



心肌细胞增殖影响因素和评价方法

付文斌^{1,2}, 王伟^{1,2*}, 曾春雨^{1,2*}

1. 陆军军医大学大坪医院心血管内科, 重庆 400042;

2. 重庆市心血管病研究所, 重庆 400042

* 联系人, E-mail: weiericwang@163.com; chunyuzeng01@163.com

收稿日期: 2020-09-25; 接受日期: 2020-12-22; 网络版发表日期: 2021-01-27

国家自然科学基金(批准号: 81930008, U20A20344)资助

摘要 大量心肌细胞丢失是心肌梗死后进展为心力衰竭和临床死亡的主要原因. 近年来的研究证明, 成年哺乳动物心肌具有一定的再生能力, 但该能力十分有限而不足以修复受损的心脏组织, 因此促进内源性心肌再生是未来治疗心肌梗死的重要方向. 原有心肌细胞的增殖是内源性心肌再生的主要来源, 因而探索心肌细胞增殖的调控机制, 寻找促进心肌细胞增殖的干预措施成为心肌再生研究领域的热点, 并取得显著进展. 同时, 成年心肌细胞具有可多倍体化、多核化但难以胞质分裂等特点, 导致评估心肌增殖的方法成为难题, 精确量化心肌增殖的各种模型和体系不断被开发. 本文回顾总结了心肌再生的基本方式、心肌细胞增殖影响因素和评估方法, 探讨了当前内源性心肌再生研究领域的进展和挑战.

关键词 心肌梗死, 心肌再生, 心肌细胞增殖, 调控机制, 评价方法

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是世界范围内常见的危重心血管疾病. 虽然随着治疗手段的进步, MI患者经及时救治能挽救生命, 但长期来看, 由于大量心肌细胞丢失导致难以逆转的心力衰竭, MI患者的生存率仍然较低^[1]. 传统的观点认为, 哺乳动物心脏作为终末分化器官而无再生能力, 但是近年来的共识是成年心肌细胞在生理和病理情况下均具有一定的自我更新功能, 但其再生能力十分有限^[2], 自然条件下无法达到显著的修复效果. 研究人员利用谱系示踪技术发现, 心肌再生的主要来源是原有心肌细胞的增殖^[2]. 本团队^[3]发现, 成年心肌可能经过“去分化-增殖-再分化”三个环节完成增殖过程. 以c-kit⁺细胞为代表的“原位

心脏干细胞”心肌再生的观点受到质疑. 同时, 双荧光报告基因的谱系示踪技术证明, 心脏组织中其他非心肌细胞也难以向心肌细胞转分化^[4]. 因此, 越来越多的研究聚焦在如何促进和激活心肌细胞本身的增殖能力. 另一方面, 心肌细胞增殖的准确量化仍是难题. 心肌细胞增殖的完整过程包括DNA复制、胞核分裂和胞质分裂等阶段. 不完整的细胞分裂常常导致心肌细胞的多核化和多倍体化, 这个过程并没有增加心肌细胞的数量而不能称为心肌增殖再生, 然而当前的大部分检测手段无法辨别多核化/多倍体化与增殖. 因此, 准确的心肌细胞分裂评估方法对于促进成年心肌再生和研究心肌细胞增殖的机制具有重大意义. 本文将就

引用格式: 付文斌, 王伟, 曾春雨. 心肌细胞增殖影响因素和评价方法. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 161–173

Fu W B, Wang W, Zeng C Y. Influencing factors and evaluation methods of cardiomyocyte proliferation (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 161–173, doi: [10.1360/SSV-2020-0327](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0327)

心肌再生基本方式、心肌细胞增殖影响因素和评估方法的最新进展进行综述。

1 心肌再生的基本方式

1.1 心肌再生的来源

心肌再生的来源作为研究前沿热点存在较大争论, 主要有“心脏干细胞”学说和原有心肌细胞增殖学说。心脏干细胞(cardiac stem cell, CSC)或心脏前体细胞是指成年哺乳动物心脏组织中固有的一类干细胞。最早也最具代表性的报道是从成年心脏中分离的c-Kit⁺的具有自我更新能力和多向分化潜能的CSC, 单个c-Kit⁺ CSC可以分化为多个细胞谱系, 包括心肌细胞、内皮细胞和平滑肌细胞。然而, 近几年的多项基于谱系示踪技术的独立研究怀疑c-Kit⁺干细胞在体内的重要性。利用内源性c-Kit基因启动子下Cre表达的敲入策略制备的转基因小鼠可将c-Kit⁺细胞及其子代细胞永久标记绿色荧光, 最终发现很少量绿色荧光标记的心肌细胞, 标记成功的很多是细胞融合的结果, 而不是转分化的结果^[5,6]。新一代的双重重组酶谱系示踪技术, 解决了上一代系统重组酶的潜在局限性, 可分别对c-Kit⁺非心肌细胞和c-Kit⁺心肌细胞进行标记, 结果表明c-Kit⁺非心肌细胞无法分化为新的心肌细胞^[4]。除了c-Kit, 之后Sca-1, Isl1和Abcg2等类型的CSCs也被不同的研究组报道, 通过无干细胞标记和双同源重组技术的谱系示踪小鼠系统证实, 仅在小鼠胚胎发育期非心肌细胞可以向心肌细胞转分化, 而在新生期和成年期不会发生^[7], 因此出生后心肌再生的来源主要为原有心肌细胞的增殖。

1.2 心肌细胞增殖模式

在低等脊椎动物斑马鱼中, 成年再生的心肌细胞来源于去分化的心肌细胞, 并伴随增殖和再分化^[8]。成年心肌细胞的去分化表现为肌小节解聚、线粒体泄露、电位解耦连和细胞周期进展因子的表达, 再分化的特征是细胞形态、肌小节和收缩功能的恢复^[9]。进一步的研究建立了以分离的、钙离子超载的和电位解耦连的成年小鼠心肌细胞和持续搏动的新生大鼠心肌细胞共培养的体系, 该系统可以模拟体内梗死边缘区缺血环境下存活的心肌细胞, 结合谱系示踪和实时荧光追踪技术, 发现成年小鼠心肌细胞的增殖同样经历

去分化、增殖和再分化的过程^[3], 因此心肌细胞的增殖模式可能具有一定的保守性。

1.3 心肌再生的模型

低等脊椎动物, 如斑马鱼、蝾螈等出生后, 其心脏毕生均具有完全的再生能力, 哺乳动物的心脏仅在出生早期具有完全的再生能力, 该能力在出生后迅速下降至极低水平, 例如, 小鼠出生后1~7天、小型猪出生后1~3天均具有完全的再生能力, 之后再再生能力迅速减退, 成年后基本丧失^[10,11]。物种进化的过程中心肌再生能力丧失的现象本身就是一种研究心肌细胞增殖的模型, 对跨越41个物种的单核二倍体心肌细胞的丰度分析发现, 其比例与标准代谢率、体温和血清甲状腺素水平成反比, 由此线索得知哺乳动物心脏再生潜能的丧失和多倍体化与变温动物向恒温动物的演化有关, 并且进一步证实甲状腺激素信号的失活可以减少小鼠心肌细胞的多倍体化, 延迟细胞周期的退出, 促进成年心脏再生潜能^[12]。此外, 基于小鼠P1 (postnatal one day)心肌完全再生, P7丧失此能力和成年后(P28)心肌细胞增殖能力降到最低的特点, P1、P7和P28的小鼠心脏为最常见的心肌增殖相关因子的筛选模型, 值得注意的是, 这种筛选具有除心肌增殖能力以外的细胞生长、多核化、多倍体化等伴随因素的影响^[13], 而针对乳鼠的心肌损伤后再生模型, 如心尖切除、冰冻和前降支结扎, 则可取得日龄相同而增殖能力不同的心肌。

