞的比例,可促进损伤后心肌细胞增殖^[17]。虽然斑马鱼心肌细胞大多是单核二倍体,但是斑马鱼心室具有不同类型的心肌细胞,其心肌组织可分为原始心肌层、皮质心肌层和肌小梁心肌层,且在再生过程

中不同类型的心肌细胞的行为是有差异的^[18]。更为有趣的是,哺乳动物心脏特异性表达Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc四个重编程因子(统称为OSKM或4F),导致成体心肌细胞发生了去分化,并且该诱导作用与心肌细胞成熟度有关:对于新生的心肌细胞,OSKM过表达可维持其增殖状态;对于幼体心肌细胞,OSKM过表达可阻止其成熟;对于完全分化的成体心肌细胞,OSKM过表达可使其获得可有丝分裂的状态^[9],该结果提示,如果条件允许,即便是多倍体心肌细胞,也可以具有增殖能力。因此,在心脏再生过程中,二倍体心肌细胞和多倍体心肌细胞,以及不同类型的心肌细胞对心肌再生的贡献或影响,还有待进一步研究。

另外,心脏再生过程中也存在细胞转分化的现象(图1)。ZHANG等^[20]利用NTR-MTZ介导的细胞消融系统,对胚胎时期斑马鱼的心室心肌细胞进行损伤处理,发现分化的心房心肌细胞可以转分化为心室心肌细胞,进而促进心室心肌细胞再生,且Notch信号通路参与调控该转分化过程,这为心室心肌细胞再生提供了新的内源性细胞来源。

2 再生过程中心肌细胞的去分化

2.1 心肌细胞去分化现象

心肌梗死后,心肌细胞会呈现多种表型,包括凋亡、坏死、自噬和去分化等,一般认为,不论是在哺乳动物急性心肌梗死后,还是在心脏再生过程中,心肌细胞去分化起到的均是正向作用^[21]。细胞去分化是从成熟状态到不成熟状态的转变,通常发生在心脏损伤边缘区。成体哺乳动物心肌梗死后,其心肌细胞虽然可以进入去分化的状态,起到保护心脏的作用,但是不能再生;斑马鱼等低等脊椎动物以及一些新生哺乳动物心脏受到损伤后,其心肌细胞同样可以进入去分化状态,并且可进一步进行再生。

过去的几十年中,斑马鱼因其遗传操作便捷高效,以及再生能力强等优点,已经成为重要的心脏再生研究模式动物^[22]。研究人员对斑马鱼心脏再生过程中心肌细胞去分化的研究,在再生研究领域中是非常具有代表性的。形态学和生理功能方面的研究发现,斑马鱼去分化的心肌细胞会出现心肌细胞之间彼此脱离,心肌细胞Z带消失,肌节紊乱,以及收缩蛋白Myomesin表达减少等现象;电生理指标显示,去分化的心肌动作电位持续时间延长,动作

电位上冲速度减小, 心肌细胞之间偶联减少^[7,23]。目前可以用一些分子标志物对去分化的心肌细胞进行标记, 在斑马鱼心脏再生过程中, 心肌细胞去分化标志物包括: *Gata4*^[10]、*Vmhc*^[23]、*embCMHC*^[24]和*SM22a*^[25]等。斑马鱼去分化心肌细胞的另外一个特征是增殖, 其中很多细胞周期相关标志物(例如PCNA、pH3和MCM5等)被激活^[24,26]。近期, 包括单细胞测序在内的转录组分析技术的应用, 在分子水平上为心肌细胞去分化提供了更多的特征描述。BAKKERS研究团队^[23]利用Tomo-seq的方法, 对冰冻损伤再生过程中不同区域表达的基因进行了分类, 又将损伤边缘区域富集表达的基因分成了两个亚类: 损伤边缘内且更靠近尖端的区域(border zone further apically near the injury area, BZinj)和损伤边缘内且更靠近非损伤心肌区(border zone further basally near the uninjured myocardium, BZmyo)高表达的基因。BZmyo心肌细胞高表达胚胎心肌标志物分子(例如*nppb*、*vmhc*、*actc1*和*desma*)和细胞周期相关基因(例如*ccne2*、*brcc3*、*psmd14*和*E2F1*), 更趋向于处在去分化的状态; BZinj区域高表达平滑肌细胞标志基因(例如*myl6*、*junbb*、*crip2*和编码SM22a的*tagln*), 被认为主要与血管生成和纤维化相关, 但*tagln*在后续的研究中被用来标记去分化的心肌细胞^[23,25,27]。该研究团队后续对损伤边缘区域和损伤边缘区远端的心肌细胞以及非心肌细胞进行了单细胞转录组分析, 发现损伤边缘区心肌细胞发生了去分化, 并且在转录组水平上与胚胎时期心肌细胞相似; 此外, 损伤边缘区心肌细胞线粒体氧化磷酸化活性降低, 糖酵解相关酶编码基因被激活, 葡萄糖摄取增强, 其代谢状态从氧化磷酸化转变为糖酵解和乳酸发酵, 且这种代谢途径上的转变对心脏再生是至关重要的^[28]。近期, MIKLAS等^[29]利用单细胞测序和蛋白组学分析等研究方法, 同样发现再生过程中心肌细胞代谢转变的现象, 并且发现有一类心肌细胞高表达*lamtor5*, 提示该类心肌细胞中TOR信号通路处于激活状态, 不过该研究并没有明确该心肌细胞亚群为去分化的心肌细胞。这些工作在转录组水平和代谢水平上, 对斑马鱼心脏再生过程中去分化的心肌细胞进行了更深入的描述。

哺乳动物心脏损伤后, 心肌细胞也可以进行去分化和增殖。SADEK等^[6]最早发现乳鼠心脏可以再生, 尽管该现象存在一些争议。目前普遍认为乳

鼠心脏可以再生, 且其心脏再生过程中存在心肌细胞肌节解聚、DNA复制和胞质分裂的现象^[6]。成体鼠的心脏不能再生, 但是心脏损伤后, 心肌细胞同样可以进行去分化^[30]。成体小鼠去分化的心肌细胞表达*RUNX1*和*DAB2*, 且增殖的心肌细胞大多处于收缩功能缺失的去分化状态^[31]。乳鼠和成体鼠心肌细胞去分化的区别, 还需要更深入的研究。OLSON课题组^[32]利用单核RNA转录组测序技术, 对能再生的出生后1天(P1)的乳鼠心脏和不能再生的出生后8天(P8)的乳鼠心脏心肌细胞核进行了分析, 在P1乳鼠可再生心脏中发现了一类年轻态的心肌细胞, 该类心肌细胞高表达不成熟心肌细胞标志物*Tnni1*、*Myh7*和*Actc1*, 并高表达胚胎发育、细胞周期(*Mki67*和*Ccnb1*)、糖酵解、线粒体电子传递和ATP合成相关基因; 同时其氧化代谢降低, 细胞增殖增强。心脏损伤后, P8乳鼠心脏中有一类心肌细胞要比P1乳鼠心脏中多, 该类心肌细胞高表达肌丝调控相关基因*Xirp2*、*Cd44*和*Ankrd1*, 这可能导致心肌细胞丢失和心肌肥大^[32]。该研究团队后续利用单细胞测序和单细胞ATAC测序等方法, 对心肌梗死后不同时间点的乳鼠心脏进行了分析, 他们发现心肌细胞中存在增强子*hs389*和*mm64*^[33], 但是这些增强子与再生过程中心肌细胞去分化和增殖的关系, 还有待进一步研究。SMALL课题组^[34]利用空间转录组测序等方法, 期望对损伤乳鼠心脏的损伤边缘区进行定义, 他们发现该区域心肌细胞高表达胚胎发育相关基因*Ankrd1*、心脏疾病以及缺血性损伤相关基因*Ccl21*和*Sprr1a*, 并且研究者们认为*Sprr1a*可能与心脏损伤修复有关。与在斑马鱼中开展的研究类似, 这些组学研究工作没有明确提出乳鼠心脏再生过程中去分化心肌细胞类群, 且缺乏体内验证实验, 但是这些研究数据或许能为心肌细胞去分化现象的描述提供更多线索。

