

DOI: 10.13376/j.cblls/2023027

文章编号: 1004-0374(2023)02-0203-09

增殖分化视角下成年哺乳动物心肌再生研究进展

肖红¹, 宋亚锋^{2*}, 黄燕君¹

(1 北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084; 2 北京体育大学中国运动与健康研究院, 北京 100084)

摘要: 心肌再生是逆转心肌损伤和心力衰竭的理想途径, 也是心血管医学领域的研究重点。传统观点认为成年哺乳动物心肌细胞无法自我更新和再生, 然而最近研究报道心肌细胞能以微弱比例内源再生。通过调节心肌再生过程或调控关键分子表达, 可以诱导具有收缩功能的心肌细胞出现, 改善损伤心脏的结构和功能。近年心肌再生研究大多侧重细胞增殖, 对心肌细胞去分化、增殖及再分化的全过程关注较少。因此, 该文从增殖分化视角综述成年哺乳动物心肌再生的诱导方式, 旨在探讨实现成年哺乳动物心肌细胞大规模自我更新的可能性。

关键词: 心肌再生; 心肌梗死; 心肌细胞增殖; 心肌细胞去分化; 心肌细胞分化

中图分类号: {Q28}; R54 **文献标志码:** A

Literature review of adult mammalian myocardium regeneration: from the perspective of proliferation and differentiation

XIAO Hong¹, SONG Ya-Feng^{2*}, HUANG Yan-Jun¹

(1 College of Exercise and Human Sciences, Beijing Sport University, Beijing 100084, China;

2 China Institute of Exercise and Health, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

Abstract: Myocardial regeneration has become the emphasis of cardiovascular medicine as an ideal way to reverse myocardial injury and heart failure. It has been traditionally believed that adult mammalian cardiomyocytes undergo little self-renewal and regeneration. However, several recent studies have reported that cardiomyocytes undergo endogenous regeneration in a small proportion. By manipulating the cardiac regeneration process or regulating the expression of biomolecules, cardiomyocytes with contractile function can be regenerated to improve the heart function. In recent years, most studies on myocardial regeneration have focused on cardiomyocyte proliferation, while little attention has been paid to the whole process of myocardial dedifferentiation, proliferation and redifferentiation. Therefore, this article reviews how to induce myocardial regeneration in adult mammals from the perspective of proliferation and differentiation, and discusses the possibility of achieving large-scale self-renewal of adult mammalian cardiomyocytes.

Key words: myocardial regeneration; myocardial infarction; cardiomyocyte proliferation; cardiomyocyte dedifferentiation; cardiomyocyte differentiation

心肌梗死及其后引发的心力衰竭仍然是世界范围内的主要致死原因。尽管心肌梗死患者可以接受血运重建治疗, 但无论给予何种治疗, 心肌梗死事件最终都会引起受累区心肌细胞大面积死亡, 最终导致心脏衰竭^[1]。至今尚未有彻底挽救损伤心肌的方法, 诱导心肌细胞再生可能是心肌梗死的潜在治疗方式^[2]。目前, 心肌再生相关基础研究主要从促

进外源性和内源性心肌再生角度入手: 当寄希望于外源细胞向心肌细胞转分化进而实现心肌再生时^[3-4], 需要解决干细胞/祖细胞的精准定位和定

收稿日期: 2022-04-30; 修回日期: 2022-11-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(82071413)

*通信作者: E-mail: songyafeng@bsu.edu.cn

向分化问题,目前外源细胞导入的治疗效果并不理想^[5];而诱导内源心肌细胞再生也可以代替损伤心肌发挥收缩功能^[6-7],且此方法不受伦理规范、免疫反应、诱导肿瘤和递送方式等因素制约,是挽救心脏功能的可行方案^[8]。

成年哺乳动物心肌细胞再生能力极低,人类心肌细胞自我更新率在25岁时仅约为1%,75岁时降至0.45%^[9]。因此,如何在心脏大面积损伤后诱导心肌再生,保护受损心脏免受心力衰竭威胁,成为近20年来重要研究课题。目前,成年哺乳动物心肌细胞内源性再生能力和具体机制尚不明确,因此,本研究梳理了成年哺乳动物心肌细胞自我更新与再生相关研究,为开展心肌再生研究提供理论依据。

1 成年哺乳动物内源性心肌再生研究现状

既往的心肌再生基础研究主要在蝾螈、斑马鱼、胚胎期和新生小鼠体内开展。斑马鱼、两栖类动物、胚胎期和新生期的温血哺乳动物的心脏可以在损伤后实现自我修复和再生,该观点已成为心脏再生医学领域共识^[8]。临床研究中也观察到类似现象,新生儿在出生后几小时突发急性心肌缺血和急性心衰,影像学诊断为冠状动脉左前降支梗塞,给予急性期溶栓治疗和亚急性期常规治疗可以使新生儿心脏状态完全恢复至同龄健康儿童水平^[10]。此外,婴儿在心肌梗死或心源性休克后也可以通过治疗恢复心脏功能^[11-13]。因此,实验研究结果和临床案例数据共同表明新生哺乳动物心脏仍具有极强的再生能力。

与之形成鲜明对比的是,成年哺乳动物心脏损伤后难以大规模修复再生。相比于骨骼肌、肝脏等器官,心脏再生能力相对不足。但在心肌梗死时,心肌细胞表现出更活跃的DNA复制现象,呈现出心肌修复趋势,这为开展心肌细胞修复和再生研究带来了希望^[14-15]。在大鼠、小鼠以及猪等体内开展的实验研究结果显示,给予极端全身低氧、自主跑轮运动、基因治疗等,或递送丙二酸盐或甲状腺激素,有助于改善成年哺乳动物的心肌细胞再生水平。

