



陈静海, 博士, 浙江大学医学院研究员, 博士生导师, 浙江省海外高层次人才引进特聘专家。一直致力于心血管疾病与心脏再生领域的研究。主要利用动物遗传模型及基因治疗手段探索研究心脏损伤后心肌再生修复的分子机制及转化应用。

非编码RNAs在心肌细胞增殖与心脏再生中的作用

董晓璇^{1, 2#} 蒲林彬^{1, 2#} 陈静海^{1, 2*}

¹浙江大学医学院附属第二医院, 浙江省心血管病诊治重点实验室, 杭州 310009;

²浙江大学医学院转化医学研究院, 杭州 310029)

摘要 心肌梗死以高发病率、高致死率的特点严重影响人类健康, 并造成了极大的社会经济负担。促进心肌细胞增殖与再生是修复缺血导致的心脏损伤的关键。越来越多的研究表明, 非编码RNAs参与调控心肌细胞的增殖与再生。该文总结了小RNAs(microRNAs, miRNAs)、长链非编码RNAs(long non-coding RNAs, lncRNAs)以及环状RNAs(circular RNAs, circRNAs)参与调控心肌细胞增殖与再生、修复损伤心脏及其相关的分子机制。此外, 该文还展望了非编码RNAs促进心肌细胞增殖的潜在治疗作用以及心脏损伤后应用RNA治疗进行再生修复的前景。

关键词 心肌细胞增殖; 基因治疗; 非编码RNAs

Non-Coding RNAs in Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration

DONG Xiaoxuan^{1, 2#}, PU Linbin^{1, 2#}, CHEN Jinghai^{1, 2*}

¹Provincial Key Lab of Cardiovascular Research, Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China; ²Institute of Translational Medicine, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310029, China)

Abstract Myocardial infarction is associated with high incidence and mortality, which seriously impacts on human health and places a heavy economic burden on countries worldwide. Stimulating cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration is a key to repair the injured heart caused by ischaemia. Emerging evidences have demonstrated that non-coding RNAs play important roles in cardiac proliferation and regeneration. This

收稿日期: 2022-04-22 接受日期: 2022-08-05

浙江省自然科学基金重点项目(批准号: LZ20H020001)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 81970227)资助的课题

*共同第一作者

*通讯作者。Tel: 15869114168, E-mail: Jinghaichen@zju.edu.cn

Received: April 22, 2022 Accepted: August 5, 2022

This work was supported by the Zhejiang Provincial NSF Project (Grant No.LZ20H020001), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81970227)

[#]These authors contributed equally to the work

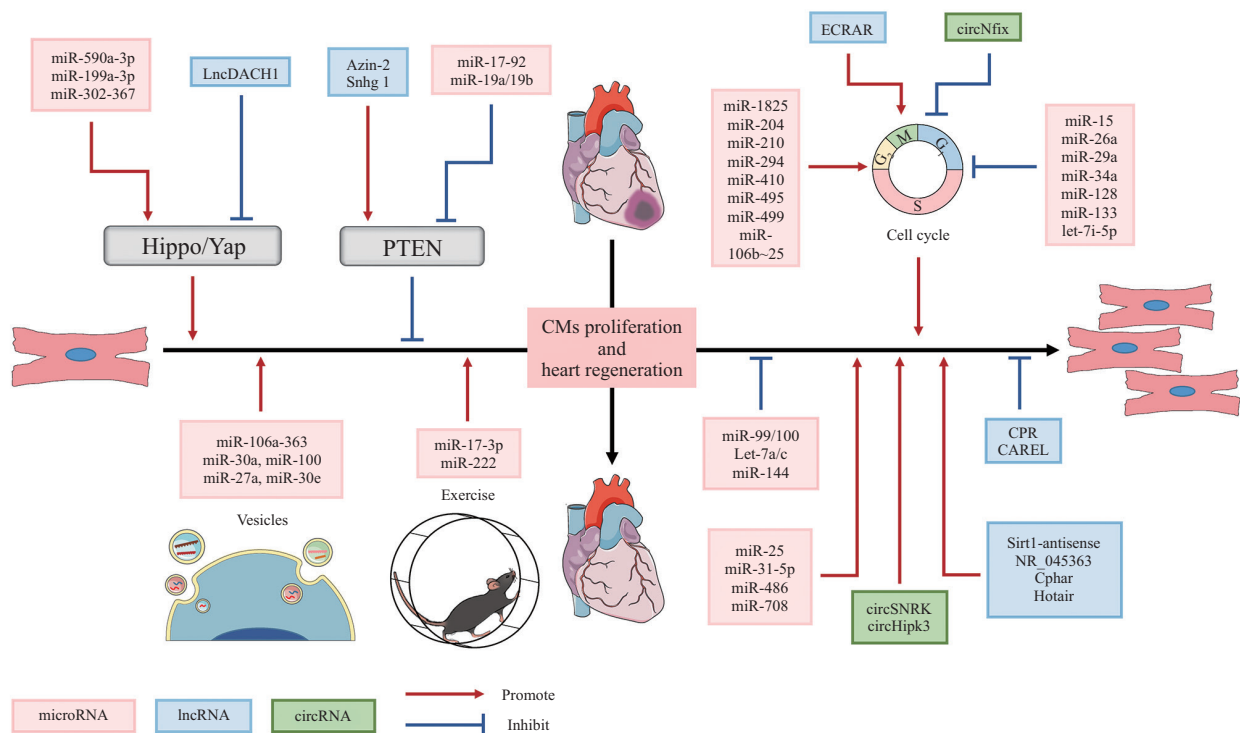
*Corresponding author. Tel: +86-15869114168, E-mail: Jinghaichen@zju.edu.cn

review focuses on the function and mechanism that miRNAs (microRNAs), lncRNAs (long non-coding RNAs) and circRNAs (circular RNAs) modulate cardiomyocyte proliferation and regeneration to mend a damaged heart. Furthermore, the potential therapeutic roles of these non-coding RNAs in boosting cardiomyocytes proliferation is highlighted. Finally, this review presents the perspective on the development of non-coding RNA therapy in heart diseases by regeneration.