2.2 调控心肌细胞去分化的分子机制

再生过程中心肌细胞肌节解聚、增殖并填充受损区域是一项需要多种类型细胞和多维度信号通路调控的工程, 越来越多的研究致力于揭示再生过程中心肌细胞去分化的调控因子(图2)。

Notch信号通路在心脏再生过程中的调控是多方面的, 其既可以影响心内膜和炎症反应, 还可以影响心肌细胞的增殖, 值得注意的是, 抑制Notch信号通路活性可降低肌球蛋白轻链激酶*mylk3*(myosin

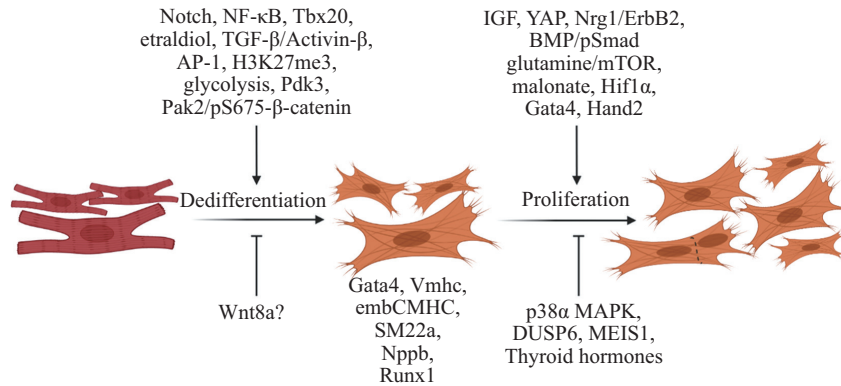


图2 调控心肌细胞去分化和增殖的分子

Fig.2 Factors regulating cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation

light chain kinase 3)的水平,表明心肌细胞去分化受到了影响^[35]。NF-κB信号通路在心脏再生过程中同样具有多方面功能,可以影响心外膜损伤应答,以及心肌细胞去分化和增殖。NF-κB在心脏的致密心肌层中被激活,并且与*gata4*存在共定位,且NF-κB可以通过直接结合*gata4*基因组上的调控元件而影响*gata4*的表达^[36]。T-box转录因子Tbx20(T-box transcription factor 20)是心脏发育的关键调控因子,在斑马鱼胚胎发育时期,过表达*tbx20*会导致心脏前体细胞增多和分化的心肌细胞增殖,进而导致心肌细胞增多以及心脏变大^[37]。成体斑马鱼心脏损伤后*tbx20*在心室心肌细胞和心房外皮细胞中被激活,过表达*tbx20*导致损伤边缘区域心肌细胞间连接标志物ZO-1和N-cadherin减少,肌节解聚,去分化标志基因 α -SMA(alpha-smooth muscle actin)、*nppa*(natriuretic peptide a)和*nppb*(natriuretic peptide b)以及前体细胞标志物*runx1*表达量增加,表明心肌细胞去分化明显增强^[38]。XU等^[26]的研究发现,雌激素可以影响心肌细胞去分化和再生,用他莫昔芬处理雌鱼可导致雌鱼去分化的心肌细胞减少,用雌二醇(estraldiol, E2)处理雄鱼可导致雄鱼去分化的心肌细胞增加。PENG等^[39]于2021年发表的研究表明,斑马鱼心脏损伤可诱导Wnt抑制因子(Dkk1、Dkk3等)在损伤区域附近表达,过表达Dkk1可以抑制Wnt活性进而促进心肌细胞增殖和再生,而过表达Wnt8a则会抑制心肌细胞去分化和再生。磷酸化修饰的pS675-β-catenin在心脏损伤后与心肌细胞去分化标志物emCMHC共定位,并且pS675-β-catenin的675位丝氨酸磷酸化修饰由Pak2负责。过表达Pak2可以促进心肌细胞去分化和肌节解聚,而抑制Pak2则会抑

制心肌细胞去分化和增殖^[39]。不过MIKLAS等^[29]却发现,过表达Wnt8a可以促进心肌细胞增殖,该结果与ZHAO等^[40]的实验结果是相反的,这可能与他们使用了不同的心脏损伤方法有关。Wnt信号通路在心脏再生过程中的功能还有待进一步研究。

表观遗传调控方面,PFEFFERLI等^[41]发现了一个在斑马鱼心脏和鳍再生过程中被短暂激活的调控元件。该元件含有一个被称为*careg*的*ctgfa*(connective tissue growth factor a)上游序列,并且该元件的激活依赖于损伤区域中的TGF-β/Activin-β信号,有趣的是,用该元件构建的*ctgfa:eGFP*转基因鱼在心脏损伤后,心脏中*eGFP*的表达与去分化标志物emCMHC共定位。但是该调控元件在心肌细胞去分化和再生过程中的功能还有待进一步研究。负责H3K27me3修饰的Ezh2是PRC2复合物的甲基转移酶,它在心脏损伤后表达上调且与emCMHC共定位。H3K4me3和H3K27me3 ChIP-seq结合RNA-seq的分析结果表明,心脏再生过程中的细胞周期相关基因,其染色质H3K4me3修饰富集,H3K27me3修饰丢失,其表达随之上调;相反地,肌节形成和细胞骨架相关基因,其染色质H3K4me3修饰丢失,H3K27me3修饰富集,其表达随之下调。功能分析表明,H3K-27me3修饰对心脏再生是必要的^[42]。STAINIER课题组^[43]利用ATAC测序等方法,对损伤边缘区域和远端非再生心肌细胞进行了分析,发现AP-1可通过增加染色质可及性,促进心肌细胞去分化和增殖。在心肌细胞中通过条件性过表达A-Fos对AP-1的功能进行抑制后,心肌细胞去分化标志物emCMHC表达量明显变少。