2 成年哺乳动物内源性心肌再生诱导过程

2.1 诱导心肌细胞增殖

新生哺乳动物心脏增殖能力极强,如新生小鼠心脏在被切除心尖后仍可完全再生,这种再生能力大约维持到出生后7d;此后,心肌细胞增殖能力锐减,仅以微弱水平进行增殖和更新^[14]。通过调节

细胞周期、关键信号蛋白与转录因子、非编码RNA等可以提高成年哺乳动物心肌细胞增殖水平。

2.1.1 调节细胞周期

新生儿出生后心肌细胞增殖能力迅速减弱是因为心肌细胞逐渐分化成终末细胞,难以重新进入细胞周期^[16],诱导心肌细胞重新进入细胞周期是引起心肌再生的可行方式^[14]。

暴露于低氧环境、清除活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)或改善DNA氧化损伤等可以延长新生心肌细胞的增殖窗口期,可能是出生后的富氧环境导致成熟心肌细胞周期停滞、增殖能力减退^[17]。基于此,Nakada等^[18]将成年小鼠逐步暴露至氧浓度7%的低氧环境制造慢性重度低氧血症,心肌细胞ROS生成和DNA氧化损伤减少,发现该低氧方案可以诱导成年心肌细胞增殖,显著改善2月龄心肌梗死小鼠心脏功能。持续极端低氧暴露可能是诱导心肌细胞增殖的可行策略,但暴露于接近珠穆朗玛峰顶的低氧浓度可能引起的肝肾和脑损伤是应用该方案诱导心肌再生时需要考量的问题^[19]。一种相对温和的方案是通过降低体内甲状腺激素水平改善氧化应激,促进心肌细胞增殖。甲状腺激素是哺乳动物体内的主要能量代谢与体温调节因子,也是成年哺乳动物心肌细胞周期调节因子。Hirose等^[20]通过注射甲状腺激素受体特异性抑制剂、阻断甲状腺激素合成以及突变甲状腺激素受体的方式,引起心肌细胞三羧酸循环反应、氧化磷酸化反应和心肌收缩相关基因下调,细胞周期和有丝分裂相关基因上调,成倍激活小鼠心肌细胞增殖。该研究提示了能量代谢调节因子甲状腺激素及其信号通路在小鼠心肌细胞退出细胞周期中的重要作用。最近研究显示,损伤后即刻是成年哺乳动物心肌自我修复的窗口期,及时补充丙二酸盐能诱发损伤心肌出现更强烈的磷酸化组蛋白3(phosphorylated histone 3, pH3)和有丝分裂激酶B(aurora kinase B, Aurora B)阳性信号^[21],提示补充丙二酸盐显著促进心肌细胞增殖,改善受损心脏功能。补充丙二酸盐促进心肌细胞增殖的部分机制是丙二酸盐竞争抑制琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDH),减轻了缺血/再灌注期间琥珀酸大量堆积和其后的ROS生成^[22]。SDH是真核生物体内参与三羧酸循环和电子传递链、物质能量代谢和细胞周期调节的线粒体蛋白,突变或抑制SDH可以促进代谢向糖酵解转变,促进细胞分裂^[23],调控代谢重编程可能会促进心肌细胞增殖^[24]。

因此,成年哺乳动物出生后暴露于富氧环境、能量代谢方式向有氧代谢转变可能是心肌细胞退出细胞周期的重要原因,控制心肌细胞有氧代谢比例或减轻 ROS 损伤可以诱导其增殖,提示了氧气代谢在心肌再生中的关键作用。

2.1.2 调节关键信号蛋白与转录因子

低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (LDL receptor related protein 6, LRP6) 作为 Wnt 共受体在经典 Wnt/ β -catenin 通路转导中发挥作用,参与调节心脏祖细胞增殖存活。Wu 等^[25]发现 LRP6 是心肌细胞增殖的负调控因子,敲除或干扰 LRP6 表达可以直接作用于 ING5/P21 信号通路,诱导成年小鼠心肌进入细胞周期和增殖。神经调节蛋白 1 (NRG1) 是介导细胞间相互作用的信号蛋白,主要表达于脑、心脏、乳腺等部位,参与调节组织细胞发育和成熟。Bersell 等^[26]发现成熟心肌细胞可以在 NRG1 及其酪氨酸激酶受体 ErbB4 通路的作用下,发生代谢重编程,重新进入细胞周期。上调 ErbB4 或补充 NRG1 重组蛋白可诱导成年小鼠心肌细胞周期活动,促进心肌再生,改善心肌梗死后的心脏功能。NRG1- β 1 是包含 NRG1 氨基酸残基 176~256 的 ErbBs 激动剂。Reuter 等^[27]报道补充 NRG1- β 1 不增加心肌细胞 DNA 合成,且无法引起小鼠心肌中溴脱氧尿苷 (BrdU) 或氘化胸苷激酶 (3H-Thy) 增殖标记物增多。因此,NRG1 是否通过上调损伤心肌细胞的 DNA 复制和细胞周期活动和 / 或其他方式改善损伤心脏功能有待进一步验证。

Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 在心肌细胞增殖、心肌形态发生和心肌小梁形成过程中起关键调节作用^[28]。过表达 YAP 促进心肌细胞增殖和梗死组织瘢痕修复。持续过表达 YAP 则会导致心肌细胞过度增殖,进而引起心室功能障碍。哺乳动物中 Hippo 同源蛋白 Mst1/2 是细胞增殖、干细胞自我更新的负调控因子,控制细胞增殖和器官大小^[29-30]。其中, YAP 是 Mst1/2 作用的下游核靶点之一,哺乳动物心肌组织中 YAP 通常以磷酸化状态滞留于细胞质,几乎没有转录活性;缺失 Mst1/2 能引起 YAP 在去磷酸化后与转录共活化因子 TAZ 形成转录共激活因子复合物,转位至细胞核并与 TEAD (TEA domain) 家族成员和其他转录因子结合,调节核内大肿瘤抑制因子 1/2 (large tumor suppressor 1/2, LATS1/2) 等基因,从而诱导哺乳动物心肌细胞在损伤后重新进入细胞周期和再生^[31-32]。此外,巨噬细胞也通过 YAP 调节心肌细胞增殖,成年小鼠

心肌梗死后,巨噬细胞分泌抑瘤素 M (oncostatin M, OSM) 通过作用于共受体糖蛋白 130 (glycoprotein 130, Gp130), 经 Gp130-YAP-Notch 信号通路适度激活心肌细胞增殖。Gp130 在缺血应激、心肌肥厚、心力衰竭中发挥心脏保护作用^[33-34], 外源递送携带编码组成型活化 Gp130 基因的 AAV9 可以通过 Src 激酶在 Y357 位点活化 YAP, 诱导心肌细胞增殖^[35]。此外, 6-甲基腺苷 (m6A) 是真核生物 RNA 上最常见的修饰, 下调 m6A 去甲基化酶 ALKBH5 引起 m6A 甲基化的增加, 阻碍新生小鼠心肌细胞再生。心内注射 AAV9 过表达 ALKBH5 促进 m6A 去甲基化可以改善 YTH N6-甲基腺苷 RNA 结合蛋白 1 (YTHDF1) mRNA 稳定性并促进其表达, 进而增强 YAP 翻译水平, 提高心肌细胞增殖水平, 改善梗死心脏功能^[36]。

参与调节心肌细胞再生的转录因子还有三氨基酸环延伸 (TALE) 家族同源结构域转录因子 Meis1。Meis1 分子负向调节心肌细胞周期, 敲除 Meis1 可以激活新生小鼠心肌细胞有丝分裂, 延长细胞增殖窗口期。成纤维细胞生长因子 10 (fibroblast growth factor 10, FGF10) 可能通过调节 Meis1 参与心肌再生调节^[37]。含同源异形框 (homeobox) 结构域转录因子家族成员 Hoxb13 也可作为 Meis1 的辅助因子, 协同调控心肌进入细胞周期^[38]。成熟心肌细胞中的 Hoxb13 在钙调磷酸酶 (calcineurin) 调节下于 Ser204 位点脱磷酸化, 辅助 Meis1 定位至细胞核, 协同引起细胞周期阻滞。而心肌细胞特异性 Meis1、Hoxb13 双敲除小鼠会表现出心肌细胞肌节解体、总心肌细胞数量和单核心肌细胞数量增加、双核和多核心肌细胞数量相对减少、心肌细胞分裂、细胞增殖发生^[39]。Meis1 和 Hoxb13 可能成为诱导心脏进入细胞周期的新靶点。此外, 结合单细胞转录组测序和染色质可及性测序发现转录因子 NFYa 和 NFE2L1 可以促进心肌细胞分裂, 使用 AAV9 载体在心肌过表达 NFYa 和 NFE2L1 显著提高成年小鼠心脏细胞增殖水平^[40]。

因此, LRP6、NRG1、YAP、FGF10、NFYa 与 NFE2L1 等分子可能是诱导成年哺乳动物心肌细胞增殖的关键信号蛋白与转录因子; ING5/P21、ErbB4、Hippo-YAP、Gp130-YAP-Notch、ALKBH5-m6A-YTHDF1-YAP、Calcineurin-Hoxb13/ Meis1 也是诱导成年哺乳动物心肌细胞增殖的关键通路。

2.1.3 调节非编码RNAs途径

非编码 RNAs 在细胞周期调控中发挥重要作

用^[41], 目前研究主要探讨 microRNA、circRNA 和 lncRNA 对心肌细胞增殖的调节作用。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是真核生物中由 19~25 个核苷酸组成的 RNA 分子^[42], 多种 miRNAs 均通过调节 mRNA 表达参与心肌细胞增殖调控^[43]。例如, miR-15 家族在新生儿出生后上调, 补充 miR-15 会导致心肌细胞增殖受阻^[44-45]; miR-17-92 簇促进心肌细胞增殖^[46], 心内注射簇内成员 miR-19a/19b 可以诱导心肌细胞增殖, 全身补充 miR-19a/19b 显著改善心梗小鼠心脏损伤及心力衰竭^[47]; miR-17-92 簇内另一成员 miR-34a 最初被认为参与调节细胞衰老, 最近研究报道 miR-34a 也是细胞增殖和心肌再生的关键负调控因子^[41]等。现有研究大多通过递送病毒载体和注射基因模拟物开展 miRNAs 调节心肌再生的研究。事实上, 运动也可以通过调节 miRNAs 促进心肌细胞自我更新和再生。运动通过调节心肌细胞肥大改变心脏质量^[48], 调节心脏功能发挥心脏保护效应, 这一观点已被多项研究证实^[49]。而 Vujic 等^[50]发现 8 周自主跑轮运动显著提高成年小鼠梗死心脏远端的心肌细胞自我更新水平, 认为运动通过诱导心肌细胞再生实现心肌保护作用。且自主运动所引起的心肌细胞自我更新水平高于人类心肌细胞自然凋亡水平^[51], 由此推断自主运动有助于心脏保持健康状态。自主运动能够引起 miR-222 表达增加^[52], 抑制 miR-222 导致心肌自我更新受阻。因此, 运动可能通过调节 miR-222 诱导心肌细胞增殖和自我更新以促进正常和损伤成年小鼠心肌细胞再生。