Keywords cardiomyocyte proliferation; gene therapy; non-coding RNAs

成年哺乳动物的心肌细胞通常被认为是不具有再生能力的终末分化细胞。心肌细胞仅在胎儿的发育过程中具有增殖能力, 出生后心肌增殖能力便很快丧失。在出生后不久, 心肌细胞会发生一系列的转变, 使心肌细胞的主要生长模式由细胞数量的增加转变为细胞大小和肌纤维密度的增加^[1]。近年来, 研究人员通过¹⁴C年代测定法计算出人类心肌细胞在出生后的更新率约为每年1%, 但是随着年龄的增长, 更新率下降至0.3%^[2]。另一项研究表明, 人类出生后心脏发育和成长过程(1至20岁)中, 左心室心肌细胞数量增加了3.4倍, 表明在儿童期或者青少年期的心肌细胞发生了增殖, 心脏在这一阶段损伤后可能可以再生^[3]。越来越多的研究证明, 再生的成年哺

乳动物的心肌细胞来源于已经存在的心肌细胞的增殖, 而不是来源于内源性的祖细胞^[4-5]。这些研究表明, 哺乳动物心肌细胞具有增殖的潜能, 但是在生理病理条件下心肌内源性的增殖能力有限, 不足以再生修复心肌损伤后的心脏功能。因此, 探寻有效促进心肌细胞内源增殖的信号通路与调控因子, 对于心脏疾病损伤后的再生与功能修复具有重要意义。近期的研究不断地发现了在心肌细胞中, 生长因子、内部信号通路、非编码RNA、细胞周期调节因子以及最近发现的人工合成小分子化合物可以有效地促进心肌细胞重新进入细胞周期并增殖再生^[6-10]。我们在本文中总结了非编码RNA对于心肌细胞增殖和心脏再生的调控以及其潜在的治疗作用(图1)。



miRNAs、lncRNAs和circRNAs分别为红、蓝、绿色框。箭头代表促进心肌增殖, 钝端箭头代表抑制心肌增殖。

miRNAs, lncRNAs and circRNAs are represented by red, blue and green boxes, respectively. The arrow indicates the promoting effect and the blunt end arrow indicates the inhibiting effect.

图1 miRNAs、lncRNAs以及circRNAs调控心肌细胞增殖促进损伤心脏再生及其相关的分子机制

Fig.1 miRNAs, lncRNAs and circRNAs regulate cardiomyocyte proliferation to promote heart regeneration after injury

1 非编码RNA调控心肌细胞增殖

真核生物基因组所转录的RNA总量中, 蛋白质编码基因转录的RNA所占比例不到2%, 大多数为转录后不编码蛋白质的非编码RNA^[11]。大量研究表明, 非编码RNA在生理状态下和疾病过程中均发挥着重要的作用, 非编码RNA根据长度主要分成两种: 一种是长度小于200个核苷酸的小非编码RNA, 包括rRNA、tRNA、miRNA、PIWI-interacting RNA等; 另一种是长度大于200个核苷酸且不具有蛋白质编码能力的长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)^[12-14]。

1.1 促进心肌细胞增殖的miRNA

在心血管系统中, miRNA在心脏的发育^[15-16]、疾病^[17-18]和再生^[19-20]等生理病理进程中发挥着重要的功能。已有一些综述有相关总结, 本文仅聚焦miRNA调控心肌增殖的作用及其机制。

1.1.1 靶向Hippo-Yap信号通路 研究者应用高内涵显微镜针对心肌增殖表型进行高通量筛选, 发现hsa-miR-590和hsa-miR199a能够有效地促进新生小鼠和大鼠心肌细胞的DNA合成和胞质分裂, 并且在心梗后, 促进心脏再生保护心脏功能^[21]。在胚胎发育期心肌细胞内通过Cre-LoxP系统特异性地敲除miR-302-367家族发现该家族是心肌细胞增殖所必需的^[22], 应用遗传谱系示踪技术也证明了小鼠心脏内注射Gel-miR-302能有效促进心肌细胞增殖^[23]。miRNAs的作用是基于靶向多个靶标蛋白累积产生的结果, 而调控细胞增殖的关键信号通路Hippo/Yap是多数促增殖的miRNA的重要靶向通路。例如miR-590、miR-199a和miR-302-367家族在内的很多miRNA都是通过靶向Hippo信号通路组分(Lats2、Mob1和Mst1)以及激活Yap并诱导Yap应答基因的表达来发挥促进心肌细胞增殖的作用^[22,24-25]。

1.1.2 调控细胞周期 调控细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶以及在胎儿期高表达的调节因子均能促进成年心肌细胞重新进入细胞周期^[26], 而miRNA可能通过靶向调节这些蛋白的表达进一步调控心肌细胞周期。在上述的高通量心肌增殖表型筛选中, 除miR-590、miR-199a以外, miR-1825也是其中促心肌增殖非常有效miRNA^[21]。miR-1825能够促进成年大鼠心肌细胞的增殖并改善心梗后的心脏功能^[27]。miR-1825上调了CyclinD1的表达并下调了细胞周期抑制因子P16的表达, 通过调控细胞周期调节心

肌细胞的增殖, 同时miR-1825还可促进miR-199a的表达、减少线粒体数量以及降低ROS和DNA损伤等多途径调控心肌增殖^[27]。miR-204促进人来源的心肌祖细胞增殖和分化^[28], 转基因小鼠心脏高表达miR-204能够靶向细胞周期调节因子Jarid2促使发育过程中心肌细胞的增殖, 从而使小鼠心脏室壁增厚^[29]。miR-210在很多心脏疾病中高表达, 心肌内注射miR-210能够减轻心脏缺血产生的损伤^[30], 对成年大鼠心肌细胞转染miR-210能够增加心肌细胞的数量并且抑制凋亡^[31]。miR-210过表达的转基因小鼠在心脏损伤后通过心肌增殖以及血管新生来恢复心脏功能^[31], 并且miR-210是通过靶向细胞周期抑制因子APC、P16等参与经典的Wnt信号通路发挥作用^[31]。miR-294在胚胎期心脏发育过程中高表达, 在心脏发育成熟后表达量迅速下降, miR-294能够促进新生大鼠心肌细胞和猫科动物成年心肌细胞进入细胞周期^[32], 其可能的机制是miR-294减弱Wee1对细胞周期的抑制作用, 从而增加细胞周期蛋白B1/CDK1复合体的活性来促进心肌细胞的增殖^[32]。来自Gtl2-Dio3 miRNAs家族的miR-410和miR-495通过靶向转录辅助因子CITED2, 降低CITED2介导的细胞周期抑制因子Cdkn1c/p57/Kip2的表达, 进而促进新生大鼠心肌细胞的增殖^[33]。miR-499能促进小鼠P19CL6细胞向心肌细胞分化, 并且能够直接靶向SOX6的3'UTR区, 负向调控细胞周期蛋白D1的转录, 从而促进新生大鼠心肌细胞的增殖以及减少P19CL6细胞分化后期凋亡的发生^[34]。在新生期心肌内高表达的miR-106b~25家族通过靶向细胞周期抑制因子(E2f5、dkn1c、Ccne1和Wee1)和调控心肌肥大的关键因子(Hand2、Mef2d)协调心肌细胞生长^[35]。心肌缺血损伤后通过AAV9递送miR-106b~25后可使心脏几乎完全再生^[35]。

1.1.3 其他作用机制 运动可以促进心脏生理性生长、心肌细胞体积增加和增殖标志物表达上调并防止心脏的病理性重构, 其中miRNAs参与调控了重要分子机制。运动(如游泳)诱导miR-17-3p在小鼠的心室内表达增加, 并促进心肌生理性体积增大和存活以及增殖, 而抑制miR-17-3p的表达则会逆转这些表型^[36]。miR-17-3p也能够抑制TIMP3的表达, 从而逆转TIMP3下游EGFR/JNK/SP-1通路抑制乳鼠心肌细胞增殖的作用^[37]。此外, miR-17-3p还能间接调控PTEN来促使心肌细胞生理性增大^[36]。另外, 甲基转移酶样蛋白3(methyltransferase-like 3, METTL3)可