心肌细胞去分化也会受到代谢调控。STAINI-

ER课题组^[44]研究发现, 斑马鱼心脏受到冰冻损伤后, 心肌细胞的代谢途径从脂肪酸氧化转变为糖酵解; 糖酵解和丙酮酸代谢相关基因, 例如, 丙酮酸激酶M1/2(pyruvate kinase M1/2, Pkm)和丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, Pdk), 在损伤边缘区域表达上调。斑马鱼*pkma2*突变体中丙酮酸转化为乳酸的代谢途径受损, 丙酮酸氧化增加, 导致该突变体心脏损伤后心肌细胞去分化受到了抑制。Pdk可以促进丙酮酸转变为乳酸, 在心肌细胞中过表达*pdk3b*可促进心脏损伤后心肌细胞的去分化和增殖。

目前, 再生过程中心肌细胞去分化调控的机制大多来自于斑马鱼的体内研究, 在损伤的成体心脏模型中, 研究人员发现了很多可以促进心肌细胞去分化的因素, 例如OSM(oncostatin M)、Nrg1/ErbB2信号通路、Hippo信号通路以及Agrin等^[45]。关于心脏再生模型中心肌细胞去分化的细胞及分子机制, 还有很多未解之谜。另外, 心肌细胞去分化和增殖的精细调控机制, 还不是十分清楚。很多信号通路既可以影响心肌细胞去分化, 又可以影响心肌细胞增殖。

3 再生过程中心肌细胞的增殖

3.1 心肌细胞增殖现象

低等脊椎动物和哺乳动物的心肌细胞增殖能力有很大的差别, 并且成体低等脊椎动物, 如斑马鱼和蝾螈心肌细胞增殖能力远远大于成体哺乳动物心肌细胞, 然而造成该差异的原因并不清楚。一些研究者认为心肌细胞增殖能力与心肌细胞的总DNA含量有关: 成体蝾螈和斑马鱼大部分心肌细胞可终生保持单核、二倍体, 增殖能力强。新生小鼠和人心肌细胞具有与蝾螈和斑马鱼心肌细胞相似的特征。小鼠的心肌细胞数量在出生后1周内基本稳定, 但其心肌细胞随后经历两个周期的DNA合成, 导致成体鼠心肌细胞为双核多倍体, 成体人类心肌细胞也多为四倍体, 增殖能力大大降低^[46-47]。

严格意义上的心肌细胞增殖是指胞质分裂, 目前在鉴定和量化心肌细胞增殖方面, 可利用增殖标志物和心肌细胞特异性抗体共定位的方法, Ki67、EdU/BrdU、pH3和PCNA是常用的心肌细胞增殖标志物^[6-7], 但是这些细胞周期标志物并不能很好地证明细胞是否进入了胞质分裂。Aurora/Ipl1p家族是一类保守的丝氨酸/苏氨酸激酶, 在染色体分

离和细胞胞质分裂中起着关键作用, 因此目前Aurora B常被用来标记心肌细胞的胞质分裂^[48]。另外, Fucci(fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator)系统也可用于追踪增殖的心肌细胞, 该系统利用Cdt1在G₁期聚集, Geminin在S/G₂/M期聚集的特点, 将没有功能的人Cdt1与mKO2(a fast-folding variant of monomeric version of Kusabira Orange)荧光蛋白进行融合, 并将无功能的人Geminin与mAG(the monomeric version of Azami Green)荧光蛋白进行融合, 从而使得G₁期心肌细胞被标记成了红色, S/G₂/M期心肌细胞被标记成了绿色^[27,49]。ARDEHALI团队^[50]用MADM(mosaic analysis with double markers)系统来检测在体心肌细胞的分裂, 因为该系统可将分裂后的心肌细胞标记成绿色或者红色, 如果是双核的心肌细胞, 则会被标记成红色和绿色叠加后的黄色, 他们发现出生后的小鼠心脏以及结扎损伤后的成体小鼠心脏的心肌细胞可进行分裂, 但是其比率非常低。BrainBow(CAG-*loxP-stop-loxP-Brainbow*)系统常被用来分析由细胞分裂增殖形成的子细胞克隆, 该系统利用了Cre重组酶以及一系列串联和倒置的位于不同荧光蛋白序列两侧的*loxP*、*loxN*和*lox2272*位点^[51]。改造的BrainBow系统也被分别应用于斑马鱼和小鼠心脏发育及心脏损伤模型中: 心脏损伤后, 成体斑马鱼和乳鼠心肌细胞可分裂产生子细胞克隆, 然而, 非常少的成体鼠心肌细胞发生了细胞分裂增殖^[18,52]。近期WOLF课题组^[53]利用一种基于Dre和Cre重组酶追踪心肌细胞分裂增殖的方法, 观察到成体小鼠心脏损伤后, 心肌细胞可进入细胞周期, 导致多倍体心肌细胞的形成; 该课题组同样发现了成体小鼠心肌细胞分裂复制的比率非常低。

3.2 调控心肌细胞增殖的分子机制

心脏再生是动态且复杂的, 涉及到不同类型细胞组织的相互配合, 以及多个阶段: 早期细胞凋亡和炎症反应, 心内皮和外皮激活, 心肌细胞增殖, 心肌细胞整合到伤口处和疤痕的去除^[54]。调控心脏再生过程中心肌细胞增殖的因素, 一直以来都备受关注。尤其是越来越多的研究都在利用在心脏再生模型中发现的调控心肌细胞增殖的因子, 来刺激心肌细胞进行增殖^[25,44]。下面对调控心肌细胞增殖和再生的分子进行简要概述(图2)。

激活受体酪氨酸激酶途径的生长因子参与调控众多生理病理过程, 且在调控心肌细胞增殖和

再生方面同样发挥重要的作用。FGF(fibroblast growth factor)家族是一组结构保守的细胞外信号分子,大小范围为15~38 kDa,可作用于细胞表面酪氨酸激酶受体FGFR,FGFR被激活后导致MAPK(mitogen-activated protein kinase)和AKT途径的激活。有趣的是,在哺乳动物中进行的研究发现,过表达FGF10可以促进成体心脏心肌细胞增殖;但在斑马鱼心脏再生过程中,FGF信号通路则与血管新生以及心肌细胞存活有关^[55-56]。胰岛素生长因子激活的信号通路参与调控细胞生长和分化等过程^[57],研究发现,*igf2b*在斑马鱼心脏损伤后表达上调,抑制Igf信号通路导致心肌细胞增殖减少。同样,在乳鼠心脏再生过程中,*Igf2*缺失可阻止乳鼠心肌细胞进入细胞周期^[58-59]。胞外配体生长因子神经调节蛋白NRG1可结合EGF受体ErbB2和ErbB4进而激活Ras/MAPK信号通路,NRG1早期就被发现可以促进哺乳动物心肌细胞增殖,后续在斑马鱼和乳鼠心脏再生过程中,均发现Nrg1/ErbB2信号通路对心肌细胞增殖是必要的^[60-61]。MAPK信号通路在调控心肌细胞增殖方面还是比较复杂的,并且在斑马鱼心脏再生过程中,该信号通路通常通过调控心外皮和心内皮从而影响心肌细胞增殖。JOPLING等^[62]发现,*p38α* MAPK可抑制斑马鱼心肌细胞增殖。*Dusp6*可以通过去磷酸化抑制Erk1/2的活性,抑制*Dusp6*活性可使斑马鱼心肌细胞增殖增多^[63],且斑马鱼*Dusp6*突变体心肌细胞增殖增多^[64],过表达*Dusp6*则会导致心肌细胞增殖变少^[63-64]。在哺乳动物中的研究发现,特异性敲除心脏中的*p38α*可使体外培养的心肌细胞增殖增强^[65],*Dusp6*敲除鼠,由于心肌细胞增殖增强,导致心脏变大^[66]。