非编码的环状 RNA (circular RNA, circRNA) 通过发挥 miRNA 海绵功能弱化 miRNA 对靶基因的控制, 参与调节细胞增殖分化和组织再生^[53]。Nfix circRNA (circNfix) 集中表达于心肌, 过表达 circNfix 通过促进 Ybx1 (Y-box binding protein 1) 结合 E3 泛素连接酶 Nedd4l, 引起 Ybx1 的泛素化与降解, 进而抑制细胞周期蛋白 A2 和细胞周期蛋白 B1 表达^[54]。circNfix 也会竞争性抑制 miR-214, 进而引起 Gsk3 β (糖原合成酶激酶 3 β) 表达, 抑制细胞调节蛋白 β -catenin 活性; 相反, 下调 circNfix 促进心肌细胞增殖, 抑制心肌细胞凋亡, 减轻心肌梗死后的心功能障碍^[55]。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是长度大于 200 个核苷酸的非编码 RNA, 参与调节细胞周期和细胞分化等活动。高度保守的 lncDACH1 可能参与心肌细胞增殖调节^[56]。Cai 等^[57]

发现幼年和成年小鼠心肌梗死后, 心脏条件性敲除 lncDACH1 或腺病毒介导内源性 lncDACH1 沉默均会再次激活心肌细胞增殖潜能, lncDACH1 通过与蛋白磷酸酶 1 催化亚基 α (PP1A) 结合, 限制自身去磷酸化活性, 增强 YAP1 磷酸化并减少其核转位, 进而使心肌细胞增殖, 促进心脏再生。Li 等^[58]发现 AZIN2-sv 是一种保守的心脏特异性 lncRNA, 体内与体外实验显示 AZIN2-sv 抑制内源性心脏再生, 是由于该基因通过充当 miR-214 的竞争性内源 RNA (ceRNA) 抑制 miR-214 并调节磷酸酶和紧张素同源物 (PTEN)-AKT 通路。干扰 AZIN2-sv 表达显著促进心肌细胞增殖, 改善损伤后心脏的功能^[59]。类似地, lncRNA CAREL 会与 miR-296 进行内源竞争, 通过调节 Trp53inp1 和 Itm2a 水平抑制出生后和成年心脏损伤后的心肌细胞增殖, 沉默 CAREL 表达促进心肌细胞增殖, 改善损伤心脏功能^[60]。NPPA-AS1 通过与 DNA 修复相关分子相互作用而负向调控心肌细胞增殖, 敲除 NPPA-AS1 有助于 DNA 损伤修复所需的 SFPQ-NONO 蛋白异构体形成, 进而有助于改善 8 周心肌梗死小鼠的心肌损伤水平^[61]。反义 lncRNA Sirt1 正向调节心肌细胞增殖, 与 Sirt1 mRNA 3'-UTR 区域结合能够增加 Sirt1 mRNA 稳定性, 上调 Sirt1 mRNA 表达和其后的蛋白翻译, 减少 4 周龄青少年小鼠在心肌梗死后的心肌细胞凋亡, 促进增殖、减小梗死面积和保护心梗小鼠的心功能^[62]。多项研究均已表明 lnc RNA 在心肌再生调节中极具潜力。

因此, microRNA、circRNA 和 lncRNA 以及反义 lncRNA 通过干扰心肌细胞基因表达调节细胞增殖, 调整非编码 RNA 表达, 如补充 miR-19a/19b、miR-222、反义 lncRNA Sirt1 或下调 miR-15 家族、circNfix、lncDACH1、AZIN2-sv、NPPA-AS1 等, 均可参与心肌再生过程中的增殖调节。

综上所述, 通过直接诱导细胞周期启动, 或调节关键信号蛋白与转录因子以及非编码 RNAs 途径均可以成功诱导成年哺乳动物心肌细胞增殖率上调, 心脏功能得以改善。诱导内源性心肌细胞增殖和分裂是一种极具前景的成年哺乳动物心肌再生治疗策略。心肌细胞再生过程中的心肌细胞增殖研究见表 1。