通过增强miR-17-3p的表达来促进心梗后心肌增殖以及心脏再生过程^[38]。miR-222是另一个重要的运动诱导增殖相关的miRNA。运动引起miR-222的表达上调, 心肌特异性地过表达miR-222能够通过靶向p27、HIPK1和Hmbox1来诱导心肌细胞的生理性生长和增殖并抑制凋亡, 从而减轻心脏缺血损伤后发生的心脏病理性重构和功能异常^[39]。通过多同位素成像质谱法(multiisotope imaging mass spectrometry, MIMS)同样也发现, 运动能够促进正常或者损伤心脏的心肌细胞生成, 而抑制miR-222则会阻止运动诱导的心肌细胞生成^[40]。

miR-17-92簇最初被报道为人类致癌基因, 被命名为oncomir1。一系列小鼠遗传模型的研究表明, miR-17-92是胚胎期以及出生后心肌细胞增殖所必需的, 过表达miR-17-92可以显著促进包括胚胎期、出生后以及成年小鼠的心肌细胞的增殖, 并且通过抑制Pten对心梗后心脏产生保护作用^[41]。miR-19a/19b作为miR-17-92家族的重要成员, 在心衰病人的心脏中高表达, 过表达miR-19a/19b可以靶向Pten、Bim1和SOCS1/3来促进心肌细胞增殖, 抑制细胞凋亡和炎症, 对心梗后心脏在早期以及长效均有保护作用^[42]。与这些结果一致的是, 心肌特异性Pten缺失促进了心梗后心肌增殖和心脏修复^[43]。miR-25也是miR-17-92家族成员之一, miR-25可通过靶向Bim促进心肌细胞增殖与迁移^[44]。

miR-31-5p能够通过靶向RhoBTB1来促进新生大鼠心肌细胞增殖, 其在小鼠出生后第10天的表达量相比于第1天明显上调, 这种上调可能是心肌细胞响应退出细胞周期所产生的补偿性机制^[45]。miR-486是体内响应心肌拉伸而表达上调的一个miRNA, 用miR-486 mimic处理新生小鼠发现, miR-486能够显著促进心室壁的生长和心肌细胞的增殖却不影响室壁的厚度和心脏功能, 进一步研究发现, miR-486能够间接降低FoxO1和Smad信号的传递同时增加与Gata4和Srf相关的Stat1的表达水平来促进心肌细胞增殖^[46]。

人iPSC来源的心肌细胞可分泌调节心脏稳态和心肌再生的胞外囊泡, 缺氧处理这些囊泡后可上调miR-106a-363家族的表达量。转录组测序表明, miR-106a-363通过抑制Jag1-Notch3-Hes1促进心肌增殖, 通过siRNA干扰Notch3也同样可促进心肌细胞的增殖^[47]。心外膜也可分泌胞外囊泡并促进乳鼠

心肌增殖、增强冷冻损伤人工心肌的修复能力, 通过测序发现在这些囊泡中存在高丰度的促细胞增殖的miRNAs, 如miR-30a、miR-100、miR-27a和miR-30e, 在乳鼠心肌细胞中过表达这些miRNAs可以促进细胞增殖^[48]。

1.2 抑制心肌细胞增殖的miRNA

1.2.1 miR-1-2/miR-133a-1 和 miR-1-1/miR-133a-2
miR-1-1和miR-1-2是心肌与骨骼肌高表达的miRNA。在心脏发育过程中它们在心室特异性表达并在分化过程中被激活。利用含有 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)启动子的转基因小鼠可实现在胚胎期高表达目的基因, 此时高表达miR-1可靶向抑制Hand2导致小鼠心室壁变薄以及心肌细胞增殖减少^[49]。敲除miR-1-2会导致绝大部分小鼠在胚胎期15.5天死于室间隔缺损, 而剩下的约15%的小鼠存活2~3个月后会因为电生理缺陷突发死亡, 其原因是miR-1-2靶向抑制Irx5^[50]。此外, miR-1-2缺失还能增加心肌细胞的增殖从而导致大部分小鼠的心室壁增厚^[50]。

miR-1-2和miR-133a-1(间隔~2.5 Kb)以及miR-1-1和miR-133a-2(间隔~9 Kb)分别形成双顺反子结构, 它们转录出的miR-133a-1和miR-133a-2具有完全相同的序列, 并都在心肌和骨骼肌中特异表达^[51]。单独敲除miR-133a-1或者miR-133a-2的小鼠表型正常, 但同时敲除这两个miRNAs则会导致一半的小鼠死于胚胎晚期或者出生后死于室间隔缺损, 存活到成年的小鼠则患有扩张型心肌病, 主要原因是miR-133a的缺失导致miR-133a对SRF和细胞周期蛋白D2的抑制减弱^[51]。斑马鱼心尖切除后心脏可自行再生, 在此模型中miR-133表达下降, 过表达miR-133则会抑制斑马鱼的心脏再生, 而敲除miR-133则会促进心脏再生。机制方面, miR-133通过靶向细胞周期调节因子以及Cx43抑制细胞增殖^[52]。在另一项关于绵羊的研究中发现, miR-133随着绵羊的年龄增加而表达上调, miR-133的靶基因IGF1R则随年龄增加而表达下降, 但其他的靶基因如CCND2、SRF、PGAM1和GJA1(Cx43)并未随着miR-133表达的上调而下降, 因此, miR-133的调控作用也有可能是通过间接的信号通路产生的^[53]。

1.2.2 细胞周期调控 miR-15家族的上调可能与小鼠出生后心肌细胞退出细胞周期相关, 在胚胎期过表达miR-15家族成员之一的miR-195会导致部分

小鼠死于室间隔缺损和心室发育不全^[54], miR-15家族还能够抑制初生小鼠的心脏再生能力^[55], 研究人员通过RISC-seq发现miR-15家族可通过直接靶向G₂/M检查点所必需的检查点激酶1(checkpoint kinase 1, Chk1)负向调控细胞周期^[54-56]。miR-26a在斑马鱼损伤心脏中表达下降而在小鼠损伤心脏中表达不变, 它能够靶向多梳抑制复合物2(polycomb repressive complex2, PRC2)中的Ezh2, 抑制miR-26a会促进乳鼠心肌细胞的增殖^[57]。miR-29a在小鼠成年后表达上调, 抑制miR-29a可以通过靶向CCND2促进H9c2和新生大鼠心肌细胞的增殖^[58]。CCND2也是抑制增殖型miRNA let-7i-5p的靶标, 抑制let-7i-5p则促进心肌细胞增殖以及心肌梗死后的功能恢复^[59]。与miR-29a类似的还有miR-30a和miR-141家族, 其在成年小鼠心肌细胞中表达上调, 抑制miR-29a、miR-30a和miR-141的表达均能促进新生大鼠心肌细胞重新进入细胞周期^[60]。另外, miR-34a能抑制初生小鼠心脏的增殖和再生能力, 而它主要是通过调控靶基因*cyclin D1*、*Bcl2*和*Sirt1*调控细胞周期的^[61]。在小鼠心肌细胞从增殖状态向终末分化转变过程中, miR-128的表达也会上调, 抑制miR-128可促进心肌细胞进入细胞周期, 机制上抑制miR-128后可促进SUZ12的表达上调, 进而抑制p27的表达以及激活*cyclin E*和CDK2促进细胞增殖^[62]。