Notch信号通路在不同物种之间是比较保守的,通常介导细胞间通讯,在组织器官发育和再生过程中扮演重要角色^[67]。早在2003年,RAYA等^[68]就发现Notch配体和受体在斑马鱼心脏损伤后表达上调,后来CHI课题组^[20]研究发现,在胚胎期斑马鱼心脏再生过程中,Notch在心内膜中被激活,且Notch信号被阻断后心肌细胞转分化会受到影响,从而导致心脏不能再生。后续跟进研究发现,心脏损伤导致血流动力学改变,该改变可被心内膜上的机械力敏感通道Trpv4感知,并导致*klf2a*和*klf2b*表达上调,*klf2*进而激活Notch信号通路,然后导致心肌细胞

中ErbB2和BMP信号通路被激活,进而调控心肌细胞去分化、转分化、增殖和再生^[69-70]。BURNS课题组^[71]的研究则发现,在成体斑马鱼心脏再生过程中,Notch受体在心外皮和心内皮细胞中表达上调,通过抑制剂处理或者过表达*DN-MAML*(a dominant negative isoform of the murine mastermind-like)来抑制Notch信号通路,会导致心肌细胞增殖减弱,心脏不能再生,不过心内皮的激活并不会受到影响,且过表达Notch同样也会抑制心肌细胞增殖。后续研究表明,心脏损伤后Notch信号被激活,导致Wnt信号通路的拮抗剂*wif1*和*notum1b*在心内皮和外皮细胞中表达上调,它们可被分泌到心肌细胞中抑制Wnt信号通路,进而促进心肌细胞增殖^[40]。在斑马鱼心脏冰冻损伤模型中的研究则发现,Notch信号被抑制后,胞外基质降解酶类和免疫相关基因表达上调,且巨噬细胞聚积增多,Notch可以通过抑制*serpine1*,防止其在再生后期过度表达,进而促进心肌细胞增殖^[35]。GIACCA课题组^[72]早期研究发现,Notch1在增殖的乳鼠心肌细胞中高表达,而其配体*Jagged1*则主要在非心肌基质细胞中表达,抑制Notch信号通路会抑制乳鼠心肌细胞增殖,用*Jagged1*处理或者过表达N1ICD来激活Notch信号通路可促进乳鼠心肌细胞增殖。他们后来在成体鼠心脏中的研究则发现,激活体外培养的成体鼠心肌细胞或者心肌梗死后的成体鼠心脏中的Notch信号通路并不能促进成体心肌细胞增殖,原因是成体心肌细胞中Notch信号通路的靶基因启动子区域具有很强的DNA甲基化修饰,导致靶基因不能成功表达,如果用抑制剂抑制DNA甲基化修饰水平,同时激活Notch信号通路,便可以成功诱导成体鼠心肌细胞增殖^[73]。该研究组于2018年发表的研究成果中指出,Notch1-ICD在乳鼠心肌细胞中是有乙酰化修饰的,该乙酰化修饰对于N1ICD的稳定性至关重要,过表达*Sirt1*可以逆转Notch-ICD乙酰化修饰进而降低其稳定性,用AAV9在损伤的乳鼠心脏中过表达乙酰化的N1ICD可使心肌细胞增殖增强,并使其再生能力更强^[74]。

TGF-β和BMP信号通路在斑马鱼肌小梁形成过程中也具有重要作用,提示其参与调控心肌细胞增殖和再生^[75]。pSmad3作为TGF-β信号转导的重要标志物,在斑马鱼心脏损伤后,在伤口附近心肌细胞中表达,并且使用Alk5/4抑制剂可抑制TGF-β信号通

路活性, 导致伤口附近的pSmad3阳性心肌细胞减少以及心肌细胞增殖减少^[76]。DOGRA等^[77]发现, 在斑马鱼心脏再生过程中, 存在两种TGF- β 配体(*mstnb*和*inhbaa*), 它们在调控心肌细胞增殖方面具有相反的作用。*mstnb*功能的丧失和*inhbaa*表达的激活都有利于心肌细胞增殖, 并导致心脏再生增强, 且单独过表达*inhbaa*足以诱导心肌细胞增殖。另外, 斑马鱼心脏冰冻损伤后, 配体*bmp2b*在伤口区域心内皮和心外皮中表达上调, pSmad1/5/8在损伤边缘区域心肌细胞核中表达上调, 过表达BMP拮抗因子*noggin3*可导致pSmad1/5/8阳性心肌细胞变少, 去分化的心肌细胞减少, PCNA阳性心肌细胞减少, 心脏再生能力降低; 过表达*bmp2b*可促进损伤后的斑马鱼心脏心肌细胞增殖^[23]。

Yes相关蛋白YAP是Hippo信号通路中的转录辅助因子, YAP的激活可以抑制Hippo信号通路, 研究发现YAP可以促进损伤心脏中的心肌细胞增殖^[78]。OLSON课题组^[79]发现, 在乳鼠心脏中特异性敲除*Yap*会抑制再生过程中心肌细胞的增殖; 研究人员将鼠YAP蛋白的第112位丝氨酸换成丙氨酸, 制备出持续活化的YAP, 心肌细胞中过表达该活化态YAP的转基因鼠, 在心肌梗死后其心肌细胞增殖能力明显增强。LIU等^[80]通过研究YAP下游基因*Wls*(Wntless)发现, 在乳鼠心脏再生过程中, Wnt配体在心肌细胞中表达, 受体在心脏成纤维细胞中表达, *Wls*敲除乳鼠心脏损伤后心脏纤维化增多, 不能再生。有趣的是, 斑马鱼*yap*纯合突变体可以存活到成年, 尽管*yap*可以调控胚胎斑马鱼心脏大小, 但是*yap*的缺失并不影响成体斑马鱼心脏再生过程中的心肌细胞增殖能力, 而是导致伤口周围巨噬细胞数量增多和心脏纤维化增加^[81]。利用腺病毒包被的AAV9-*Sav*-hRNA敲低猪心脏中的Hippo信号通路基因*Sav*(Salvador), 可导致更多的YAP蛋白进入心肌细胞核, 增殖的心肌细胞数目变多, 心肌梗死后心脏功能恢复得更好, 以及心脏纤维化减少^[82]。