2.2 心肌细胞去分化和再分化的调节

2.2.1 心肌细胞去分化

与传统观点不同^[64], 近年研究显示终末分化细胞可以在去分化成为心肌前体细胞后, 再次进入

表1 成年哺乳动物心肌细胞再生过程中的心肌细胞增殖研究

作者	再生手段	靶分子	研究主题	成年动物模型	心肌细胞再生检测指标	积极结果和/或副作用
Bersell等 (2009) ^[26]	注射重组NRG1	NRG1	增殖	2~3周小鼠 (N, MI)	BrdU、EdU、pH3、Aurora B阳性细胞	积极结果: 心肌多核细胞比例减少, 再生信号成倍增加, 梗死面积减小, 心脏功能改善。
Eulalio等 (2012) ^[63]	AAV9-miR-590或miR-199a过表达	miR-590 miR-199a	增殖	8~12周小鼠 (MI)	EdU阳性细胞	积极结果: EdU阳性细胞从0.2%左右增加到0.9%, 心肌质量和功能得到改善。
Chen等 (2013) ^[46]	条件性过表达	miR-17-92簇	增殖	4月小鼠 (N, MI)	EdU、pH3阳性细胞	积极结果: 心肌细胞数增多; 心肌梗死边缘再生信号明显, 梗死瘢痕减小, 功能恢复。
Nakada等 (2017) ^[18]	极端低氧 (氧浓度7%)	氧化应激 相关分子	增殖	3月小鼠 (N, MI)	BrdU、pH3、Aurora B阳性细胞	积极结果: 再生阳性信号成倍增加。
Vujic等 (2018) ^[50]	自主转轮运动	miR-222	增殖	2月小鼠 (N, MI)	¹⁵ N-胸腺嘧啶标记阳性细胞数; 单核与二倍体心肌细胞比例	副作用: 死亡率可达50%。 积极结果: 自主运动使新生细胞数目增加, 促进心肌细胞生成率提高至原有的4~5倍, 改善心脏结构和功能。
Li等 (2018) ^[58]	心内注射含 shAZIN2-sv腺病毒	PTEN	增殖	180~200 g成年 大鼠(MI)	Ki67、pH3阳性细胞	积极结果: 抑制AZIN2-sv可使心肌细胞增殖信号成倍增加, 减轻损伤后心室重构, 改善心功能。
Hirose等 (2019) ^[20]	甲状腺激素受体 特异性抑制剂	THR- α	增殖	6~13周小鼠 (N, IRI)	EdU、Ki67、pH3阳性细胞	积极结果: 小鼠心肌生成率提高至原有的3~5倍, 功能恢复。
Cardoso等 (2020) ^[24]	条件性敲除心肌 PDK4	PDK4	增殖	10~12周小鼠 (N, MI)	pH3、Aurora B阳性细胞; 心肌细胞数量	积极结果: 再生阳性信号成倍增加, 功能恢复。
Wu等 (2021) ^[25]	条件性敲除心肌LRP6	LRP6	增殖	8周小鼠 (MI)	EdU、pH3-S10阳性细胞、二倍体心肌细胞数	积极结果: 梗死心脏再生阳性信号显著增加, 梗死心脏功能恢复。
Cai等 (2020) ^[57]	条件性敲除心肌 IncDACH1	PPIA/YAP1	增殖	6~8周小鼠 (MI)	pH3、Aurora B阳性细胞染色	副作用: 易引起应激下心律失常致死。
Han等 (2021) ^[36]	心内注射AAV9- ALKBH5	ALKBH5	增殖	8周小鼠 (MI)	pH3、Aurora B阳性细胞	积极结果: 心肌细胞增殖显著增加, 梗死面积减小, 梗死后心脏功能得以改善。
Bae等 (2021) ^[21]	补充丙二酸盐	SDH	增殖	8周小鼠 (N, MI)	BrdU、pH3、Aurora B阳性细胞	积极结果: 梗死心脏再生阳性信号显著增加, 梗死心脏功能恢复。
Hubert等 (2022) ^[37]	心肌Fgf10条件 性过表达	Fgf10	增殖	3月小鼠 (MI)	Ki67、Aurora B阳性细胞	积极结果: 分裂心肌细胞数目显著增加, 损伤成年心脏结构和功能恢复, 纤维化程度降低。
Gao等 (2019) ^[47]	心内/全身补充 AAV9-miR-19a/19 19b或模拟物 或模拟物	AAV-miR-19a/ 19b或模拟物	增殖	8周小鼠 (N, MI)	EdU、pH3、Aurora B阳性细胞	积极结果: 梗死心脏再生阳性信号显著增加, 梗死心脏纤维化减轻, 功能恢复。
Fu等 (2022) ^[61]	NPPA-AS1沉默	NPPA-AS1	增殖	8周小鼠 (MI)	EdU、Ki67、pH3、Aurora B阳性细胞	积极结果: 梗死心脏再生阳性信号成倍增加, 梗死心脏纤维化减轻一半, 功能恢复。

注: N: 健康动物模型; MI: 心肌梗死动物模型; IRI: 心肌缺血再灌注动物模型。

表2 成年哺乳动物心肌细胞再生过程中的去分化与再分化研究

作者	再生手段	靶分子	研究主题	成年动物模型	心肌细胞再生检测指标	积极结果和/或副作用
Tian等 (2015) ^[29]	条件性过表达 miR-302-367	miR-302-367	去分化 增殖	8~10周小鼠 (N, MI)	BrdU、Ki67、pH3、Aurora B阳性 细胞, 心肌细胞数量	积极结果: 再生信号成倍增加, 梗死心脏功能改善。 副作用: 长期表达诱导去分化和功能障碍。
Gabisonia等 (2019) ^[70]	AAV6载体介导过表达	miR-199a-3p	去分化 增殖	3~4月猪 (N, IRI)	Ki67、pH3、Aurora B阳性细胞	积极结果: 心肌修复得到改善, 心力衰竭程度改善。 副作用: 持续表达引起心电图紊乱、心律失常、死亡。
Huang等 (2019) ^[55]	AAV9-shRNA circNfix	Nfix circRNA	去分化 增殖	8~10周小鼠 (N, MI)	心肌AAV9-shcircNfix-GFP标记细胞 数, Ki67、Aurora B、pH3、EdU 阳性细胞; RUNX1	积极结果: circ Nfix敲除导致成年小鼠再生信号成倍 增加; 梗死心脏血管生成增加, 心脏功能恢复。
Li等 (2018) ^[58]	心肌条件性激活; AAV9载体介导 过表达	Gp130	去分化 增殖	6~8周小鼠 (N, MI)	pH3阳性细胞, 心肌细胞大小	积极结果: 细胞再生信号增强, 细胞大小不变, 梗 死心脏泵血功能恢复。
Wang等 (2017) ^[68]	条件性突变; AAV6 介导突变体过表达	Cx43	去分化 增殖 再分化	4月小鼠 (N, MI)	Runx1和Dab2; Ki67、PH3、EdU 阳性细胞	积极结果: EdU阳性心肌细胞中肌节阳性比例增加, 心肌重构减轻, 心功能改善。
Chen等 (2021) ^[65]	饮用强力霉素水	OSKM 四分子	去分化 增殖 再分化	9~16周小鼠 (N, MI)	EdU、Aurora B、pH3阳性细胞	积极结果: 再生信号增加; 损伤心脏梗死面积减小, 术前6 d和术后1 d给药改善心脏功能。
Du等 (2022) ^[66]	腹腔注射5SM	糖酵解和核甘 酸生物合成 相关分子	去分化 增殖 再分化	成年大鼠 (N, MI)	Ki67、pH3阳性细胞	积极结果: 心肌再生成倍增加, 损伤心脏梗死面积 减小, 梗死后心脏功能得以改善。