1.2.3 其他 miR-99/100和let-7a/c在斑马鱼心脏再生过程中表达量显著下调, 它们的靶蛋白FNTβ和SMARCA5在哺乳动物的基因组中也是保守的, 心脏注射miR-99/100 mimic会抑制心肌细胞的增殖, 而抑制miR-99/100和let-7a/c或者上调FNTβ/SMARCA5的表达均能促进哺乳动物心肌细胞增殖^[63]。

1.3 lncRNA调控心肌细胞增殖的作用与机制

近年来越来越多的研究发现, lncRNA在各种生物学过程中发挥着重要的作用。lncRNA由RNA聚合酶II加工产生, 除了一些特定的不需要多聚腺苷酸化的lncRNA外^[64-65], 它们也需要5'端加帽、3'端的多聚腺苷酸化以及剪切形成成熟的lncRNA, 但是它们几乎不会翻译成蛋白质^[66]。lncRNA在细胞核和细胞质中都有分布, 细胞核中的lncRNA根据行使功能的不同可将它们简单分为信号、诱饵、引导、支架以及增强子这几类, 而胞质中的lncRNA主要是将自己与核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)结合形成一个复合体, lncRNA可以像一个海绵一样吸附

miRNA并与mRNA结合来影响mRNA的稳定性^[67]。在此, 我们主要总结了lncRNA在调控心肌细胞增殖和心脏修复过程中的作用。

1.3.1 lncRNA促进心肌细胞增殖 在胚胎期心脏发育过程中, 心肌细胞增殖活跃、心肌梗死等病理损伤也会刺激心肌细胞增殖。研究人员利用转录组学分析比较胚胎期与成年后心脏表达筛选出了多个与心肌细胞增殖相关的lncRNA。与成年人相比, ECRAR、Sirt-1的反义lncRNA以及Snhg1在胎儿阶段表达量更高, 在细胞水平过表达或敲降的功能实验均表明, 这些lncRNA与心肌细胞的增殖能力呈正相关^[68-70]。机制研究发现, E2F1激活ECRAR的转录促进了ERK1/2的磷酸化, 磷酸化的ERK1/2进而促进*cyclin D1*、*cyclin E1*和E2F1的表达并形成正反馈^[68]。Sirt-1的反义lncRNA能与*Sirt-1*的mRNA的3'非翻译区(untranslated regions, UTR)互补并通过与*Sirt-1*的mRNA结合来提高其稳定性和促进心肌细胞增殖^[69]。Snhg1可直接结合并诱导PTEN降解, 通过激活PI3K/Akt信号通路促进心肌增殖^[70]。转录因子c-myc作为PI3K/Akt信号通路的下游靶标, 又可结合在*Snhg1*的启动子上, 形成正反馈途径进一步促进心肌增殖^[70]。lncRNA NR-045363是人CDK6的反义lncRNA, 它在小鼠胚胎发育过程中表达下调, 而在小鼠心尖切除后表达上调并与心肌细胞增殖呈现正相关趋势, 利用AAV过表达NR-045363能显著促进心梗后心肌细胞的增殖并改善心功能, NR-045363通过吸附miR-216a使其无法发挥负向调控靶基因的作用, 进而通过JAK/STAT3促进心肌细胞的增殖^[71]。在慢性心力衰竭患者心脏中, lncRNA LUCAT1的表达量显著下降, 细胞水平实验表明, 抑制LUCAT1会通过miR612/HOXA13通路抑制心肌细胞增殖以及促进心肌细胞凋亡^[72]。lncRNA Hotair可结合LSD1/CoREST/REST复合体帮助LSD1识别靶基因。Hotair和LSD1在小鼠出生一周内高表达, 这与心肌再生的时间窗相符, 在体内抑制Hotair或LSD1均会导致心肌细胞有丝分裂停滞在S期, 从而阻碍小鼠心尖切除后的心脏再生过程^[73]。

与miRNA相似, lncRNA也参与调控运动诱导的生理性心肌肥厚与心肌增殖。通过微阵列芯片筛选出的运动诱导的CPhar在生理性心肌肥厚中高表达, 运动后, CPhar促进了心肌细胞的生理性肥厚生长和心肌增殖, 并且减少了心肌细胞的凋亡。机制上,

CPhar以分子支架作用促进DDX7与CEBP β 的结合, 形成复合体, 从而抑制C/EBP β 下游转录因子ATF7的表达, 在运动及缺血再灌注损伤模型中发挥保护作用^[74]。

1.3.2 lncRNA抑制心肌细胞增殖 与上述LUCAT1相反, LncDACH1在慢性心力衰竭患者心脏中的表达量会升高, 在小鼠心脏特异性过表达LncDACH1会抑制小鼠心尖切除后的再生修复, 而抑制LncDACH1表达则能促进心肌细胞再进入细胞周期^[75]。LncDACH1能够直接与蛋白磷酸酶1的 α 催化亚基结合以抑制其去磷酸化活性, 同时促进YAP1的磷酸化并减少YAP1转位进入细胞核来抑制心肌细胞的增殖^[75]。

通过对人类胎儿以及成年人的心脏RNA-seq数据进行分析发现, AZIN2-sv和CRRL与细胞周期相关蛋白的编码基因相关, 并且随着年龄的增长, 它们的表达量也显著升高^[76-77]。过表达AZIN2-sv和CRRL均能抑制心肌细胞的增殖, 而在初生或成年大鼠中抑制AZIN2-sv和CRRL均可促进心肌细胞的增殖与心脏再生, 减少心室重构并改善心功能^[76-77]。二者都主要分布在细胞质并以ceRNA的方式吸附miRNAs发挥抑制细胞增殖的作用。AZIN2-sv与miR-214结合并释放PTEN, 从而阻碍了PI3K/Akt通路的激活^[76]; 而CRRL则是与miR-199a-3p结合进而增加了miR-199a-3p下游靶点Hoxp的表达量来实现对细胞周期的抑制^[77]。

与胚胎期小鼠心脏相比, CPR在成年小鼠心肌细胞中高表达, 全身性敲除CPR对小鼠的心功能没有影响, 但是会促进其出生后以及病理状态下的心肌细胞增殖, 心脏特异性过表达CPR会导致心肌梗后心脏功能更差以及更大的梗死疤痕面积^[78]。机制研究表明, CPR招募DNMT3a甲基化CpG进而抑制DNA复制与细胞周期起始子MCM3(minichromosome maintenance 3)的表达, 最终影响心肌细胞的增殖^[78]。