2 心肌细胞增殖的影响因素

2.1 能量代谢与氧化应激

哺乳动物出生前后环境因素的显著差异是影响心肌再生能力的重要因素(图1), 胎儿心脏由于动静脉分流而暴露在相对低氧的环境中^[14], 然而, 从宫内相对低氧到宫外富氧环境的过渡中动脉氧分压可从30 mmHg增加到100 mmHg^[15,16], 这种变化导致心脏代谢方式从胚胎期的糖酵解代谢为主向成年期的脂肪酸代谢为主转换^[17], 同时触发心肌细胞周期基因沉默^[18]。其机制为脂肪酸有氧代谢提供同等量的ATP时产生更多的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS), 而ROS聚集介导的DNA损伤导致细胞增殖周期停滞^[19]。改变富氧环境有利于心肌再生, 将成年小鼠暴露于慢性严重

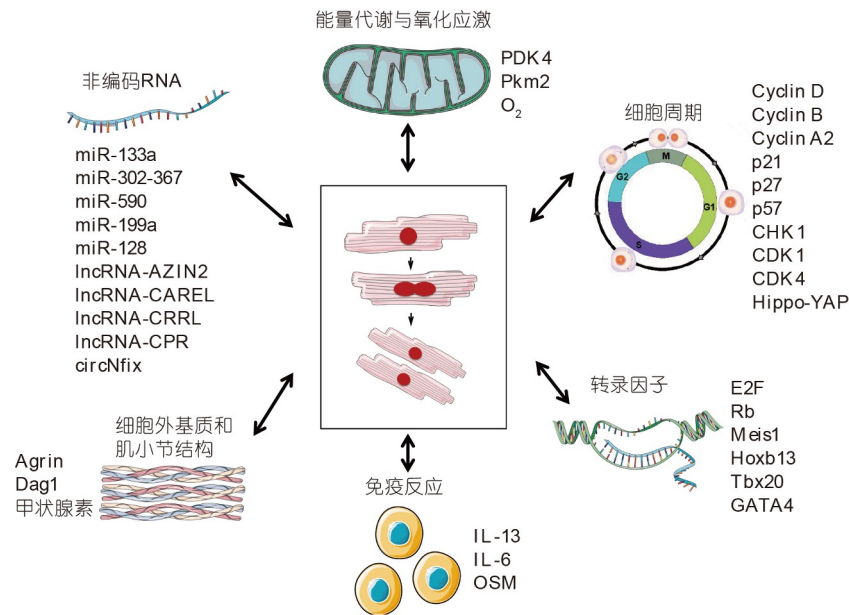


图 1 促进内源性心肌再生的策略

Figure 1 Strategies to promote endogenous cardiac regeneration

低氧环境中可以促使线粒体Krebs循环和脂肪酸氧化相关酶表达下调, 减少线粒体ROS和氧化应激介导的DNA损伤, 最终导致心肌细胞代谢和细胞周期的重编程^[20]。同时, 代谢相关蛋白酶也是改变心肌细胞增殖能力的有效靶点, 通过心肌细胞特异性敲除PDK4, 增强心肌细胞中丙酮酸来源的糖酵解, 减少脂肪酸氧化, 可以减少心肌细胞DNA损伤并促进再生, 改善梗死后左室心功能^[21]。敲除糖酵解酶丙酮酸激酶的同工酶Pkm2也可通过调控糖酵解和减少心肌细胞DNA损伤, 在急性或慢性心肌梗死后, 增加心肌细胞增殖分裂, 增强心功能, 提高长期生存率^[22]。这提示脂肪酸氧化代谢抑制心肌细胞增殖, 而糖酵解促进心肌细胞增殖(表1)。

2.2 细胞周期调控因子

研究表明, 小鼠出生后早期心脏具有解剖和功能上的完全再生能力, 该能力在出生后第7天基本丧失, 心肌细胞周期的停滞与多种细胞周期调控因子相关^[23,24]。Cyclin D是G1/S期过渡的驱动蛋白, 生理情况下高表达Cyclin D1, D2或D3都可以促进体外心肌细胞DNA的合成和增殖, 然而在小鼠心肌梗死后, 高表达Cyclin D1或D3会导致Cyclin D的过量蓄积, 反而抑

制DNA的合成, 只有持续高表达Cyclin D2不改变细胞周期蛋白的定位, 有利于心肌再生和梗死消退^[25]。Cyclin B表达于G2期以驱动细胞进出M期, 过表达Cyclin B1-CDC2复合体可诱导心肌细胞重新启动细胞分裂^[26]。Cyclin A2是G1/S和G2/M期过渡的关键调节因子, 出生后心脏中表达沉默, 从胚胎期到成年Cyclin A2的持续高表达可促进心肌细胞增殖和心脏过度生长, 利用病毒载体在小鼠或猪心梗后短暂过表达Cyclin A2均可以有效地诱导心肌再生和心功能恢复^[27,28]。细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin dependent kinase, CDK)可参与细胞周期蛋白的修饰介导细胞增殖, CDK抑制因子p21, p27和p57沉默可诱导新生和成年心肌细胞进入S期, 启动DNA的合成^[29]。细胞周期检测点激酶1(cell cycle checkpoint kinase 1, CHK1)是新生小鼠心脏再生的关键信号分子, 同时在成年心脏中过表达CHK1可通过激活mTORC1/P70S6K途径来促进心肌细胞增殖^[30](表1)。鉴于CDK和细胞周期蛋白的协同效应, 进一步的研究组合CDK1, CDK4, Cyclin B1和Cyclin D1共同调控细胞周期, 并结合谱系追踪系统发现, 表达这4种因子的成年心肌细胞中有15%~20%经历了真实胞质分裂, 并有助于急性或亚急性心肌梗死后心脏功能的改善^[31]。