注 N: 健康动物模型; MI: 心肌梗死动物模型; IRI: 心肌缺血再灌注动物模型

细胞周期,出现细胞核和胞质分裂,实现细胞增殖和组织再生^[25-26,29,65]。只是如何诱导心肌去分化和重新进入细胞周期尚未完全被厘清。

五小分子 (five small molecules, 5SM) “鸡尾酒”可以通过乳酸-lacRS2-mTOR途径诱导心肌细胞的代谢过程向糖酵解、生物合成、去分化趋势转化,同时去分化与细胞周期相关分子、mTOR、PI3K-AKT、甲羟戊酸信号基因发生上调, JAK-STAT、氧化磷酸化和分化信号 Ryr2 基因下调,最终显著诱导心肌细胞进入细胞周期和胞质分裂^[66]。miRNAs 也参与调节心肌细胞去分化和增殖。缺失 miRNA 簇 miR-302-367 导致小鼠心肌细胞增殖减少^[67]。过表达 miR-302-367 或补充模拟物可以通过抑制 Hippo 信号转导通路促进心肌细胞增殖,调节成年小鼠心肌再生;持续表达 miR-302-367 会引起细胞过度去分化导致心脏收缩功能障碍^[29]。

因此,心肌去分化过程对心肌细胞进入细胞周期至关重要,注意避免去分化基因持续表达所致的高去分化和增殖状态导致成年哺乳动物心脏功能紊乱。

2.2.2 心肌细胞再分化研究

成年哺乳动物的心肌细胞 (adult cardiomyocytes, ACMs) 需要通过去分化、增殖和再分化 (dedifferentiation, proliferation, redifferentiation, DPR) 过程形成新的心肌细胞^[68],心肌细胞通过再分化获得收缩功能是实现心脏泵血功能的必要条件^[7]。

目前,关于心肌细胞通过去分化增殖和再分化环节实现心肌再生的研究并不多见。Wang 等^[68]借助延迟摄影技术发现,小鼠 ACMs 在与新生大鼠心室肌细胞共培养后,可以按照 DPR 过程进行细胞再生。从最初肌节分解的去分化状态开始,到无整齐收缩蛋白的增殖状态,最后呈现出收缩肌节整齐排列、细胞开始收缩的再分化状态。在此过程中,去分化标记物 Runx1、Dab2 与增殖标志物 Ki67、pH3 先后呈现高表达。在 DPR 过程中,心室肌细胞间隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 发挥了重要作用, Cx43 突变体 Cx43-s3e 磷酸化可以促进心肌细胞再分化以对抗缺血损伤,有助于心梗小鼠心肌功能恢复;同时,调节细胞生长、基因表达、分化和发育的 Ca²⁺ 信号^[69] 在心肌细胞再分化过程中也通过“钙调磷酸酶-NFAT (活化 T 细胞核因子)-MEF2C (肌细胞特异性增强因子 2C)”发挥核心调节作用。在人源 hsa-miR-199a-3p 诱导啮齿动物心梗后心肌再生的研究中发现,心内注射 AAV6-miR-

199a-3p 或补充核苷酸片段模拟物能够改善成年猪在心肌缺血/再灌注事件发生后的心肌再生水平,提高心脏功能并减缓心力衰竭^[70]。但是,接受基因治疗后的心肌梗死猪会出现心电信号紊乱、心律失常、死亡等恶性事件,这是由猪心肌细胞增殖后未能良好再分化所致。Chen 等^[65]的研究支持了心肌再生 DPR 过程的观点,通过补充强力霉素诱导模型小鼠心肌细胞特异性表达 Oct4、Sox2、Klf4 和 c-Myc (OSKM),可以引起细胞发生部分重编程和去分化,进入细胞周期,心肌 Aurora B 阳性信号增加。而成年小鼠在心肌梗死手术前 1 d、术后 1 d 和 6 d 起饮用强力霉素水也可以产生更多心肌细胞 EdU 阳性信号,心肌细胞部分重编程和去分化后依然可以发生再分化。因此,补充强力霉素可以诱导心肌细胞增殖和再分化。上述研究提示了精细调控 DPR 过程对于诱导心肌再生的必要性,强调了再分化在心肌再生中的关键作用。心肌细胞分化与心肌再生相关研究见表 2。