细胞分裂需要代谢网络的支撑。与成体心肌细胞相比, 胚胎心肌细胞能够大量的生长和分裂, 与其独特的代谢状态有关, 胚胎心脏似乎主要依靠葡萄糖和乳酸盐来获取能量, 且对糖酵解途径是高度依赖的^[83]。在新生乳鼠和斑马鱼心脏中, 较高水平谷氨酰胺促使mTOR信号通路处于激活状态, 从而导致心脏损伤后心肌细胞进入细胞周期^[29]。在新生

小鼠中注射琥珀酸盐可抑制心肌细胞增殖和再生, 用丙二酸抑制琥珀酸脱氢酶可以延长出生后小鼠心肌细胞增殖和再生的窗口期, 并且, 用丙二酸处理梗死的成体小鼠心脏, 可以促进成体心肌细胞增殖^[84]。多项研究表明, 缺氧诱导因子*Hif1 α* 有利于心肌细胞增殖^[85-87]。缺氧不仅可以诱导斑马鱼心肌细胞去分化和增殖^[85], 也可以促进损伤后的成体哺乳动物心脏的心肌细胞增殖^[86]。SADEK课题组^[87]的研究发现, 小鼠出生后的1周内, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)、氧化DNA损伤和DNA损伤应答(DNA damage response, DDR)标志物在心脏中的表达大量增加, 缺氧、ROS清除或抑制DDR均可以延长出生后小鼠心肌细胞增殖的窗口期, 相反, 高氧和ROS可以缩短该窗口期。

激素参与调控心肌细胞增殖。HIROSE等^[88]对41种不同物种进行了系统分析, 发现单核二倍体心肌细胞的丰度与代谢率、体温和甲状腺激素水平呈负相关。小鼠出生后, 随着单核心肌细胞数量的逐渐减少, 循环甲状腺激素水平上升大于50倍^[88]。在心肌细胞中特异性表达甲状腺激素受体显性负抑制基因, 小鼠出生后14天进行分析, 发现小鼠心脏中单核心肌细胞比率明显增加, 增殖的心肌细胞数目增多, 心脏也明显变大。此外, 甲状腺激素受体激活缺陷的成体鼠心肌细胞具备更强的增殖和再生潜力^[88]。用甲状腺激素处理斑马鱼, 导致双核心肌细胞比率明显增加, 增殖的心肌细胞数目减少, 心脏不能再生, 但是尾鳍再生没有受到影响。提示甲状腺激素在调节心肌细胞增殖中的进化保守功能^[88]。

另外, 心脏转录因子与心肌细胞增殖有着密切的关系, 例如*Gata4*在小鼠心脏发育中发挥非常重要的作用^[89]。MOHAMMADI等^[90]在乳鼠心脏再生过程中的研究发现, 心肌细胞特异性敲除*Gata4*后, 心肌细胞增殖和血管新生减少, 过表达*Gata4*可以促进心肌细胞增殖。POSS课题组^[10]的研究工作发现, 斑马鱼心脏损伤后, *gata4*在心脏致密层和损伤区域被激活。*hand2*被认为是心肌细胞产生的重要调节因子。利用DTA系统将斑马鱼心肌细胞杀伤后, *hand2*、*nkx2.5*、*tbx5*和*tbx20*表达增加, 其中*hand2*在心肌细胞和内皮细胞中被大量激活, 过表达*hand2*可以促进心肌细胞增殖^[90]。TALE家族的Meis转录因子是胚胎心脏分化的重要调控因子,

SADEK课题组^[91]前期的筛选工作表明 *Meis1* 具备调节乳鼠心脏再生的潜力, 他们后续的研究发现, 用 siRNA 敲低 *Meis1* 表达水平可以促进体外培养的心肌细胞的增殖, 心肌细胞特异性敲除 *Meis1* 可明显促进 p14 鼠心肌细胞增殖, 心肌细胞过表达 *Meis1* 则可减少 pH3 阳性心肌细胞数量, 并明显抑制乳鼠心脏再生。

3.3 促进心肌细胞增殖

诱导成体心肌细胞增殖是心脏再生领域中的研究热点。目前已报道的促进成体心肌细胞增殖的非细胞策略包括: 调节已知基因进行诱导, miRNAs 诱导, 以及基于高通量筛选的化学小分子处理等。

细胞周期激活因子的过表达以及细胞周期抑制因子的敲低可有效诱导心肌细胞进入细胞周期, DEEPAK 研究团队^[92]对 10.5 天的胚胎、出生后 1 天以及出生后 6 周的小鼠心脏进行了转录组分析比较, 筛选出了增殖性心肌细胞与非增殖性心肌细胞之间差异表达最大的细胞周期相关基因, 后续经过系统地测试这些基因及其组合, 发现 CDK1/CCNB/CDK4/CCND 组合可以最有效地促进体外培养的成体大鼠心肌细胞以及多能干细胞来源的心肌细胞 (hiPS-CM) 增殖; 利用 MADM 系统检测, 同样发现该组合可以促进心肌细胞分裂; 且该组合可有效改善心肌梗死后小鼠的心脏功能。与以上利用基因组合进行诱导的策略类似, 心脏特异性表达 OSKM 可诱导成体心肌细胞去分化和增殖, 促进成体心脏再生^[19]。由于多种信号通路参与调控心肌细胞增殖, 很多研究工作则通过调节信号通路分子进而达到促进心肌细胞增殖的目的。仅通过单个分子 (例如 NRG1 或 YAP) 便可诱导心肌细胞增殖的研究成果, 已被人们普遍认可。早在 2009 年, BERSELL 等^[93]对胞外分泌因子进行筛选的过程中发现, FGF1、Periostin 和 NRG1 可以促进体外培养的成体大鼠心肌细胞增殖分裂, 直接将 NRG1 注射到小鼠体内可促进心肌细胞增殖, 并可改善心肌梗死后的心脏功能, 同时减小疤痕面积。随后 POSS 课题组^[60]在斑马鱼中的研究也发现了同样的现象, 他们发现心脏损伤后, Nrg1 在心外皮中被激活, 心肌细胞特异性过表达 Nrg1 可以显著促进心肌细胞增殖。众多实验数据表明, Hippo/YAP 信号通路对于心脏发育是必要的, 并且通过调节 Hippo/YAP 信号通路中的成员可以促进心肌细胞增殖, 减小心肌

梗死后疤痕面积^[94]。更为有趣的是, AHARONOV 等^[95]的研究发现, *ErbB2* 瞬时过表达导致心肌细胞发生了间充质转化样再生反应, 从而导致心脏再生能力增强, 且 *Yap* 是 *ErbB2* 信号转导的关键因子。高通量筛选发现很多 miRNA (microRNA) 可以诱导心肌细胞增殖并促进小鼠心脏再生, GIACCA 课题组^[96]研究发现, miR-590-3p、miR-199a-3p 以及 miR-302 家族中的部分成员可以通过调控 YAP 信号通路活性进而促进心肌细胞增殖, miR-199a-3p、miR-1825、miR-302d 和 miR-373 可以直接靶向与细胞微丝骨架形成相关的 *Cofilin2* 的 3' UTR, 进而促进 YAP 进入细胞核以及 YAP 靶基因的转录激活。Klf1 在促进斑马鱼心肌细胞增殖方面的效果是非常显著的, Klf1 可改变心肌细胞能量代谢, 还可降低心脏转录因子在基因组上可及性, 进而促进心肌细胞去分化; 并可通过促进细胞周期相关基因表达来促进心肌细胞增殖^[25]。