类似地, lncRNA CAREL随着生长发育不断表达上调, 心脏特异性过表达CAREL会抑制小鼠心尖切除后的心肌细胞增殖以及心脏再生, 而敲除CAREL则会减少心肌梗后疤痕的面积、改善心功能以及促进心肌细胞再进入细胞周期^[79]。CAREL作为miR-296的内源性竞争者, 它抑制了miR-296对其靶基因*Trp53inp1*和*Itm2*的表达调控, 进而抑制了

miR-296促心肌细胞增殖的作用^[79]。

1.4 环状RNAs(circRNAs)调控心肌细胞增殖的作用与机制

circRNA是通过其3'末端与5'末端相连接形成的, 与非环状的RNA相比具有更高的稳定性, 在调控通路中发挥着重要作用^[80-81]。与超级增强子相关的circNfix在成年心脏中高表达且主要位于心肌细胞的细胞质部分, circNfix具有负向调控心肌细胞增殖的作用, 通过AAV9介导的circNfix敲降可以显著促进成年心肌细胞的增殖和去分化^[82]。机制上circNfix主要是通过抑制心肌细胞的增殖以及抑制血管生成这两条独立的途径来阻碍心脏再生的^[82]。其中, 转录因子Meis1与circNfix的超级增强子结合, 促进Nfix的转录与环化, 然后circNfix促进了Ybx1与Nedd41的相互作用导致Ybx1的泛素化和降解, 进而使cyclin A2和cyclin B1表达受到抑制^[82]; 此外, circNfix会吸附miR-214并抑制miR-214与其靶点Gsk3 β 的结合来促进 β -catenin的表达进而抑制血管生成^[82]。

CircSNRK在大鼠心肌梗后表达下降, 但心肌梗后过表达circSNRK减少了心肌凋亡, 促进了心肌增殖与血管再生, 改善了心肌梗后的心能力。机制上, circSNRK通过吸附miR-103-3p来增加SNRK的表达, 而后SNRK通过结合GSK3 β 促进心肌梗后的心脏再生^[83]。

CircHpk3在胚胎期以及新生期的心脏中高表达, 具有促进心肌细胞生成和血管生成的重要作用^[84]。机制上, circHpk3通过乙酰化增加Notch1胞内结构域的稳定性, 防止其降解以促进心肌细胞增殖, 另外circHpk3可通过吸附miR-133a来增加CTGF的表达, 进而激活内皮细胞促进血管生成^[84]。

2 基于非编码RNA的治疗策略

大量的研究已经表明, 非编码RNA在心肌增殖与心脏再生修复中有着极其重要的作用, 因此非编码RNA的治疗应用近期也引起了广泛的关注。首要的问题是如何有效地递送非编码RNA进入特定的组织脏器以及细胞并发挥其生物学作用? 在过去几十年研究中, 研究人员发现病毒载体系统可能是递送非编码RNA的有效工具。此外, 还可以通过对寡核苷酸进行设计和修饰以提高其亲和力、稳定性以改善治疗效果。

2.1 基于病毒载体的基因治疗

2.1.1 基于腺病毒的基因治疗 腺病毒是一种双

链DNA病毒, 外层包裹着高亲和力的蛋白质衣壳, 由于它具有较高的转染效率而被广泛用于科学研究。将含有shAZIN2-sv的腺病毒载体注射到心肌中可以改善成年大鼠心肌梗损伤后心脏功能、减少梗死面积以及促进心肌梗后14至60天的血管生成^[76]。但是, 瞬时表达的特点限制了它们在疾病治疗中的应用。此外, 腺病毒还有较强的免疫原性, 会引发宿主的免疫反应, 这也是限制其治疗应用的一大障碍。

2.1.2 基于腺相关病毒(AAV)的基因治疗 腺相关病毒是一类单链DNA病毒, 感染宿主后不会将自身基因整合到宿主基因组, 目前, 已经有10多种血清型的腺相关病毒用于基因治疗研究, 且不同血清型的病毒对不同组织器官有不同的亲和性。通过对不同血清型的腺相关病毒进行研究发现, AAV9对小鼠具有很好的转基因表达效率^[85], 也有研究将AAV6用于猪的心脏损伤治疗^[86]。AAV9对心脏的靶向性很高, 但是通过静脉注射等全身性递送方式也会使诸如肝脏、肺脏等脏器产生一定量的表达。目前多数研究还是主要利用AAV9进行心脏注射来实现心脏特异性表达目标基因。

重组的AAV可以持续长时间表达达数月, 在小鼠心肌梗损伤后, 利用AAV9介导的心脏靶向递送miR-19a/19b可以对心脏提供7天甚至2~3个月的长期保护^[42]。另一项研究中, 心肌梗损伤后, 在梗死边缘区注射AAV-anti-miR-99/100或AAV9-anti-Let-7a/c可以实现对心脏达90天的长效保护^[63]。还可以利用包装有shRNA的AAV降低抑增殖的lncRNA的表达, 从而治疗心脏疾病。例如, 在成年小鼠心肌梗死周围区域注射AAV9-shcircNfix可以显著改善心肌梗后的心脏功能^[82]。

在小鼠研究中, 对成年小鼠心肌梗死边缘区域注射表达has-miR-590和has-miR-199a的AAV9载体, 使得小鼠心肌梗损伤后的心脏功能从注射后12天甚至1~2个月有显著的改善^[21]。但是, 这种转基因的长时表达也会造成不利的影响。在猪心肌梗损伤后利用AAV6递送has-miR-199a可以促进心肌再生显著改善猪心肌梗后的心脏功能^[86], 然而治疗组经过AAV6介导的miR-199a处理后, 其中30%的猪心脏形态和功能得到了改善, 但是有70%的猪在7~8周内因为心率加快引起的室颤而死亡^[86]。此外, AAV注射在人体中引起的免疫反应也是阻碍其临床应用的一个关键^[87]。

2.1.3 基于慢病毒的基因治疗 与腺病毒或腺相

关病毒不同, 慢病毒是一种复杂的逆转录病毒。与简单的逆转录病毒相比, 慢病毒基因组包含有调控基因、辅助基因和核定位信号, 它们能够帮助慢病毒进入核孔并整合到宿主基因组中^[88]。因此, 慢病毒也可以用于体外转染不进行有丝分裂的细胞。但是, 有研究发现包装在慢病毒中的基因在体内的表达并不会持续很长时间, 在小鼠心肌梗后对梗死边缘区域单次心脏注射anti-miR-99/100和anti-Let-7a/c的慢病毒可以显著改善心肌梗后14天的心脏功能, 但是这种效果仅持续了较短的时间^[63]。

2.2 基于寡核苷酸的基因治疗

尽管病毒载体是递送非编码RNA的有效工具, 但由于其表达持续时间、感染其他非预期器官的风险以及会触发免疫反应的可能性等问题限制了其在临床上应用。此外, 由于心肌细胞的去分化是决定心肌细胞修复损伤心脏的先决步骤, 让具有促增殖能力的非编码RNA长时间表达也可能引起严重的不良反应。基于病毒载体的基因治疗存在诸多限制, 而能够有效促进增殖作用而没有长期潜在副作用的合成寡核苷酸可能是一种更加有前景的替代方法^[89]。