3 展望与总结

激活成年哺乳动物终末分化的心肌再生需要心肌细胞先进入去分化和增殖周期,而后再分化出具备收缩功能的心肌细胞^[8,29,71],增殖和分化在心肌再生中都具有重要意义^[68]。心肌缺血诱导出短暂的修复合活跃期,通过调节氧气供应、有氧代谢、氧化应激水平或给予有氧运动干预等可以成功诱导心肌细胞增殖,提示了氧气代谢和氧化应激在心肌细胞再生中的关键作用。综上所述,今后开展成年哺乳动物心肌自我更新与再生研究时,应对心肌再生过程中的去分化和增殖,尤其是再分化过程做更细致的分阶段检测;需要关注治疗手段的安全性;氧的代谢在成年哺乳动物心肌细胞再生中的作用可以被着重探讨。心肌再生有望成为非常有前景的心肌梗死治疗方法。

[参 考 文 献]

- [1] Prabhu SD, Frangogiannis NG. The biological basis for cardiac repair after myocardial infarction: from inflammation to fibrosis. *Circ Res*, 2016, 119: 91-112
- [2] Garbern JC, Lee RT. Heart regeneration: 20 years of progress and renewed optimism. *Dev Cell*, 2022, 57: 424-39
- [3] Park SJ, Kim RY, Park BW, et al. Dual stem cell therapy synergistically improves cardiac function and vascular regeneration following myocardial infarction. *Nat Commun*, 2019, 10: 3123
- [4] Xiong YY, Gong ZT, Tang RJ, et al. The pivotal roles of

- exosomes derived from endogenous immune cells and exogenous stem cells in myocardial repair after acute myocardial infarction. *Theranostics*, 2021, 11: 1046-58
- [5] Chien KR, Frisen J, Fritsche-Danielson R, et al. Regenerating the field of cardiovascular cell therapy. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 232-7
- [6] Becker C, Hesse M. Role of mononuclear cardiomyocytes in cardiac turnover and regeneration. *Curr Cardiol Rep*, 2020, 22: 39
- [7] Bostrom P, Mann N, Wu J, et al. C/EBP β controls exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell*, 2010, 143: 1072-83
- [8] Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, et al. Cardiomyocyte regeneration: a consensus statement. *Circulation*, 2017, 136: 680-6
- [9] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 2009, 324: 98-102
- [10] Haubner BJ, Schneider J, Schweigmann U, et al. Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction. *Circ Res*, 2016, 118: 216-21
- [11] Murugan SJ, Gnanapragasam J, Vettukattil J. Acute myocardial infarction in the neonatal period. *Cardiol Young*, 2002, 12: 411-3
- [12] Cesna S, Eicken A, Juenger H, et al. Successful treatment of a newborn with acute myocardial infarction on the first day of life. *Pediatr Cardiol*, 2013, 34: 1868-70
- [13] Boulton J, Henry R, Roddick LG, et al. Survival after neonatal myocardial infarction. *Pediatrics*, 1991, 88: 145-50
- [14] Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 2013, 493: 433-6
- [15] Ali SR, Hippenmeyer S, Saadat LV, et al. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 8850-5
- [16] Yi BA, Wernet O, Chien KR. Regenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration. *J Clin Invest*, 2010, 120: 20-8
- [17] Jiang YH, Zhu Y, Chen S, et al. Re-enforcing hypoxia-induced polyploid cardiomyocytes enter cytokinesis through activation of β -catenin. *Sci Rep*, 2019, 9: 17865
- [18] Nakada Y, Canseco DC, Thet S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature*, 2017, 541: 222-7
- [19] Kimura W, Nakada Y, Sadek HA. Hypoxia-induced myocardial regeneration. *J Appl Physiol* (1985), 2017, 123: 1676-81
- [20] Hirose K, Payumo AY, Cutie S, et al. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. *Science*, 2019, 364: 184-8
- [21] Bae J, Salamon RJ, Brandt EB, et al. Malonate promotes adult cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation*, 2021, 143: 1973-86
- [22] Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 2014, 515: 431-5
- [23] Her YF, Maher LJ, 3RD. Succinate dehydrogenase loss in familial paraganglioma: biochemistry, genetics, and epigenetics. *Int J Endocrinol*, 2015, 2015: 296167
- [24] Cardoso AC, Lam NT, Savla JJ, et al. Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell cycle progression. *Nat Metab*, 2020, 2: 167-78
- [25] Wu Y, Zhou L, Liu H, et al. LRP6 downregulation promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Cell Res*, 2021, 31: 450-62
- [26] Bersell K, Arab S, Haring B, et al. Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*, 2009, 138: 257-70
- [27] Reuter S, Soonpaa MH, Firulli AB, et al. Recombinant neuregulin 1 does not activate cardiomyocyte DNA synthesis in normal or infarcted adult mice. *PLoS One*, 2014, 9: e115871
- [28] von Gise A, Lin Z, Schlegelmil K, et al. YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 2394-9
- [29] Tian Y, Liu Y, Wang T, et al. A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 279ra238
- [30] Meng F, Xie B, Martin JF. Targeting the Hippo pathway in heart repair. *Cardiovasc Res*, 2022, 118: 2402-14
- [31] Xin M, Kim Y, Sutherland LB, et al. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 13839-44
- [32] Leach JP, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction. *Nature*, 2017, 550: 260-4
- [33] Ancey C, Menet E, Corbi P, et al. Human cardiomyocyte hypertrophy induced *in vitro* by gp130 stimulation. *Cardiovasc Res*, 2003, 59: 78-85
- [34] Pradervand S, Yasukawa H, Muller OG, et al. Small proline-rich protein 1A is a gp130 pathway- and stress-inducible cardioprotective protein. *EMBO J*, 2004, 23: 4517-25
- [35] Li Y, Feng J, Song S, et al. gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation*, 2020, 142: 967-82
- [36] Han Z, Wang X, Xu Z, et al. ALKBH5 regulates cardiomyocyte proliferation and heart regeneration by demethylating the mRNA of YTHDF1. *Theranostics*, 2021, 11: 3000-16
- [37] Hubert F, Payan SM, Pelce E, et al. FGF10 promotes cardiac repair through a dual cellular mechanism increasing cardiomyocyte renewal and inhibiting fibrosis. *Cardiovasc Res*, 2022, 118: 2625-37
- [38] Mahmoud AI, Kocabas F, Muralidhar SA, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*, 2013, 497: 249-53
- [39] Nguyen N, Canseco DC, Xiao F, et al. A calcineurin-Hoxb13 axis regulates growth mode of mammalian cardiomyocytes. *Nature*, 2020, 582: 271-6
- [40] 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.