表 1 心肌细胞增殖的影响因素

Table 1 Influencing factors for cardiomyocyte proliferation

影响因素	机制	参考文献
能量代谢与氧化应激		
PKD4	增强丙酮酸来源的糖酵解, 减少脂肪酸氧化, 减少心肌细胞DNA损伤	[21]
Pkm2	增强糖酵解和减少心肌细胞DNA损伤	[22]
O ₂	减少ROS聚集介导的心肌细胞DNA损伤	[20]
细胞周期调控因子		
Cyclin D	驱动细胞周期由G1向S期过渡	[25]
Cyclin B	驱动细胞周期由G2向M期过渡	[26]
Cyclin A2	驱动细胞周期由G1向S期和G2向M期过渡	[27,28]
p21, p27, p57	抑制CDK阻碍细胞周期进入S期	[29]
CHK1	激活mTORC1/P70S6K途径来促进心肌细胞增殖	[30]
CDK1, CDK4	修饰细胞周期蛋白介导心肌细胞增殖	[29]
转录因子		
E2F	激活Cyclin A和Cyclin E促进心肌细胞增殖	[32]
Meis1	激活CDK抑制剂 <i>p15</i> , <i>p16</i> 和 <i>p21</i> 的转录抑制心肌细胞增殖	[34]
Tbx20	激活BMP2/pSmad1/5/8和PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路, 抑制细胞周期抑制基因 <i>p21</i> , <i>Meis1</i> 和 <i>Btg2</i> 的转录	[37,38]
GATA4	抑制 <i>Fgf16</i> 的转录和旁分泌从而抑制心肌细胞的增殖	[41]
Hippo-YAP	Hippo受到抑制时, YAP蛋白S127位点发生去磷酸化后入核, 结合TEAD蛋白启动下游增殖相关基因的表达	[42,43]
免疫反应信号		
IL-13	激活Erk1/2和Akt信号通路促进心肌细胞的增殖	[56]
IL-6	激活STAT3信号通路促进心肌细胞增殖	[53]
OSM	结合心肌细胞Gp130受体, 激活下游Src激酶诱导YAP蛋白Y357位点的磷酸化, 促进成年心肌细胞增殖	[57]
细胞外基质和肌小节		
Agrin	结合Dag1, 激活下游YAP的核转位和ERK信号通路, 促进心肌细胞肌小节解聚和增殖	[59]
甲状腺素	减少心肌细胞的多核化, 促进心肌细胞肌小节解聚和增殖	[12]
非编码RNA		
miR-133a	促进SRF和Cyclin D2的表达, 促进心肌细胞增殖	[66]
miR-302-367	通过Hippo-YAP信号通路, 促进心肌细胞增殖	[46]
miR-199a	抑制Cd151和p38的表达, 促进心肌细胞增殖	[68]
miR-128	调控组蛋白修饰因子SUZ12下调周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27的表达, 同时激活Cyclin E和CDK2的表达	[70]
lncRNA-AZIN2	竞争性抑制miR-214调控下游PTEN/PI3K/Akt信号通路	[71]
lncRNA-CAREL	竞争性抑制miR-296调控靶基因Trp53inp1和Itm2a的表达	[72]
lncRNA-CRRL	直接与miR-199a结合来增加Hopx的表达, 从而抑制心肌细胞增殖	[69]
lncRNA-CPR	结合并招募DNA甲基转移酶3A, 诱导增殖调控因子MCM3的甲基化和基因沉默, 从而抑制心肌细胞增殖	[73]
circNfix	增强Ybx1与Nedd4l的结合和降解, 抑制Cyclin A2和Cyclin B1的表达, 竞争抑制miR-214和调控下游 β -catenin的活性	[74]

2.3 转录因子

细胞周期调控因子受到多种转录因子的调控(图1, 表1). E2F转录因子家族与细胞周期相关基因的调控关系密切, E2F2和E2F4都能够促进新生离体心肌细胞的增殖, 而只有E2F2可以通过激活Cyclin A和Cyclin E诱导成年心脏再生^[32], Rb是E2F2的内源性抑制因子, Rb被CDK2和CDK4磷酸化后从Rb-E2F2复合体上解离, 能够触发DNA合成相关基因的表达, 促进心肌细胞增殖^[24,33]. Meis1是CDK抑制剂p15, p16和p21转录激活所必需的, 心肌细胞特异性敲除Meis1可以延长出生后心肌再生窗口, 并重新激活成年心肌细胞增殖, 促进心肌梗后心功能的恢复, 相反, 心肌细胞中Meis1的过表达降低了新生心肌细胞的增殖并抑制心肌再生^[34]. Hoxb13是Meis1的辅助因子, Hoxb13的磷酸化可调控Meis1核定位进而影响细胞周期, 心肌细胞特异性敲除Hoxb13也可以延长出生后心肌再生窗口, 促进成年心脏心肌细胞增殖^[35]. Tbx20是一种T-box转录因子, 在心脏的发育和维持中至关重要, 斑马鱼中Tbx20的敲除可以导致心肌细胞阻滞在G1/S期和增殖能力下降, 表现为心室和心房周长的缩小, 而过表达Tbx20则引起心肌细胞数量增加和心脏明显增大^[36]. 在成年小鼠心脏中, Tbx20通过激活BMP2/pSmad1/5/8和PI3K/AKT/GSK3 β / β -catenin信号通路同时抑制细胞周期抑制基因p21, Meis1和Btg2表达, 增加心肌细胞的增殖能力^[37,38]. 转录因子GATA4在P1心脏大量表达, 而在P7中显著降低, 这与心肌细胞周期退出的时间一致^[39], 抑制GATA4能够阻碍成年斑马鱼心脏损伤后的再生^[40], 在小鼠心脏中, 敲除GATA4通过下调Fgf16的分泌减少心肌细胞的增殖和再生能力^[41].

2.4 Hippo-YAP信号通路

Hippo信号通路对于哺乳动物的器官发育和稳态平衡调节至关重要(表1). Hippo信号的上游元件包括核心激酶STE20样蛋白激酶1和2(Mst1, Mst2), 肿瘤抑制因子1和2(LATS1, LATS2), 支架蛋白Salv和MOB结构域激酶激活剂(MOB1A, MOB1B); Hippo下游的关键信号分子是YAP. 当Hippo信号通路受到抑制时, YAP蛋白S127位点发生去磷酸化而后进入细胞核, 作为转录辅因子结合TEAD蛋白启动下游增殖相关基因的表达^[42,43]; 而当Hippo信号通路激活时, YAP磷酸化

而滞留于胞浆, TEAD失活从而减少增殖相关基因的转录^[44-46]. Hippo-YAP信号通路同时影响心脏发育和再生, 在心脏发育阶段通过下调Salv的表达而抑制Hippo-YAP通路, 可促进心肌细胞增殖导致心脏体积增大^[47], 而胚胎期心肌细胞特异性YAP的表达抑制会导致心肌细胞增殖减少和致死性心肌发育不全^[48]. 出生后早期YAP在心脏中表达显著, 但是成年后几乎检测不到, 通过抑制Salv或直接激活YAP均能够通过促进Cyclin A2, Cyclin B1和CDK1等细胞周期因子的转录促使成年心肌细胞重新进入细胞周期^[49,50]. Hippo-YAP信号通路还与多种心脏发育再生信号通路形成调控网络, ERBB2-NRG1信号通路的短暂激活可以诱发成年小鼠心肌梗后心肌细胞上皮细胞-间充质转化样再生反应, 此过程依赖于蛋白激酶ERK对YAP蛋白S352和S274位点的磷酸化, 而非Hippo上游原件LATS对YAP蛋白S127位点的磷酸化^[51]. 此外, Hippo-YAP信号通路与Wnt/ β -catenin信号通路交互调控Sox2和Snai2基因的转录, 共同作用控制心肌细胞的增殖能力和心脏的大小^[49].