2.2.1 miRNA mimic和脂质制剂 miRNA mimic是一种双链的、化学修饰的寡核苷酸, 虽然它不是机体自然生成而是人工化学合成的, 但具有与miRNA相同的生物学功能, 例如抑制靶基因的表达^[90-91], 因此人们常应用miRNA mimic促进心肌细胞的增殖^[42]。另一种经过特殊化学修饰的miRNA, agomir与普通miRNA mimic相比具有更高的核酸酶抗性和亲和力, 尾静脉注射miR-17-3p agomir的小鼠可避免心脏缺血再灌注损伤后的不良重构^[36]。寡核苷酸比蛋白质或核糖核酸等生物大分子小很多, 但比一些可以自由扩散穿过细胞膜的小分子要大, miRNA mimic或agomir都大于14 kDa并且带有很多电荷, 因此, 为了增加它们被细胞的摄取能力, 常将它们包装成一些纳米颗粒。有研究将五种不同的脂质制剂包裹的miR-199a-3p mimic进行比较后发现, RNAiMAX是最有效(转染效率大于80%)且毒性更小的制剂^[89], 其miRNA的表达水平在注射心脏3天后显著升高, 对靶标的抑制作用可维持8~12天^[89]。

在成年小鼠心脏中过表达miR-302-367家族可减少心肌梗死损伤后疤痕的形成, 但并不能改善心脏功能^[22], 这种现象发生的原因可能是由于促增殖miRNA持续表达促使许多心肌细胞去分化导致的,

值得注意的是,通过尾静脉连续7天注射RNA LancerII来实现miR-302b/c的短效表达可以显著减少心肌梗死后的疤痕形成,促进心肌细胞增殖以及改善血管生成和心脏功能^[22]。

尾静脉注射RNA LancerII或RNAiMAX包裹的miR-19a/19b mimics,其12 h后即可进入心肌细胞,注射4天后可检测到miR-19a/19b的表达,可以显著促进心肌细胞增殖以及心肌梗死的心脏再生^[42]。

通过尾静脉注射脂质纳米颗粒RNA LancerII包裹的miR-708可以显著保护异丙肾上腺素所引起的的心脏损伤^[92],注射后miR-708的表达水平上调了16天,足以改善异丙肾上腺素诱导5~10天所引起的心脏肥大和纤维化^[92]。

2.2.2 锁核酸(locked nucleic acid, LNA) LNA是通过在核糖环上添加了一个额外的2'-O,4'-C-亚甲基桥而形成的一种构象受限的核苷酸类似物,通过LNA修饰的寡核苷酸对互补的DNA或RNA有着更高的亲和力^[93]。有研究在心肌梗死后将RNA LancerII包裹的LNA-miR-294-3p mimics进行一次心脏注射,注射两天后miR-294-3p的表达量显著上调并显著促进了心肌细胞的增殖,但是所产生的保护作用仅持续了2~3周且心梗8周后的梗死面积也没有减少^[32]。

LNA可以通过碱基互补配对形成DNA-RNA杂合体,该杂合体可以激活核糖核酸酶H降解靶标RNA从而产生对miRNAs的抑制作用^[94]。尾静脉注射LNA修饰的anti-miR-34a可以下调miR-34a的表达水平并维持miR-34a的低表达水平7天以上,还能够显著改善心肌梗死后的心脏功能,减缓重构以及减少纤维化疤痕的形成^[61]。

2.3 借助新型材料的治疗策略

为解决合成的miRNA mimics半衰期较短的问题,可用惰性的、生物相容的、延时释放的聚合物纳米微球来包裹这些mimics,再通过水凝胶直接注射到心肌内,在注射后19天这些mimics被释放,在心梗后2~4周可改善心脏功能^[47]。有研究在心梗后向心脏注射剪切稀化的水凝胶包裹的胆固醇修饰的miR-302,此方法可以显著改善心梗后心脏功能^[23]。此外,还有研究利用明胶和硅酸盐组成的生物相容性可注射凝胶递送病毒,这种凝胶可以防止病毒被心脏快速代谢,并能够让病毒颗粒从凝胶中缓慢释放增强治疗效果^[27],在心梗损伤后将凝胶和AAV-

miR-1825一起注射到梗死边缘区,此方法可以显著减少疤痕大小,促进梗死边缘区成年心肌细胞的增殖以及改善整体的心脏功能^[27]。

3 总结与展望

成年心肌细胞有限的增殖能力是心脏损伤后再生修复的主要障碍,非编码RNA正逐渐成为心脏疾病损伤后调控心肌细胞增殖和心脏再生的重要参与者。在此,我们总结了最近发现的与心肌增殖相关以及具有治疗潜力的非编码RNA。从这些非编码RNA的筛选过程而言,多数是基于生理、病理过程中心脏组织整体差异基因表达筛选出来的,得益于近年来单细胞转录组、空间转录组测序技术的飞速发展,后续的研究可基于特定亚群、特定时空的心肌细胞来优化靶基因的筛选过程与精确度。从这些非编码RNA调控心肌增殖过程的机制来讲,多数需要找到其发挥作用的靶点蛋白,但目前也有一些重要研究表明RNA本身也可以被糖基化等表观遗传修饰,由此又拓展了非编码RNA领域作用机制的研究方向。同时,由于心肌细胞的增殖过程短暂且罕见,因此越来越多的更加精确和强大的工具(例如谱系示踪技术^[5-23])被用来动态地捕获心肌细胞的增殖事件,这些工具与技术可以让我们更好地了解心肌增殖与心脏再生发生的机制。但必须要正视的是基础研究临床转化治疗之间存在的巨大鸿沟。虽然在实验动物上采用基于RNA的基因治疗效果不错,但是距离应用于临床还存在太多问题,例如脱靶效应、免疫原性、药理学等。随着科技的发展,新的药物递送系统例如胞外囊泡^[95]、外泌体^[96-97]以及合成水凝胶等给予了RNA治疗更大的潜力。此外,还有大量的非编码RNA尚未被研究,从另一个角度看,非编码RNA促进心肌再生拓展了我们对RNA世界的了解,也为心脏疾病的治疗提供了新的方向与策略。

参考文献 (References)

- [1] 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.
- [2] BERGMANN O, BHARDWAJ R D, BERNARD S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans [J]. Science, 2009, 324(5923): 98-102.
- [3] MOLLOVA M, BERSELL K, WALSH S, et al. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(4): 1446-51.