利用化学小分子诱导心肌细胞增殖实现原位心脏再生的策略, 因其不需要病毒载体进行递送以及处理时间可控等优点, 近年来备受关注。鉴于 Hippo/YAP 信号通路在促进心肌细胞增殖方面的突出表现, 研究人员致力于筛选出可以增强 YAP 活性的小分子化合物, HARA 等^[97]发现 TAZ-12 ($C_{11}H_{10}ClN_3OS_2$) 可以作为 YAP-TEAD 的激活剂, 并可显著促进心肌细胞增殖, 且他们合成了新型含氟化合物 TT-10 ($C_{11}H_{10}FN_3OS_2$), 发现 TT-10 可以显著增强 YAP 信号通路活性, 促进心肌细胞增殖以及成体心脏再生。KASTAN 等^[98]找到了一个 Lats 激酶的 ATP 竞争性抑制剂 TRULI [*N*-(3-benzylthiazol-2(3H)-ylidene)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine-3-carboxamide], 该化合物可抑制 YAP 磷酸化, 诱导包括心肌细胞在内的多种类型细胞的增殖。另外, 一些其他分子化合物, 如 CaMKII 信号通路抑制剂 CSB (chicago sky blue 6B)、Wnt 信号通路抑制剂 Cardiogen 以及 DYRK1 抑制剂 harmine 均可促进心肌细胞增殖^[27,99]。值得关注的是, 北京大学 XIONG 课题组^[27]的最新研究首次发现小分子药物组合 5SM (five small molecules: phenylephrine, baricitinib, harmine, vo-ohpic trihydrate and AZD3965) 可以非常有效地促进成体心肌细胞增殖和心脏再生, 5SM 还可促进心肌细胞代谢由氧化磷酸化向糖酵解转换, 从而促进心肌细胞去分化和增殖, 该研究为心肌梗死疾病治疗提供了新的候选药物及技术。

4 结语与展望

目前报道的具有心脏再生能力的几个物种之间似乎共享一些细胞机制, 心脏受到损伤后, 心肌细胞完成再生至少经历了存活、去分化、增殖、迁移、再分化及整合等过程^[46,56]。心肌细胞的增殖情况几乎已经成为研究心脏再生的必要指标, 而去分化又被认为是心肌细胞可以进行增殖的必要条件。很多影响心脏再生的因素既可以调控心肌细胞去分化, 又可以调控心肌细胞增殖; 心肌细胞增殖又涉及DNA复制、核分裂以及胞质分裂等过程, 大多数研究检测心肌细胞增殖时使用BrdU、PCNA、Ki67以及pH3等标志物, 并没有明确心肌细胞是否发生了胞质分裂。因此, 需要更多研究来明确哪些因素只影响心肌细胞去分化而不影响心肌DNA复制或胞质分裂, 如H3K27me3修饰可调控心肌细胞去分化, 不影响心肌细胞进行DNA复制和核分裂, 但是会影响胞质分裂^[42]。另外, 鉴于心肌细胞再生的复杂性, 以及可以用来进行鉴定不同再生过程的标志物或技术方法的缺乏, 大多数的研究仅能关注再生过程中的一个至几个部分, 因此需要更多基因调控网络方面的研究, 这些研究可为促进心肌细胞修复提供线索, 例如在恰当的时间用OSKM处理损伤的心脏, 进而促进心肌细胞去分化和修复^[19]。

尽管去分化的概念在很早之前就被提出来了, 但是众多数据基本上都是对心肌细胞一种状态的描述, 在体再生过程中的心肌细胞去分化还缺乏活体成像或者心脏再生特异性标志物的直接证据。此外, 从目前的研究成果来看, 成体斑马鱼以及新生乳鼠心脏再生过程中去分化的心肌细胞大部分是单核双倍体, 而成体哺乳动物心肌细胞多为双核四倍体或多核多倍体^[17]。虽然在心脏再生过程中, 以及在缺乏再生能力的成体哺乳动物心脏损伤后, 都存在心肌细胞去分化现象, 但是两者的区别并不清楚, 并且已有的一些去分化标志物还是众所周知的炎症反应标志物^[30], 所以目前还没有明确地将再生过程中的去分化心肌细胞定义出来。因此, 对两者组学方面的比较分析是有必要的, 空间转录测序技术结合其他组学分析或许对寻找心脏再生特异性心肌细胞去分化标志物有所帮助, 并且如何从多组学的线索中找到再生过程中独特的心肌细胞去分化调控因素是具有挑战性的。

人们对用于治疗心力衰竭的再生疗法的需求

是巨大的。毫无疑问, 破译调节心脏再生的细胞和分子机制将为治疗心脏病提供更多策略。此外, 仍然需要付出巨大的努力来开发安全的疗法, 以实现从实验转化为临床治疗。

参考文献 (References)

- [1] ROTH G A, MENSAH G A, JOHNSON C O, et al. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990—2019: Update from the gbd 2019 study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 76(25): 2982-3021.
- [2] GARBERN J C, LEE R T. Heart regeneration: 20 years of progress and renewed optimism [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(4): 424-39.
- [3] BERGMANN O, BHARDWAJ R D, BERNARD S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. *Science*, 2009, 324(5923): 98-102.
- [4] POSS K D, WILSON L G, KEATING M T. Heart regeneration in zebrafish [J]. *Science*, 2002, 298(5601): 2188-90.
- [5] CANO-MARTINEZ A, VARGAS-GONZALEZ A, GUARNER-LANS V, et al. Functional and structural regeneration in the axolotl heart (*ambystoma mexicanum*) after partial ventricular amputation [J]. *Arch Cardiol Mex*, 2010, 80(2): 79-86.
- [6] 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.
- [7] JOPLING C, SLEEP E, RAYA M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation [J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 606-9.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] KIKUCHI K, HOLDWAY J E, WERDICH A A, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4*⁺ cardiomyocytes [J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 601-5.
- [11] YE L, D'AGOSTINO G, LOO S J, et al. Early regenerative capacity in the porcine heart [J]. *Circulation*, 2018, 138(24): 2798-808.
- [12] HAUBNER B J, SCHNEIDER J, SCHWEIGMANN U, et al. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2016, 118(2): 216-21.
- [13] QI Y, DASA O, MADEN M, et al. Functional heart recovery in an adult mammal, the spiny mouse [J]. *Int J Cardiol*, 2021, 338: 196-203.
- [14] KOOPMANS T, VAN BEIJNUM H, ROOVERS E F, et al. Ischemic tolerance and cardiac repair in the spiny mouse (*acomys*) [J]. *NPJ Regen Med*, 2021, 6(1): 78.
- [15] PENG H, SHINDO K, DONAHUE R R, et al. Adult spiny mice (*acomys*) exhibit endogenous cardiac recovery in response to myocardial infarction [J]. *NPJ Regen Med*, 2021, 6(1): 74.
- [16] GONZALEZ-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, e437.
- [17] PATTERSON M, BARSKE L, VAN HANDEL B, et al. Fre-