2.5 免疫反应信号

炎症反应首先在心肌梗死后被激活, 其目的是清除坏死的组织碎片以利于修复梗死灶和形成纤维化瘢痕, 同时炎症免疫反应信号也可以调控心肌再生^[52]. 研究发现, 巨噬细胞的招募在新生和成年小鼠心脏损伤后发挥截然相反的作用, 新生心脏损伤后的免疫应答反应依赖的胚胎来源的巨噬细胞有助于促进心肌增殖再生, 而注射氯磷酸钠脂质体消耗巨噬细胞则导致新生心脏再生能力受损^[53]. 另一方面, 成年心肌梗死后源于循环单核细胞的巨噬细胞是损伤心肌炎症反应中的主要细胞群, 可引发心室重构, 应用选择性趋化因子CCR2抑制剂阻碍单核细胞的招募可以显著降低炎症反应, 继而增强心肌再生与修复, 提高心功能^[54,55]. 进一步的免疫反应与心肌再生研究聚焦于新生心脏巨噬细胞分泌的炎症因子上, 新生IL-13敲除小鼠表现为心肌细胞的增殖能力下降和切除后再生能力受损, 而重组IL-13的注射可以通过激活Erk1/2和Akt信号挽救心肌细胞的增殖再生能力^[56]; 另一项独立研究发现, 诱导新生小鼠免疫功能抑制也可以损害心肌再生能力, 并且IL-6/STAT3信号通路是调控心肌细胞增殖的关键^[53]; 进一步研究证实, 巨噬细胞在促进新生小鼠

心脏损伤后再生中分泌的关键分子为IL-6家族成员的抑瘤素OSM, 条件性敲除巨噬细胞的OSM可抑制新生小鼠心肌细胞增殖能力和再生; OSM通过结合心肌细胞Gp130受体, 激活下游Src激酶诱导YAP蛋白Y357位点的磷酸化, 促进成年心梗后心肌细胞增殖^[57]。综上, 免疫反应的调节对新生小鼠心肌再生至关重要, 也是促进成年心肌再生的关键策略(图1, 表1)。

2.6 细胞外基质和肌小节结构

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是在所有组织和器官中分布, 由细胞分泌到细胞外间质中的大分子物质构成的高度动态变化的网架结构, 其不仅参与与组织结构的连接和维持, 也参与调节组织的修复和再生。ECM的僵硬度和组分均可影响心肌细胞的肌小节结构和增殖能力: 低僵硬ECM培养可诱导新生心肌细胞表现出肌小节解聚、变圆和重新进入细胞周期等去分化特征, 而高僵硬ECM则导致新生心肌细胞肌小节聚集、形态扩散和细胞周期活性降低^[58]。目前, 研究发现在ECM的组分中, Agrin是影响心肌细胞增殖的关键调节因子, 其在心脏中的表达水平在小鼠出生后迅速降低。条件性敲除Agrin会导致P1小鼠心肌细胞增殖能力下降, 心脏受损后无法完全再生, 而心肌细胞条件性过表达Agrin可促进成年小鼠心肌梗死后的心脏再生, 其机制是通过Dag1分子结合DGC复合物并促进其降解, 激活下游YAP的核转位和ERK信号通路, 导致心肌细胞肌小节解聚和增殖能力增强^[59]。另一方面, 随着心肌细胞的成熟, 亚细胞结构发生变化, 细胞内肌丝、肌浆网和线粒体等细胞器明显增加^[60], 这种结构的复杂性是阻碍心肌细胞增殖的重要因素。研究表明, 肌小节的解聚对心肌细胞周期的进展至关重要, 成熟的心肌细胞胞浆中肌节丰富, 肌原纤维分解困难, 容易导致胞质分裂失败, 产生双核或多核的心肌细胞^[61]。多核心肌细胞是其细胞周期阻滞的重要特征, Hirose等人^[12]发现, 通过降低甲状腺激素水平或抑制甲状腺激素通路, 可导致成年小鼠心肌细胞多核化的减少、肌小节的解聚和心脏损伤修复能力的增强。综上, 证据表明ECM组分和心肌细胞肌小节结构的变化是促使其重新进入心肌细胞周期的重要条件(图1, 表1)。

2.7 非编码RNA

哺乳动物中非编码RNA(non-coding RNA,

ncRNA)约占转录基因组的98%^[62], 不同于mRNA, ncRNA并不通过编码蛋白质来发挥作用, 而是在表观遗传学、转录后、翻译和翻译后修饰等水平调控基因的表达^[63]。ncRNA主要包括微小RNA(microRNA, miRNA)、长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和环状RNA(circular RNA, circRNA)。近期研究发现, 多种ncRNAs通过调控基因表达在心脏发育和再生中发挥重要作用^[64,65]。(i) miRNA是一种长度为21~23个核苷酸的单链ncRNA, 目前已知多种miRNA在心肌再生中发挥作用。miR-133a-1和miR-133a-2的协同表达在心脏的发育调控中至关重要, 在小鼠中敲除miR-133a-1/miR-133a-2可上调SRF和Cyclin D2的表达, 促进心肌细胞增殖^[66]。miRNA簇miR-302-367对于维持小鼠发育过程中的心肌细胞增殖很重要, 并且在成年后过表达miR-302-367可以通过Hippo-YAP信号通路重新激活心肌的增殖再生, 但miR-302-367的长期高表达也会诱导心肌细胞的持续去分化和功能障碍^[46]。通过对人miRNA文库的高通量筛选分析发现, miR-590和miR-199a可促进离体成年心肌细胞增殖, 在小鼠心梗后发挥治疗作用^[67]。此外, 单独过表达miR-199a可以通过抑制Cd151和p38的表达来增加心肌细胞的数量^[68]。心肌细胞增殖的负性调控因子Hopx也是miR-199a的靶点^[69]。心肌细胞特异性敲除miR-128通过调控组蛋白修饰因子SUZ12下调周期蛋白依赖性激酶抑制剂p27的表达, 同时激活Cyclin E和CDK2的表达, 从而在成年心脏心梗后促进心肌梗死后心脏再生^[70]。(ii) lncRNA是一类长度超过200核苷酸的ncRNA, 目前研究发现lncRNA调控心肌细胞增殖的主要机制是作为竞争性内源RNA影响增殖相关miRNA的功能。lncRNA-AZIN2可以竞争抑制miR-214调控下游PTEN/PI3K/Akt信号通路, 影响成年心脏心肌细胞增殖^[71]。同时lncRNA-CAREL作为miR-296的竞争者内源RNA调控靶基因Trp53inp1和Itm2a的表达影响心肌再生^[72]。lncRNA-CRRL通过直接与miR-199a结合来增加Hopx的表达, 从而抑制心肌细胞的增殖^[69]。除了竞争性内源RNA的机制, lncRNA-CPR还可以通过直接结合并招募DNA甲基转移酶3A到MCM3基因启动子的CpG位点, 诱导增殖调控因子MCM3的甲基化和基因沉默, 从而抑制心肌细胞增殖^[73]。(iii) 环状RNA是ncRNA的一个特殊亚类, 其通过连接3'和5'末端形成

共价闭环结构。目前,发现circNfix的下调可促进心肌梗死后心肌细胞增殖和血管生成,抑制心肌细胞凋亡,改善心功能,其机制为增强Ybx1与E3泛素连接酶Nedd41的相互作用,并通过泛素化诱导Ybx1的降解,抑制Cyclin A2和Cyclin B1的表达,此外, circNfix还可以作为miR-214的竞争者内源RNA,促进Gsk3 β 表达并抑制 β -catenin的活性^[74]。综上,基于ncRNA来激活成年心脏再生是一种潜在的心梗治疗策略(图1,表1)。