- [4] VAGNOZZI R J, MOKKENTIN J D, HOUSER S R. New myocyte formation in the adult heart endogenous sources and therapeutic implications [J]. *Circ Res*, 2018, 123(2): 159-76.
- [5] LI Y, HE L, HUANG X, et al. Genetic lineage tracing of non-myocyte population by dual recombinases [J]. *Circulation*, 2018, 138(8): 793-805.
- [6] HASHIMOTO H, OLSON E N, BASSEL-DUBY R. Therapeutic approaches for cardiac regeneration and repair [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(10): 585-600.
- [7] QU S, ZENG C, WANG W E. Noncoding RNA and cardiomyocyte proliferation [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 6825427.
- [8] DESHMUKH V, WANG J, MARTIN J F. Leading progress in heart regeneration and repair [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2019, 61: 79-85.
- [9] 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.
- [10] 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, e13.
- [11] DERRIEN T, JOHNSON R, BUSSOTTI G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression [J]. *Genome Res*, 2012, 22(9): 1775-89.
- [12] BATISTA P J, CHANG H Y. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease [J]. *Cell*, 2013, 152(6): 1298-307.
- [13] THUM T, CONDORELLI G. Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology [J]. *Circ Res*, 2015, 116(4): 751-62.
- [14] LU Y W, WANG D Z. Non-coding RNA in ischemic and non-ischemic cardiomyopathy [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2018, 20(11): 115.
- [15] CHEN J, WANG D Z. MicroRNAs in cardiovascular development [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(5): 949-57.
- [16] KATZ M G, FARGNOLI A S, KENDLE A P, et al. The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016, 310(5): H528-H41.
- [17] BARWARI T, JOSHI A, MAYR M. MicroRNAs in cardiovascular disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68(23): 2577-84.
- [18] GURHA P. MicroRNAs in cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2016, 31(3): 249-54.
- [19] HODGKINSON C P, KANG M H, DAL-PRA S, et al. MicroRNAs and cardiac regeneration [J]. *Circ Res*, 2015, 116(10): 1700-11.
- [20] TAO G, WANG J, MARTIN J F. Small RNA: from development to regeneration [J]. *Sci Transl Med*, 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa7538.
- [21] EULALIO A, MANO M, DAL FERRO M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration [J]. *Nature*, 2012, 492(7429): 376-81.
- [22] TIAN Y, LIU Y, WANG T, et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(279): 279ra38.
- [23] WANG L L, LIU Y, CHUNG J J, et al. Sustained miRNA delivery from an injectable hydrogel promotes cardiomyocyte proliferation and functional regeneration after ischaemic injury [J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1(12): 983-92.
- [24] WANG J, LIU S, HEALLEN T, et al. The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(11): 672-84.
- [25] TORRINI C, CUBERO R J, DIRKX E, et al. Common regulatory pathways mediate activity of microRNAs inducing cardiomyocyte proliferation [J]. *Cell Rep*, 2019, 27(9): 2759-71, e5.
- [26] 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, e12.
- [27] PANDEY R, VELASQUEZ S, DURRANI S, et al. MicroRNA-1825 induces proliferation of adult cardiomyocytes and promotes cardiac regeneration post ischemic injury [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(6): 3120-37.
- [28] XIAO J, LIANG D, ZHANG H, et al. MicroRNA-204 is required for differentiation of human-derived cardiomyocyte progenitor cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(6): 751-9.
- [29] LIANG D, LI J, WU Y, et al. MiRNA-204 drives cardiomyocyte proliferation via targeting Jarid2 [J]. *Int J Cardiol*, 2015, 201: 38-48.
- [30] HU S, HUANG M, LI Z, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease [J]. *Circulation*, 2010, 122(11 suppl 1): S124-S31.
- [31] ARIF M, PANDEY R, ALAM P, et al. MicroRNA-210-mediated proliferation, survival, and angiogenesis promote cardiac repair post myocardial infarction in rodents [J]. *J Mol Med*, 2017, 95(12): 1369-85.
- [32] BORDEN A, KURIAN J, NICKOLOFF E, et al. Transient introduction of miR-294 in the heart promotes cardiomyocyte cell cycle reentry after injury [J]. *Circ Res*, 2019, 125(1): 14-25.
- [33] CLARK A L, NAYA F J. MicroRNAs in the myocyte enhancer factor 2 (MEF2)-regulated Gtl2-Dio3 noncoding RNA locus promote cardiomyocyte proliferation by targeting the transcriptional coactivator Cited2 [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(38): 23162-72.
- [34] LI X, WANG J, JIA Z, et al. MiR-499 regulates cell proliferation and apoptosis during late-stage cardiac differentiation via Sox6 and cyclin D1 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74504.
- [35] RASO A, DIRKX E, SAMPAIO-PINTO V, et al. A microRNA program regulates the balance between cardiomyocyte hyperplasia and hypertrophy and stimulates cardiac regeneration [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4808.
- [36] SHI J, BEI Y, KONG X, et al. miR-17-3p contributes to exercise-induced cardiac growth and protects against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 664-76.
- [37] HAMMOUD L, BURGER D E, LU X, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits neonatal mouse cardiomyocyte proliferation via EGFR/JNK/SP-1 signaling [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(4): C735-C45.
- [38] ZHAO K, YANG C, ZHANG J, et al. METTL3 improves cardiomyocyte proliferation upon myocardial infarction via upregulating miR-17-3p in a DGCR8-dependent manner [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 291.
- [39] LIU X, XIAO J, ZHU H, et al. MiR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling [J]. *Cell Metab*, 2015, 21(4): 584-95.
- [40] VUJIC A, LERCHENMULLER C, WU T D, et al. Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian

- heart [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1659.
- [41] CHEN J, HUANG Z P, SEOK H Y, et al. Mir-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts [J]. *Circ Res*, 2013, 112(12): 1557-66.
- [42] GAO F, KATAOKA M, LIU N, et al. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1802.
- [43] LIANG T, GAO F, JIANG J, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac repair after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2020, 142(22): 2196-9.
- [44] QIN X, GAO S, YANG Y, et al. microRNA-25 promotes cardiomyocytes proliferation and migration via targeting Bim [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 22103-15.
- [45] XIAO J, LIU H, CRETOIU D, et al. miR-31a-5p promotes postnatal cardiomyocyte proliferation by targeting RhoBTB1 [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(10): e386.
- [46] LANGE S, BANERJEE I, CARRION K, et al. MiR-486 is modulated by stretch and increases ventricular growth [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(19): 1-17.
- [47] JUNG J H, IKEDA G, TADA Y, et al. miR-106a-363 cluster in extracellular vesicles promotes endogenous myocardial repair via Notch3 pathway in ischemic heart injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116(1): 19.
- [48] DEL CAMPO C V, LIAW N Y, GUNADASA-ROHLING M, et al. Regenerative potential of epicardium-derived extracellular vesicles mediated by conserved miRNA transfer [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(2): 597-611.
- [49] ZHAO Y, SAMAL E, SRIVASTAVA D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis [J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 214-20.
- [50] ZHAO Y, RANSOM J F, LI A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2 [J]. *Cell*, 2007, 129(2): 303-17.
- [51] LIU N, BEZPROZVANNAYA S, WILLIAMS A H, et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(23): 3242-54.
- [52] YIN V P, LEPLINA A, SMITH A, et al. Regulation of zebrafish heart regeneration by miR-133 [J]. *Dev Biol*, 2012, 365(2): 319-27.
- [53] MORRISON J L, ZHANG S, TELLAM R L, et al. Regulation of microRNA during cardiomyocyte maturation in sheep [J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 541.
- [54] PORRELLO E R, JOHNSON B A, AURORA A B, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2011, 109(6): 670-9.
- [55] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(1): 187-92.
- [56] LIU Q, GUNTUKU S, CUI X S, et al. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G₂/M DNA damage checkpoint [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(12): 1448-59.
- [57] CRIPPA S, NEMIR M, OUNZAIN S, et al. Comparative transcriptome profiling of the injured zebrafish and mouse hearts identifies miRNA-dependent repair pathways [J]. *Cardiovasc Res*, 2016, 110(1): 73-84.
- [58] CAO X, WANG J, WANG Z, et al. MicroRNA profiling during rat ventricular maturation: a role for miR-29a in regulating cardiomyocyte cell cycle re-entry [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(10): 1548-55.
- [59] HU Y, JIN G, LI B, et al. Suppression of miRNA let-7i-5p promotes cardiomyocyte proliferation and repairs heart function post injury by targeting CCND2 and E2F2 [J]. *Clin Sci*, 2019, 133(3): 425-41.
- [60] ZHANG Y, MATSUSHITA N, EIGLER T, et al. Targeted microRNA interference promotes postnatal cardiac cell cycle re-entry [J]. *J Regen Med*, 2013, 2: 2.
- [61] YANG Y, CHENG H W, QIU Y, et al. MicroRNA-34a plays a key role in cardiac repair and regeneration following myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2015, 117(5): 450-9.
- [62] 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.
- [63] AGUIRRE A, MONTERRAT N, ZACCHIGNA S, et al. *In vivo* activation of a conserved microRNA program induces mammalian heart regeneration [J]. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5): 589-604.
- [64] CHENG J, KAPRANOV P, DRENKOW J, et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution [J]. *Science*, 2005, 308(5725): 1149-54.
- [65] CUI P, LIN Q, DING F, et al. A comparison between ribo-minus RNA-sequencing and polyA-selected RNA-sequencing [J]. *Genomics*, 2010, 96(5): 259-65.
- [66] DEVAUX Y, ZANGRANDO J, SCHROEN B, et al. Long non-coding RNAs in cardiac development and ageing [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(7): 415-25.
- [67] BÄR C, CHATTERJEE S, THUM T. Long noncoding RNAs in cardiovascular pathology, diagnosis, and therapy [J]. *Circulation*, 2016, 134(19): 1484-99.
- [68] CHEN Y, LI X, LI B, et al. Long non-coding RNA ECRAR triggers post-natal myocardial regeneration by activating ERK1/2 signaling [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(1): 29-45.
- [69] LI B, HU Y, LI X, et al. Sirt1 antisense long noncoding RNA promotes cardiomyocyte proliferation by enhancing the stability of Sirt1 [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(21): e009700.
- [70] LI M, ZHENG H, HAN Y, et al. LncRNA Snhg1-driven self-reinforcing regulatory network promoted cardiac regeneration and repair after myocardial infarction [J]. *Theranostics*, 2021, 11(19): 9397-414.
- [71] 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.
- [72] LI T, QIAN D, GUOYAN J, et al. Downregulated long noncoding RNA LUCAT1 inhibited proliferation and promoted apoptosis of cardiomyocyte via miR-612/HOXA13 pathway in chronic heart failure [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1): 385-95.
- [73] FEI Q, QIU M, FAN G, et al. Downregulation of Hotair or LSD1 impaired heart regeneration in the neonatal mouse [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(9): 1177-84.
- [74] GAO R, WANG L, BEI Y, et al. Long noncoding RNA cardiac physiological hypertrophy-associated regulator induces cardiac physiological hypertrophy and promotes functional recovery after myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2021,

- 144(4): 303-17.
- [75] CAI B, MA W, WANG X, et al. Targeting LncDACH1 promotes cardiac repair and regeneration after myocardium infarction [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(7): 2158-75.
- [76] LI X, HE X, WANG H, et al. Loss of AZIN2 splice variant facilitates endogenous cardiac regeneration [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(12): 1642-55.
- [77] CHEN G, LI H, LI X, et al. Loss of long non-coding RNA CRRL promotes cardiomyocyte regeneration and improves cardiac repair by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 122: 152-64.
- [78] PONNUSAMY M, LIU F, ZHANG Y H, et al. Long noncoding RNA CPR (cardiomyocyte proliferation regulator) regulates cardiomyocyte proliferation and cardiac repair [J]. *Circulation*, 2019, 139(23): 2668-84.
- [79] CAI B, MA W, DING F, et al. The long noncoding RNA CAREL controls cardiac regeneration [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72(5): 534-50.
- [80] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 384-8.
- [81] QU S, YANG X, LI X, et al. Circular RNA: a new star of non-coding RNAs [J]. *Cancer Lett*, 2015, 365(2): 141-8.
- [82] HUANG S, LI X, ZHENG H, et al. Loss of super-enhancer-regulated circRNA Nfix induces cardiac regeneration after myocardial infarction in adult mice [J]. *Circulation*, 2019, 139(25): 2857-76.
- [83] ZHU Y, ZHAO P, SUN L, et al. Overexpression of circRNA SNRK targets miR-103-3p to reduce apoptosis and promote cardiac repair through GSK3 β / β -catenin pathway in rats with myocardial infarction [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 84.
- [84] SI X, ZHENG H, WEI G, et al. circRNA Hipk3 induces cardiac regeneration after myocardial infarction in mice by binding to Notch1 and miR-133a [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 21: 636-55.
- [85] ZINCARELLI C, SOLTYS S, RENGO G, et al. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection [J]. *Mol Ther*, 2008, 16(6): 1073-80.
- [86] GABISONIA K, PROSDOCIMO G, AQUARO G D, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs [J]. *Nature*, 2019, 569(7756): 418-22.
- [87] KURANDA K, JEAN-ALPHONSE P, LEBORGNE C, et al. Exposure to wild-type AAV drives distinct capsid immunity profiles in humans [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(12): 5267-79.
- [88] PFEIFER A, VERMA I M. Gene therapy: promises and problems [Z]. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001: 177-211.10.1146/annurev.genom.2.1.177
- [89] LESIZZA P, PROSDOCIMO G, MARTINELLI V, et al. Single-dose intracardiac injection of pro-regenerative microRNAs improves cardiac function after myocardial infarction [J]. *Circ Res*, 2017, 120(8): 1298-304.
- [90] SØKILDE R, NEWIE I, PERSSON H, et al. Passenger strand loading in overexpression experiments using microRNA mimics [J]. *RNA Biol*, 2015, 12(8): 787-91.
- [91] GIBSON N W. Engineered microRNA therapeutics [J]. *J R Coll Physicians Edinb*, 2014, 44(3): 196-200.
- [92] DENG S, ZHAO Q, ZHANG C, et al. Neonatal heart-enriched miR-708 promotes proliferation and stress resistance of cardiomyocytes in rodents [J]. *Theranostics*, 2017, 7(7): 1953-65.
- [93] KAUR H, ARORA A, WENGEL J, et al. Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes [J]. *Biochemistry*, 2006, 45(23): 7347-55.
- [94] LU D, THUM T. RNA-based diagnostic and therapeutic strategies for cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(11): 661-74.
- [95] BARILE L, LIONETTI V, CERVIO E, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103(4): 530-41.
- [96] CIULLO A, BIEMMI V, MILANO G, et al. Exosomal expression of CXCR4 targets cardioprotective vesicles to myocardial infarction and improves outcome after systemic administration [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(3): 468.
- [97] MILANO G, BIEMMI V, LAZZARINI E, et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(2): 383-92.