- quency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(9): 1346-53.
- [18] GUPTA V, POSS K D. Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis [J]. *Nature*, 2012, 484(7395): 479-84.
- [19] CHEN Y, LUTTMANN F F, SCHÖGER E, et al. Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice [J]. *Science*, 2021, 373(6562): 1537-40.
- [20] ZHANG R, HAN P, YANG H, et al. *In vivo* cardiac reprogramming contributes to zebrafish heart regeneration [J]. *Nature*, 2013, 498(7455): 497-501.
- [21] LODRINI A M, GOUMANS M J. Cardiomyocytes cellular phenotypes after myocardial infarction [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 750510.
- [22] PRONOBIS M I, POSS K D. Signals for cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration [J]. *Curr Opin Physiol*, 2020, 14: 78-85.
- [23] WU C C, KRUSE F, VASUDEVARAO M D, et al. Spatially resolved genome-wide transcriptional profiling identifies bmp signaling as essential regulator of zebrafish cardiomyocyte regeneration [J]. *Dev Cell*, 2016, 36(1): 36-49.
- [24] SALLIN P, DE PREUX CHARLES A S, DURUZ V, et al. A dual epimorphic and compensatory mode of heart regeneration in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2015, 399(1): 27-40.
- [25] OGAWA M, GENG F S, HUMPHREYS D T, et al. Kruppel-like factor 1 is a core cardiomyogenic trigger in zebrafish [J]. *Science*, 2021, 372(6538): 201-5.
- [26] XU S, XIE F, TIAN L, et al. Estrogen accelerates heart regeneration by promoting the inflammatory response in zebrafish [J]. *J Endocrinol*, 2020, 245(1): 39-51.
- [27] DU J, ZHENG L, GAO P, et al. A small-molecule cocktail promotes mammalian cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2022, 29(4): 545-58, e513.
- [28] HONKOOP H, DE BAKKER D E, AHARONOV A, et al. Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by *erbB2* signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart [J]. *eLife*, 2019, 8: e50163.
- [29] MIKLAS J W, LEVY S, HOFSTEEN P, et al. Amino acid primed mtor activity is essential for heart regeneration [J]. *iScience*, 2022, 25(1): 103574.
- [30] ZHU Y, DO V D, RICHARDS A M, et al. What we know about cardiomyocyte dedifferentiation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 152: 80-91.
- [31] WANG W E, LI L, XIA X, et al. Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury [J]. *Circulation*, 2017, 136(9): 834-48.
- [32] 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, 53(1): 102-16, e108.
- [33] WANG Z, CUI M, SHAH A M, et al. Cell-type-specific gene regulatory networks underlying murine neonatal heart regeneration at single-cell resolution [J]. *Cell Rep*, 2020, 33(10): 108472.
- [34] MISRA A, BAKER C D, PRITCHETT E M, et al. Characterizing neonatal heart maturation, regeneration, and scar resolution using spatial transcriptomics [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2021, 9(1): 1.
- [35] MUNCH J, GRIVAS D, GONZALEZ-RAJAL A, et al. Notch signalling restricts inflammation and *serpine1* expression in the dynamic endocardium of the regenerating zebrafish heart [J]. *Development*, 2017, 144(8): 1425-40.
- [36] KARRA R, KNECHT A K, KIKUCHI K, et al. Myocardial *nf-kappaB* activation is essential for zebrafish heart regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(43): 13255-60.
- [37] LU F, LANGENBACHER A, CHEN J N. *Tbx20* drives cardiac progenitor formation and cardiomyocyte proliferation in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2017, 421(2): 139-48.
- [38] FANG Y, LAI K S, SHE P, et al. *Tbx20* induction promotes zebrafish heart regeneration by inducing cardiomyocyte dedifferentiation and endocardial expansion [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 738.
- [39] PENG X, LAI K S, SHE P, et al. Induction of *wnt* signaling antagonists and *p21*-activated kinase enhances cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration [J]. *J Mol Cell Biol*, 2021, 13(1): 41-58.
- [40] ZHAO L, BEN-YAIR R, BURNS C E, et al. Endocardial notch signaling promotes cardiomyocyte proliferation in the regenerating zebrafish heart through *wnt* pathway antagonism [J]. *Cell Rep*, 2019, 26(3): 546-54, e545.
- [41] PFEFFERLI C, JAZWINSKA A. The *careg* element reveals a common regulation of regeneration in the zebrafish myocardium and fin [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15151.
- [42] BEN-YAIR R, BUTTY V L, BUSBY M, et al. *H3k27me3*-mediated silencing of structural genes is required for zebrafish heart regeneration [J]. *Development*, 2019, 146(19): dev178632.
- [43] 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.
- [44] FUKUDA R, MARIN-JUEZ R, EL-SAMMAK H, et al. Stimulation of glycolysis promotes cardiomyocyte proliferation after injury in adult zebrafish [J]. *EMBO Rep*, 2020, 21(8): e49752.
- [45] IKEDA S, MIZUSHIMA W, SCIARRETTA S, et al. *Hippo* deficiency leads to cardiac dysfunction accompanied by cardiomyocyte dedifferentiation during pressure overload [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 292-305.
- [46] DE WIT L, FANG J, NEEF K, et al. Cellular and molecular mechanism of cardiac regeneration: a comparison of newts, zebrafish, and mammals [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(9): 1204.
- [47] YOUNG A, BRADLEY L A, WOLF M J. *In vivo* methods to monitor cardiomyocyte proliferation [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2022, 9(3): 73.
- [48] HUANG W, FENG Y, LIANG J, et al. Loss of *microrna-128* promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 700.
- [49] URIBE V, RAMADASS R, DOGRA D, et al. *In vivo* analysis of cardiomyocyte proliferation during trabeculation [J]. *Development*, 2018, 145(14): dev164194.
- [50] ALI S R, HIPPEMEYER S, SAADAT L V, et al. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(24): 8850-5.
- [51] LIVET J, WEISSMAN T A, KANG H, et al. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system [J]. *Nature*, 2007, 450(7166): 56-62.