3 心肌细胞增殖的评价方法

3.1 基于增殖分子标志的免疫荧光染色评估心肌细胞的增殖

基于增殖分子标志的免疫荧光染色主要包括核分裂标志(Ki67, PHH3和PCNA)和胞质分裂标志(Aurkb和Anillin)(表2)。Ki67蛋白在G1, S, G2, M期均有表达,而在G0期检测不到^[75]。PHH3为有丝分裂过程中组蛋白H3的丝氨酸残基(Ser10和Ser28)发生的磷酸化作用,最早出现在G2期的核周缘,在有丝分裂进入后期和末期时逐渐消退^[76]。PCNA的表达量与DNA的合成关系密切, G1晚期开始大量表达, S期达到高峰, G2/M期表达明显下调^[77]。Aurkb为调控有丝分裂过程中染色体分离的磷酸化激酶,其与特殊微管k纤维结合控制染色体的运动和分离,并于分裂末期聚集于赤道板区域,控制微丝的紧缩使细胞在此区域产生缢束,缢束逐渐加深使细胞体最后一分为二^[78]。Anillin同样位于有丝分裂的缢束区域,控制细胞胞质分裂^[79]。由此可见,核分裂标志物(Ki67, PHH3和PCNA)不能区分阳性标记的心肌细胞发生核内分裂、多核化或胞质分裂。胞质分裂标志(Aurkb和Anillin)虽然是可较为敏感地标记心肌细胞的胞质分裂,但Aurkb和Anillin在核分裂期也可少量表达,解决该问题的方法是利用其在胞质分裂过程中的分布特征,即表达在不对称的心肌细胞之间的细胞膜上(图2A)。

3.2 基于同位素或核苷酸类似物的掺入评估心肌细胞的增殖

最早利用同位素掺入基因组DNA反映心肌细胞更新的研究使用的是冷战期间核弹试验产生的¹⁴C,

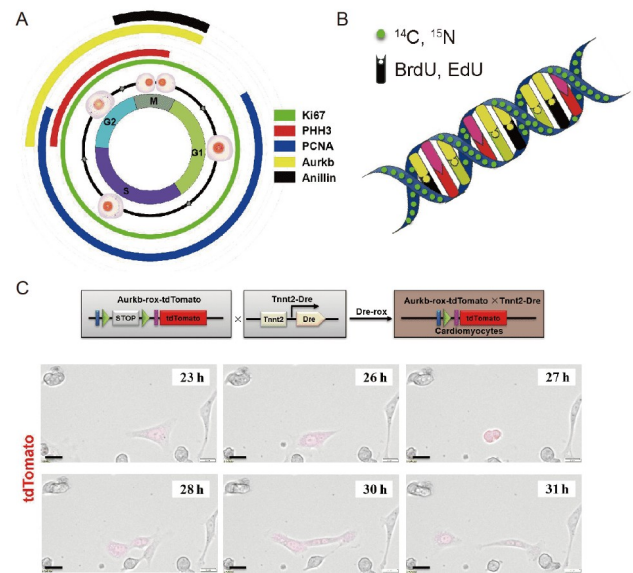


图2 心肌细胞增殖的评价方法。A: 细胞核分裂标志(Ki67, PHH3和PCNA)和胞质分裂标志(Aurkb和Anillin); B: 同位素(¹⁴C, ¹⁵N)或核苷酸类似物(BrdU, EdU)掺入DNA中; C: 基于Aurkb的增殖心肌细胞标记体系(摘自文献^[88])

Figure 2 Evaluation methods for cardiomyocyte proliferation. A: Markers for karyokinesis (Ki67, PHH3, and PCNA) and markers for cytokinesis (Aurkb and Anillin); B: isotope (¹⁴C, ¹⁵N) or nucleotide analog (BrdU, EdU) incorporation; C: an Aurora kinase B-based mouse system to identify and analyze proliferating cardiomyocytes (adapted from Ref. ^[88])

该回顾性分析发现,核试验之前出生的人部分心肌细胞中同样含有¹⁴C,人的一生中心肌细胞更新率约为50%,25岁时的年更新率为1%,75岁时的年更新率为0.45%^[80],该研究对传统心肌细胞成年后无法再生的观点提出了挑战。进一步的研究利用¹⁵N同位素标记的多同位素成像技术,以¹⁵N:¹⁴N比值代表心肌细胞DNA复制的能力,以此量化小鼠心脏的心肌细胞年更新率(约为4.4%),但DNA的复制还可生成多核细胞,在¹⁵N阳性心肌细胞中占比约17%的单核心肌细胞最可能来源于真实的胞质分裂,因此成年小鼠心脏中校正后的心肌细胞年更新率约为0.76%^[2]。目前,利用DNA掺入方法评价细胞增殖广泛使用的是胸腺嘧啶核苷类似物BrdU或EdU(表2),其能在DNA复制时期代替胸腺嘧啶(T)掺入正在合成的DNA分子中,基于荧光染料与BrdU/EdU的特异性反应,即可直接并准确地检测出发生过或正在发生的DNA复制^[81],但BrdU/EdU检测仅代表给药时间内累积的核分裂比例,无法反映真实的胞质分裂(图2B)。

表 2 心肌细胞增殖的评价方法

Table 2 Evaluation methods for cardiomyocyte proliferation

原理	具体类型	分裂方式	局限性
基于增殖分子标志的免疫荧光染色评估心肌细胞的增殖	Ki67 ^[75]	核分裂	不能区分阳性标记的心肌细胞发生核内分裂、多核化或胞质分裂
	PHH3 ^[76]	核分裂	
	PCNA ^[77]	核分裂	
	Aurkb ^[78]	胞质分裂	可以代表真实分裂, 但特征性表现为分布在对称的心肌细胞之间的细胞膜上, 比例低、识别困难
	Anillin ^[79]	胞质分裂	
基于同位素或核苷酸类似物的掺入评估心肌细胞的增殖	¹⁴ C ^[80]	核分裂	仅代表DNA的复制, 不能区分阳性标记的心肌细胞发生核内分裂、多核化或胞质分裂
	¹⁵ N ^[2]	核分裂	
	BrdU/EdU ^[81]	核分裂	
利用有丝分裂染色体重组现象来荧光标记子代心肌细胞	双重镶嵌标记小鼠体系(MADM) ^[82,83]	胞质分裂	可以代表真实的心肌细胞胞质分裂, 但该系统低估了50%以上的胞质分裂
利用转基因技术荧光标记增殖分子标志评估心肌细胞的增殖	荧光特异性标记泛素化细胞周期指标(FUCCI) ^[84]	核分裂	可以精细地可视化G1期或S/G2/M期的心肌细胞, 但不能区分核内分裂、多核化或胞质分裂
	Cyclin A2融合蛋白荧光标记 ^[85]	核分裂	不能区分阳性标记的心肌细胞发生核内分裂、多核化或胞质分裂
	Ki67转录驱动荧光标记的 ^[86]	核分裂	
	Anillin融合蛋白荧光标记 ^[87]	胞质分裂	可根据中心体定位和子代核间距准确区分核分裂和胞质分裂, 但识别困难
	Aurkb转录驱动荧光标记的 ^[88]	胞质分裂	可以代表真实的新生心肌细胞胞质分裂, 但高估了成年心肌细胞胞质分裂比例
利用谱系示踪和随机荧光标记报告系统观察心肌细胞的增殖	随机荧光标记报告小鼠系统 ^[89]	胞质分裂	可回顾性地追溯发生过胞质分裂的心肌细胞, 但不能实时可视化分裂的心肌细胞