- Dev Cell, 2020, 53: 102-16
- [41] Chen Y, Li X, Li B, et al. Long non-coding RNA ECRAR triggers post-natal myocardial regeneration by activating ERK1/2 signaling. *Mol Ther*, 2019, 27: 29-45
- [42] Liu B, Wang B, Zhang X, et al. Cell type-specific microRNA therapies for myocardial infarction. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabd0914
- [43] Verjans R, Van-Bilsen M, Schroen B. Reviewing the limitations of adult mammalian cardiac regeneration: noncoding RNAs as regulators of cardiomyogenesis. *Biomolecules*, 2020, 10: 262
- [44] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 187-92
- [45] Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. *Circ Res*, 2011, 109: 670-9
- [46] Chen J, Huang ZP, Seok HY, et al. miR-17-92 cluster is required for and sufficient to induce cardiomyocyte proliferation in postnatal and adult hearts. *Circ Res*, 2013, 112: 1557-66
- [47] Gao F, Kataoka M, Liu N, et al. Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction. *Nat Commun*, 2019, 10: 1802
- [48] Heallen TR, Kadow ZA, Wang J, et al. Determinants of cardiac growth and size. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020, 12: a037150
- [49] Allen DL, Harrison BC, Maass A, et al. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* (1985), 2001, 90: 1900-8
- [50] Vujic A, Lerchenmuller C, Wu TD, et al. Exercise induces new cardiomyocyte generation in the adult mammalian heart. *Nat Commun*, 2018, 9: 1659
- [51] Wencker D, Chandra M, Nguyen K, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest*, 2003, 111: 1497-504
- [52] Liu X, Xiao J, Zhu H, et al. miR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. *Cell Metab*, 2015, 21: 584-95
- [53] Li L, Guo J, Chen Y, et al. Comprehensive circRNA expression profile and selection of key circRNAs during priming phase of rat liver regeneration. *BMC Genomics*, 2017, 18: 80
- [54] Mohamed TMA, Ang YS, Radzinsky E, et al. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. *Cell*, 2018, 173: 104-16
- [55] Huang S, Li X, Zheng H, et al. Loss of super-enhancer-regulated circRNA Nfix induces cardiac regeneration after myocardial infarction in adult mice. *Circulation*, 2019, 139: 2857-76
- [56] Cai B, Zhang Y, Zhao Y, et al. Long noncoding RNA-DACH (dachshund homolog 1) regulates cardiac function by inhibiting SERCA2a (sarcoplasmic reticulum calcium ATPase 2a). *Hypertension*, 2019, 74: 833-42
- [57] Cai B, Ma W, Wang X, et al. Targeting LncDACH1 promotes cardiac repair and regeneration after myocardium infarction. *Cell Death Differ*, 2020, 27: 2158-75
- [58] Li X, He X, Wang H, et al. Loss of AZIN2 splice variant facilitates endogenous cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*, 2018, 114: 1642-55
- [59] Meloni M, Riley PR, Baker AH. A new “lnc” between non-coding RNA and cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*, 2018, 114: 1569-70
- [60] Cai B, Ma W, Ding F, et al. The long noncoding RNA CAREL controls cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72: 534-50
- [61] Fu W, Ren H, Shou J, et al. Loss of NPPA-AS1 promotes heart regeneration by stabilizing SFPQ-NONO heteromer-induced DNA repair. *Basic Res Cardiol*, 2022, 117: 10
- [62] Li B, Hu Y, Li X, et al. Sirt1 antisense long noncoding RNA promotes cardiomyocyte proliferation by enhancing the stability of Sirt1. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7: e009700
- [63] Eulalio A, Mano M, Dal-Ferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*, 2012, 492: 376-81
- [64] Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 2001, 105: 829-41
- [65] Chen Y, Luttmann FF, Schoger E, et al. Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science*, 2021, 373: 1537-40
- [66] Du J, Zheng L, Gao P, et al. A small-molecule cocktail promotes mammalian cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Cell Stem Cell*, 2022, 29: 545-58
- [67] Gladka MM, da Costa-Martins PA, De Windt LJ. Small changes can make a big difference—microRNA regulation of cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52: 74-82
- [68] Wang WE, Li L, Xia X, et al. Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury. *Circulation*, 2017, 136: 834-48
- [69] Ibarra C, Vicencio JM, Estrada M, et al. Local control of nuclear calcium signaling in cardiac myocytes by perinuclear microdomains of sarcolemmal insulin-like growth factor 1 receptors. *Circ Res*, 2013, 112: 236-45
- [70] Gabisonia K, Prosdocimo G, Aquaro GD, et al. MicroRNA therapy stimulates uncontrolled cardiac repair after myocardial infarction in pigs. *Nature*, 2019, 569: 418-22
- [71] Schwartz RS, Curfman GD. Can the heart repair itself. *N Engl J Med*, 2002, 346: 2-4