- [52] SERETI K I, NGUYEN N B, KAMRAN P, et al. Analysis of cardiomyocyte clonal expansion during mouse heart development and injury [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 754.
- [53] BRADLEY L A, YOUNG A, LI H, et al. Loss of endogenously cycling adult cardiomyocytes worsens myocardial function [J]. *Circ Res*, 2021, 128(2): 155-68.
- [54] GONZALEZ-ROSA J M, BURNS C E, BURNS C G. Zebrafish heart regeneration: 15 years of discoveries [J]. *Regeneration*, 2017, 4(3): 105-23.
- [55] ROCHAIS F, STURNY R, CHAO C M, et al. Fgf10 promotes regional foetal cardiomyocyte proliferation and adult cardiomyocyte cell-cycle re-entry [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 104(3): 432-42.
- [56] TAHARA N, AKIYAMA R, WANG J, et al. The fgf-akt pathway is necessary for cardiomyocyte survival for heart regeneration in zebrafish [J]. *Dev Biol*, 2021, 472: 30-7.
- [57] DIAZ DEL MORAL S, BENAOUICHA M, MUNOZ-CHAPULI R, et al. The insulin-like growth factor signalling pathway in cardiac development and regeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23(1): 234.
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] GEMBERLING M, KARRA R, DICKSON A L, et al. Nrg1 is an injury-induced cardiomyocyte mitogen for the endogenous heart regeneration program in zebrafish [J]. *eLife*, 2015, 4: e05871.
- [61] 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.
- [62] JOPLING C, SUNE G, MORERA C, et al. P38alpha mapk regulates myocardial regeneration in zebrafish [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(6): 1195-201.
- [63] HAN P, ZHOU X H, CHANG N, et al. Hydrogen peroxide primes heart regeneration with a derepression mechanism [J]. *Cell Res*, 2014, 24(9): 1091-107.
- [64] MISSINATO M A, SAYDMOHAMMED M, ZUPPO D A, et al. Dusp6 attenuates ras/mapk signaling to limit zebrafish heart regeneration [J]. *Development*, 2018, 145(5): dev157206.
- [65] ENGEL F B, SCHEBESTA M, DUONG M T, et al. P38 map kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(10): 1175-87.
- [66] MAILLET M, PURCELL N H, SARGENT M A, et al. Dusp6 (mkp3) null mice show enhanced erk1/2 phosphorylation at baseline and increased myocyte proliferation in the heart affecting disease susceptibility [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(45): 31246-55.
- [67] LI H, CHANG C, LI X, et al. The roles and activation of endocardial notch signaling in heart regeneration [J]. *Cell Regen*, 2021, 10(1): 3.
- [68] RAYA A, KOTH C M, BUSCHER D, et al. Activation of notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(Suppl 1): 11889-95.
- [69] GALVEZ-SANTISTEBAN M, CHEN D, ZHANG R, et al. Hemodynamic-mediated endocardial signaling controls *in vivo* myocardial reprogramming [J]. *eLife*, 2019, 8: e44816.
- [70] LI X, LU Q, PENG Y, et al. Primary cilia mediate klf2-dependant notch activation in regenerating heart [J]. *Protein Cell*, 2020, 11(6): 433-45.
- [71] ZHAO L, BORIKOVA A L, BEN-YAIR R, et al. Notch signaling regulates cardiomyocyte proliferation during zebrafish heart regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(4): 1403-8.
- [72] COLLESI C, ZENTILIN L, SINAGRA G, et al. Notch1 signaling stimulates proliferation of immature cardiomyocytes [J]. *J Cell Biol*, 2008, 183(1): 117-28.
- [73] FELICIAN G, COLLESI C, LUSIC M, et al. Epigenetic modification at notch responsive promoters blunts efficacy of inducing notch pathway reactivation after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2014, 115(7): 636-49.
- [74] COLLESI C, FELICIAN G, SECCO I, et al. Reversible notch1 acetylation tunes proliferative signalling in cardiomyocytes [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(1): 103-22.
- [75] URIBE V, RAMADASS R, DOGRA D, et al. *In vivo* analysis of cardiomyocyte proliferation during trabeculation [J]. *Development*, 2018, 145(14): dev164194.
- [76] CHABLAIS F, JAZWINSKA A. The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on tgfbeta signaling [J]. *Development*, 2012, 139(11): 1921-30.
- [77] DOGRA D, AHUJA S, KIM H T, et al. Opposite effects of activin type 2 receptor ligands on cardiomyocyte proliferation during development and repair [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1902.
- [78] COSTA A, CUSHMAN S, HAUBNER B J, et al. Neonatal injury models: integral tools to decipher the molecular basis of cardiac regeneration [J]. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117(1): 26.
- [79] XIN M, KIM Y, SUTHERLAND L B, et al. Hippo pathway effector yap promotes cardiac regeneration [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(34): 13839-44.
- [80] LIU S, TANG L, ZHAO X, et al. Yap promotes noncanonical wnt signals from cardiomyocytes for heart regeneration [J]. *Circ Res*, 2021, 129(8): 782-97.
- [81] FLINN M A, JEFFERY B E, O'MEARA C C, et al. Yap is required for scar formation but not myocyte proliferation during heart regeneration in zebrafish [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(3): 570-7.
- [82] LIU S, LI K, WAGNER FLORENCIO L, et al. Gene therapy knockdown of hippo signaling induces cardiomyocyte renewal in pigs after myocardial infarction [J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(600): eabd6892.
- [83] MOHAMED T M A, ABOULEISA R, HILL B G. Metabolic determinants of cardiomyocyte proliferation [J]. *Stem Cells*, 2022, 50(5): 458-67.
- [84] BAE J, SALAMON R J, BRANDT E B, et al. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration [J]. *Circulation*, 2021, 143(20): 1973-86.
- [85] JOPLING C, SUNE G, FAUCHERRE A, et al. Hypoxia induces myocardial regeneration in zebrafish [J]. *Circulation*, 2012, 126(25): 3017-27.
- [86] NAKADA Y, CANSECO D C, THET S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice [J]. *Nature*, 2017, 541(7636): 222-7.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] SINGH M K, LI Y, LI S, et al. Gata4 and gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(3): 1765-72.
- [90] MALEK MOHAMMADI M, KATTIH B, GRUND A, et al. The transcription factor gata4 promotes myocardial regeneration in neonatal mice [J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(2): 265-79.
- [91] MAHMOUD A I, KOCABAS F, MURALIDHAR S A, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest [J]. *Nature*, 2013, 497(7448): 249-53.
- [92] 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, e112.
- [93] 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.
- [94] LEACH J P, HEALLEN T, ZHANG M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction [J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 260-4.
- [95] AHARONOV A, SHAKKED A, UMANSKY K B, et al. Erbb2 drives yap activation and emt-like processes during cardiac regeneration [J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(11): 1346-56.
- [96] TORRINI C, CUBERO R J, DIRKX E, et al. Common regulatory pathways mediate activity of micRNAs inducing cardiomyocyte proliferation [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(9): 2759-71, e2755.
- [97] HARA H, TAKEDA N, KONDO M, et al. Discovery of a small molecule to increase cardiomyocytes and protect the heart after ischemic injury [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2018, 3(5): 639-53.
- [98] KASTAN N, GNEDEVA K, ALISCH T, et al. Small-molecule inhibition of lats kinases may promote yap-dependent proliferation in postmitotic mammalian tissues [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3100.
- [99] YOUNG A, BRADLEY L A, FARRAR E, et al. Inhibition of dyrk1a enhances cardiomyocyte cycling after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2022, 130(9): 1345-61.