3.3 利用有丝分裂染色体重组现象来荧光标记子代心肌细胞

由于多核化和多倍体化常见于成年心肌细胞中, 传统增殖分子标志的免疫荧光染色的方法很难区分心肌细胞的核分裂和胞质分裂. 为了解决这一难题, Zong等人^[82]建立了双重镶嵌标记系统(mosaic analysis with double markers, MADM), 该系统将两个相互嵌合荧光报告基因(*GFP*和*RFP*)敲入到相同位置的同源染色体上, 一条染色体含有由loxP位点间隔的N端*GFP*和C端*RFP*基因, 另一条染色体含有由loxP位点间隔的N端*RFP*和C端*GFP*基因, 分裂的细胞在G2期完成DNA复制后, Cre酶识别loxP位点诱导染色体重组激活荧光报告基因的表达, 随着分裂末期子染色体到达两极, 两个完成胞质分裂的子代细胞分别被荧光标记为绿色和红色. 研究者通过MADM系统发现, 仅在小鼠出生后第一个月可见有限且对称性的心肌细胞分裂, 而在成年期心肌梗死损伤不能提高心肌细胞分裂的比例^[83]. 但是, 由于同源重组分离可分为X和Z两种, 发生Z分离

的子代心肌细胞被标记为黄色和无色, 以及诱导跨染色体的同源重组的低效率, MADM系统低估了50%以上的胞质分裂(表2).

3.4 利用转基因技术荧光标记增殖分子标志评估心肌细胞的增殖

为了标记增殖的心肌细胞同时克服非心肌细胞的影响, 研究者们利用转基因技术建立了多种心肌细胞特异性增殖分子荧光标记小鼠体系(表2). 基于荧光特异性标记泛素化细胞周期指标小鼠体系(fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator, FUCCI)可以精细地可视化G1期或S/G2/M期的心肌细胞^[84]. 另一体系建立Cyclin A2和绿色荧光蛋白融合表达小鼠来量化心肌再生能力, 发现在出生后早期左心室心肌细胞周期活性高于右心室, 且没有检测到小鼠青春期心肌细胞增殖突然上升的现象^[85]. 在心肌细胞特异性Ki67转录驱动荧光标记的小鼠体系中发现, 荧光多在产后早期出现, 成年后几乎检测不到, 心肌梗死后

重新出现^[86], 然而此结果仅代表核分裂的比例变化, 不能代表胞质分裂. 为了进一步可视化体内胞质分裂的现象, Hesse等人^[87]建立了心肌细胞特异性的绿色荧光融合蛋白标记的胞质分裂特异性蛋白Anillin小鼠品系, 分析发现单纯的核分裂具有非典型中心体定位和子代核间距, 可用以区分核分裂和胞质分裂, 但此系统仍然具有观察时间窗有限的缺陷. 类似地, 本团队^[88]利用基于Aurkb的转录荧光(tdTomato)标记增殖的心肌细胞, 通过活细胞工作站观察发现, 该荧光信号与心肌细胞胞质分裂的匹配度为94.44%(图2C), 对tdTomato⁺不同倍性心肌细胞的分选分析表明, 当大多数心肌细胞都已进入有丝分裂后, 单核心肌细胞并不具有明显高于其他心肌细胞的增殖潜能, 而且新生小鼠心尖切除术后tdTomato⁺心肌细胞在损伤边缘区显著增加和富集, 而成年小鼠心肌梗死后tdTomato⁺心肌细胞没有增加.

3.5 利用谱系示踪和随机荧光标记报告系统观察心肌细胞的增殖

与以上方法不同的是, 一种脱离细胞有丝分裂特征性变化的体系采用随机荧光标记报告系统对小鼠早期心肌细胞进行荧光标记, 经过他莫昔芬诱导后, 其子代细胞具有相同的荧光蛋白, 该系统能够回顾性地追溯心肌细胞体克隆的过程. 在发育过程中的不同时间点对心肌细胞的克隆分析表明, 心肌细胞中的一个独特亚群可能具有出生后增殖的潜力^[89](表2). 该系统提供了一种测量心肌细胞分裂的新思路.

4 促心肌再生的临床前景和忧虑

虽然调控成年心肌细胞增殖的多种途径已被发现, 但心肌再生介导心功能提高的临床应用往往更加

复杂, 目前还没有促内源性心肌细胞增殖的临床研究, 而在大型动物模型的应用已经暴露出一些潜在的风险. 利用腺相关病毒载体注射人源性miR-199a进入心肌梗后猪的心脏, 虽然观察到心功能明显改善和心肌细胞增殖比例的上升, 然而也存在部分猪治疗后死于严重的心律失常, 可能是由于miR-199a的不稳定表达所致的增殖心肌细胞再分化障碍^[90]. 此外, 血管内注射重组人源性Agrin蛋白也能产生促心肌细胞增殖、改善免疫微环境和促进血管新生的协同作用, 治疗猪的缺血再灌注损伤^[91], 虽然重组蛋白注射的方法易于控制剂量和时间, 但是该方法缺乏心肌细胞作用的特异性, Agrin对其他器官的毒性和致癌效益有待进一步观察. 以上结果表明, 心肌细胞增殖相关基因干预的临床转化需要同时考虑靶向性、干预时间和程度的控制, 持续的诱导增殖而忽略再分化并不利于提高心脏收缩功能, 还具有致癌风险. 近期研制出人工合成的靶向心肌细胞的mRNA, 被命名为modRNA, 可进入细胞中翻译成蛋白质^[22], 有望用于基因干预的临床应用.

5 总结与展望

在哺乳动物心肌再生的研究中, 从新生心肌细胞增殖机制着眼进而探讨成年心脏再生是广泛使用的策略. 从子宫内到出生后的环境、代谢、表观修饰、信号通路等角度, 已经发现多种调控新生和成年期心肌再生的关键靶点. 然而干预这些靶点促心肌增殖的效果是否具有临床意义仍不清楚, 这些干预方法是否有潜在的致癌等副作用尚待明确. 同时, 建立准确且易于使用的评价心肌细胞增殖的模型体系对心肌再生研究领域至关重要. 结合目前各项策略的优点, 从DNA合成到胞质分裂持续性的可视化以区分单纯核分裂和胞质分裂可能是研究思路之一.

参考文献

- 1 Cahill T J, Choudhury R P, Riley P R. Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 699–717
- 2 Senyo S E, Steinhauser M L, Pizzimenti C L, et al. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*, 2013, 493: 433–436
- 3 Wang W E, Li L, Xia X, et al. Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury. *Circulation*, 2017, 136: 834–848
- 4 He L, Li Y, Li Y, et al. Enhancing the precision of genetic lineage tracing using dual recombinases. *Nat Med*, 2017, 23: 1488–1498

- 5 van Berlo J H, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. [Nature](#), 2014, 509: 337–341
- 6 Liu Q, Yang R, Huang X, et al. Genetic lineage tracing identifies *in situ* Kit-expressing cardiomyocytes. [Cell Res](#), 2016, 26: 119–130
- 7 Li Y, He L, Huang X, et al. Genetic lineage tracing of nonmyocyte population by dual recombinases. [Circulation](#), 2018, 138: 793–805
- 8 Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. [Nature](#), 2010, 464: 606–609
- 9 Kubin T, Pöling J, Kostin S, et al. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling. [Cell Stem Cell](#), 2011, 9: 420–432
- 10 Porrello E R, Mahmoud A I, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. [Science](#), 2011, 331: 1078–1080
- 11 Zhu W, Zhang E, Zhao M, et al. Regenerative potential of neonatal porcine hearts. [Circulation](#), 2018, 138: 2809–2816
- 12 Hirose K, Payumo A Y, Cutie S, et al. Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition. [Science](#), 2019, 364: 184–188
- 13 Alkass K, Panula J, Westman M, et al. No evidence for cardiomyocyte number expansion in preadolescent mice. [Cell](#), 2015, 163: 1026–1036
- 14 Dawes G S, Mott J C, Widdicombe J G. The foetal circulation in the lamb. [J Physiol](#), 1954, 126: 563–587
- 15 Lawrence J, Xiao D L, Xue Q, et al. Prenatal nicotine exposure increases heart susceptibility to ischemia/reperfusion injury in adult offspring. [J Pharmacol Exp Ther](#), 2008, 324: 331–341
- 16 Webster W S, Abela D. The effect of hypoxia in development. [Birth Defects Res C Embryo Today](#), 2007, 81: 215–228
- 17 Lopaschuk G D, Collins-Nakai R L, Itoi T. Developmental changes in energy substrate use by the heart. [Cardiovasc Res](#), 1992, 26: 1172–1180
- 18 Wisneski J A, Gertz E W, Neese R A, et al. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. [J Clin Invest](#), 1985, 76: 1819–1827
- 19 Prabhakar N R, Semenza G L. Oxygen sensing and homeostasis. [Physiology](#), 2015, 30: 340–348
- 20 Nakada Y, Canseco D C, Thet S W, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. [Nature](#), 2017, 541: 222–227
- 21 Cardoso A C, Lam N T, Savla J J, et al. Mitochondrial substrate utilization regulates cardiomyocyte cell cycle progression. [Nat Metab](#), 2020, 2: 167–178
- 22 Magadum A, Singh N, Kurian A A, et al. Pkm2 regulates cardiomyocyte cell cycle and promotes cardiac regeneration. [Circulation](#), 2020, 141: 1249–1265
- 23 Walsh S, Pontén A, Fleischmann B K, et al. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation *in vivo*—an analysis based on cardiomyocyte nuclei. [Cardiovasc Res](#), 2010, 86: 365–373
- 24 Sdek P, Zhao P, Wang Y, et al. Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes. [J Cell Biol](#), 2011, 194: 407–423
- 25 Pasumarthi K B S, Nakajima H, Nakajima H O, et al. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. [Circ Res](#), 2005, 96: 110–118
- 26 Bicknell K A, Coxon C H, Brooks G. Forced expression of the cyclin B1-CDC2 complex induces proliferation in adult rat cardiomyocytes. [Biochem J](#), 2004, 382: 411–416
- 27 Woo Y J, Panlilio C M, Cheng R K, et al. Therapeutic delivery of cyclin A2 induces myocardial regeneration and enhances cardiac function in ischemic heart failure. [Circulation](#), 2006, 114: I-206–I-213
- 28 Shapiro S D, Ranjan A K, Kawase Y, et al. Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction through cytokinesis of adult cardiomyocytes. [Sci Transl Med](#), 2014, 6: 224ra27
- 29 Di Stefano V, Giacca M, Capogrossi M C, et al. Knockdown of cyclin-dependent kinase inhibitors induces cardiomyocyte re-entry in the cell cycle. [J Biol Chem](#), 2011, 286: 8644–8654
- 30 Fan Y, Cheng Y, Li Y, et al. Phosphoproteomic analysis of neonatal regenerative myocardium revealed important roles of checkpoint kinase 1 via activating mammalian target of rapamycin C1/ribosomal protein S6 kinase b-1 pathway. [Circulation](#), 2020, 141: 1554–1569
- 31 Mohamed T M A, Ang Y S, Radzinsky E, et al. Regulation of cell cycle to stimulate adult cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. [Cell](#), 2018, 173: 104–116.e12
- 32 Ebelt H, Zhang Y, Kampke A, et al. E2F2 expression induces proliferation of terminally differentiated cardiomyocytes *in vivo*. [Cardiovasc Res](#), 2008, 80: 219–226
- 33 MacLellan W R, Garcia A, Oh H, et al. Overlapping roles of pocket proteins in the myocardium are unmasked by germ line deletion of p130 plus

- heart-specific deletion of Rb. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 2486–2497
- 34 Mahmoud A I, Kocabas F, Muralidhar S A, et al. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*, 2013, 497: 249–253
 - 35 Nguyen N U N, Canseco D C, Xiao F, et al. A calcineurin-Hoxb13 axis regulates growth mode of mammalian cardiomyocytes. *Nature*, 2020, 582: 271–276
 - 36 Lu F, Langenbacher A, Chen J N. Tbx20 drives cardiac progenitor formation and cardiomyocyte proliferation in zebrafish. *Dev Biol*, 2017, 421: 139–148
 - 37 Chakraborty S, Sengupta A, Yutzey K E. Tbx20 promotes cardiomyocyte proliferation and persistence of fetal characteristics in adult mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 62: 203–213
 - 38 Xiang F L, Guo M, Yutzey K E. Overexpression of Tbx20 in adult cardiomyocytes promotes proliferation and improves cardiac function after myocardial infarction. *Circulation*, 2016, 133: 1081–1092
 - 39 Malek Mohammadi M, Kattih B, Grund A, et al. The transcription factor GATA4 promotes myocardial regeneration in neonatal mice. *EMBO Mol Med*, 2017, 9: 265–279
 - 40 Kikuchi K, Holdway J E, Werdich A A, et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4*⁺ cardiomyocytes. *Nature*, 2010, 464: 601–605
 - 41 Yu W, Huang X, Tian X, et al. GATA4 regulates *Fgf16* to promote heart repair after injury. *Development*, 2016, 143: 936–949
 - 42 Porrello E R, Olson E N. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem Cell Res*, 2014, 13: 556–570
 - 43 Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: Hippo signaling and beyond. *Physiol Rev*, 2014, 94: 1287–1312
 - 44 Leach J P, Heallen T, Zhang M, et al. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction. *Nature*, 2017, 550: 260–264
 - 45 Diez-Cuñado M, Wei K, Bushway P J, et al. miRNAs that induce human cardiomyocyte proliferation converge on the Hippo pathway. *Cell Rep*, 2018, 23: 2168–2174
 - 46 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: 279ra38
 - 47 von Gise A, Lin Z, Schlegelmilch 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: 2394–2399
 - 48 Wang J, Liu S, Heallen T, et al. The Hippo pathway in the heart: pivotal roles in development, disease, and regeneration. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15: 672–684
 - 49 Heallen T, Zhang M, Wang J, et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*, 2011, 332: 458–461
 - 50 Xin M, Kim Y, Sutherland L B, et al. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Sci Signal*, 2011, 4: ra70
 - 51 Aharonov A, Shakked A, Umansky K B, et al. ERBB2 drives YAP activation and EMT-like processes during cardiac regeneration. *Nat Cell Biol*, 2020, 22: 1346–1356
 - 52 Frangogiannis N G. Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol*, 2015, 30: 240–245
 - 53 Han C, Nie Y, Lian H, et al. Acute inflammation stimulates a regenerative response in the neonatal mouse heart. *Cell Res*, 2015, 25: 1137–1151
 - 54 Aurora A B, Porrello E R, Tan W, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest*, 2014, 124: 1382–1392
 - 55 Lavine K J, Epelman S, Uchida K, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 16029–16034
 - 56 Wodsdalek D J, Paddock S J, Wan T C, et al. IL-13 promotes *in vivo* neonatal cardiomyocyte cell cycle activity and heart regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316: H24–H34
 - 57 Li Y, Feng J, Song S, et al. gp130 controls cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Circulation*, 2020, 142: 967–982
 - 58 Yahalom-Ronen Y, Rajchman D, Sarig R, et al. Reduced matrix rigidity promotes neonatal cardiomyocyte dedifferentiation, proliferation and clonal expansion. *eLife*, 2015, 4: e07455
 - 59 Bassat E, Mutlak Y E, Genzelinakh A, et al. The extracellular matrix protein agrin promotes heart regeneration in mice. *Nature*, 2017, 547: 179–184
 - 60 Piquereau J, Ventura-Clapier R. Maturation of cardiac energy metabolism during perinatal development. *Front Physiol*, 2018, 9: 959
 - 61 Engel F B, Schebesta M, Keating M T. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41: 601–612

- 62 Djebali S, Davis C A, Merkel A, et al. Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 2012, 489: 101–108
- 63 Abbas N, Perbellini F, Thum T. Non-coding RNAs: emerging players in cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration. *Basic Res Cardiol*, 2020, 115: 52
- 64 Bär C, Chatterjee S, Thum T. Long noncoding RNAs in cardiovascular pathology, diagnosis, and therapy. *Circulation*, 2016, 134: 1484–1499
- 65 Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 68: 2577–2584
- 66 Liu N, Bezprozvannaya S, Williams A H, et al. MicroRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev*, 2008, 22: 3242–3254
- 67 Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, et al. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature*, 2012, 492: 376–381
- 68 Tao Y, Zhang H, Huang S, et al. miR-199a-3p promotes cardiomyocyte proliferation by inhibiting Cd151 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516: 28–36
- 69 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 Mol Cell Cardiol*, 2018, 122: 152–164
- 70 Huang W, Feng Y, Liang J, et al. Loss of microRNA-128 promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration. *Nat Commun*, 2018, 9: 700
- 71 Li X, He X, Wang H, et al. Loss of AZIN2 splice variant facilitates endogenous cardiac regeneration. *Cardiovasc Res*, 2018, 114: 1642–1655
- 72 Cai B, Ma W, Ding F, et al. The long noncoding RNA CAREL controls cardiac regeneration. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 72: 534–550
- 73 Ponnusamy M, Liu F, Zhang Y H, et al. Long noncoding RNA CPR (cardiomyocyte proliferation regulator) regulates cardiomyocyte proliferation and cardiac repair. *Circulation*, 2019, 139: 2668–2684
- 74 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: 2857–2876
- 75 Li L T, Jiang G, Chen Q, et al. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep*, 2015, 11: 1566–1572
- 76 Puripat N, Loharamtaweethong K. Phosphohistone H3 (PHH3) as a surrogate of mitotic figure count for grading in meningiomas: a comparison of PHH3 (S10) versus PHH3 (S28) antibodies. *Virchows Arch*, 2019, 474: 87–96
- 77 Lin Y C, Wang Y, Hsu R, et al. PCNA-mediated stabilization of E3 ligase RFWD3 at the replication fork is essential for DNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: 13282–13287
- 78 Tian J, Tian C, Ding Y, et al. Aurora B-dependent phosphorylation of Ataxin-10 promotes the interaction between Ataxin-10 and Plk1 in cytokinesis. *Sci Rep*, 2015, 5: 8360
- 79 Kim H, Johnson J M, Lera R F, et al. Anillin phosphorylation controls timely membrane association and successful cytokinesis. *PLoS Genet*, 2017, 13: e1006511
- 80 Bergmann O, Bhardwaj R D, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 2009, 324: 98–102
- 81 Harris L, Zalucki O, Piper M. BrdU/EdU dual labeling to determine the cell-cycle dynamics of defined cellular subpopulations. *J Mol Hist*, 2018, 49: 229–234
- 82 Zong H, Espinosa J S, Su H H, et al. Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell*, 2005, 121: 479–492
- 83 Ali S R, Hippenmeyer S, Saadat L V, et al. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 8850–8855
- 84 Alvarez Jr R, Wang B J, Quijada P J, et al. Cardiomyocyte cell cycle dynamics and proliferation revealed through cardiac-specific transgenesis of fluorescent ubiquitinated cell cycle indicator (FUCCI). *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 127: 154–164
- 85 Hirai M, Chen J, Evans S M. Tissue-specific cell cycle indicator reveals unexpected findings for cardiac myocyte proliferation. *Circ Res*, 2016, 118: 20–28
- 86 Kretzschmar K, Post Y, Bannier-Hélaouët M, et al. Profiling proliferative cells and their progeny in damaged murine hearts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E12245–E12254
- 87 Hesse M, Doengi M, Becker A, et al. Midbody positioning and distance between daughter nuclei enable unequivocal identification of cardiomyocyte cell division in mice. *Circ Res*, 2018, 123: 1039–1052
- 88 Fu W, Liao Q, Li L, et al. An aurora kinase B-based mouse system to efficiently identify and analyze proliferating cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 570252
- 89 Sereti K I, Nguyen N B, Kamran P, et al. Analysis of cardiomyocyte clonal expansion during mouse heart development and injury. *Nat Commun*,

2018, 9: 754

- 90 Shi X E, Li Y F, Jia L, et al. MicroRNA-199a-5p affects porcine preadipocyte proliferation and differentiation. [Int J Mol Sci](#), 2014, 15: 8526–8538
- 91 Baehr A, Umansky K B, Bassat E, et al. Agrin promotes coordinated therapeutic processes leading to improved cardiac repair in pigs. [Circulation](#), 2020, 142: 868–881

Influencing factors and evaluation methods of cardiomyocyte proliferation

FU WenBin^{1,2}, WANG Wei^{1,2} & ZENG ChunYu^{1,2}

1 Department of Cardiology, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China;

2 Cardiovascular Research Center, Chongqing College, University of Chinese Academy of Sciences, Chongqing 400042, China

The massive loss of cardiomyocytes is the main cause of progression to heart failure and clinical death after myocardial infarction (MI). In recent years, accumulated studies have shown that adult mammalian heart is capable to regenerate, but this ability is too limited to repair damaged myocardium. Therefore, promoting endogenous cardiac regeneration is an important direction in the future treatment of MI. The proliferation of pre-existing cardiomyocytes is the main source of endogenous cardiac regeneration. Consequently, to explore the regulation mechanism of cardiomyocyte proliferation and to find the intervention measures have become the research focus in the field of cardiac regeneration, where significant progress has been made. At the same time, in order to accurately visualize the authentic division of cardiomyocytes, the researchers have developed a variety of advanced systems to assess cardiomyocyte proliferation ability based on the characteristics of cardiomyocytes which are prone to nucleation and difficult for cytokinesis. In this review, we presented the basic mode of cardiac regeneration, the influencing factors for cardiomyocyte proliferation and the feasible methods for cardiac regeneration evaluation to discuss the advances and challenges in the field of endogenous cardiac regeneration.

myocardial infarction, cardiac regeneration, cardiomyocyte proliferation, regulatory mechanism, evaluation methods

doi: [10.1360/SSV-2020-0327](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0327)