DOI:10.16016/j.1000-5404.202111168



单细胞组学视角下的心肌细胞增殖

曾春雨,付文斌 400042 重庆,陆军特色医学中心心血管内科,重庆市心血管病研究所

［**摘要**］ 单细胞多组学测序技术是在单细胞分辨率下精确分析细胞异质性和基因调控网络的新技术,提供了全新的视角来分析细胞的分化路径、细胞间的交互调控和细胞亚群的分离现象。心肌再生与修复是逆转心肌损伤后重构的重要研究方向。目前,单细胞多组学测序技术已应用于心肌再生领域:构建生理和病理条件下心肌再生图谱,探索心肌细胞增殖的分化路径和非心肌细胞对心肌再生的交互作用,建立全新的连续细胞周期分子标志监测的心肌细胞增殖评价体系以及寻找调控心肌细胞增殖的分子开关等,具有广阔的前景。本述评总结了近几年心肌再生领域的最新研究和进展,探讨单细胞技术在心肌再生领域研究中的应用及今后研究的方向,以期为后续研究提供积极合理的参考。

［**关键词**］ 单细胞多组学测序;心肌再生;心肌细胞增殖

［**中图法分类号**］ R322.11;R329.28;R394.2 ［**文献标志码**］ A

Cardiomyocyte proliferation at single-cell resolution

ZENG Chunyu, FU Wenbin Department of Cardiology, Chongqing Cardiovascular Research Center, Army Characteristic Medical Center, Chongqing, 400042, China

［**Abstract**］ Single-cell multi-omics sequencing is a new technology to accurately analyze cell heterogeneity and gene regulatory network at single-cell resolution, and provides a brand new perspective of pathway analysis on cell differentiation, interaction and heterogeneity. Cardiac regeneration is an important research direction for reversing myocardial injury and remodeling. At present, single-cell omics sequencing technologies have been wildly applied in the field of cardiac regeneration. Great achievements and prospects have been made in the following aspects: landscape of cardiomyocyte proliferation under physiological and pathological conditions; cardiomyocyte differentiation trajectory and interaction of non-cardiomyocytes on cardiac regeneration; new evaluation system for cardiomyocyte proliferation based on consecutively monitoring cell cycle molecular markers; molecular switch regulating cardiomyocyte proliferation. This review summarizes the latest research and progress in the field of cardiac regeneration and discusses the application and

［**基金项目**］ 国家自然科学基金重点项目(81930008)

［**通信作者**］ 曾春雨,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,长江学者特聘教授,国家杰出青年科学基金获得者,国家中青年科技创新领军人才,国家重点研发计划、973 计划项目首席科学家,国家“万人计划”领军人才,美国心脏学院杰出科学家奖获得者。担任中国医师心血管分会代谢心血管专委会副主任委员、中国生理学会整合生理专委会副主任委员、国家高血压医联体副理事长、国家高血压医联体重庆中心主任、中华医学会心血管专委会委员、重庆市医学会心血管病专业委员会主任委员等。先后获得重庆市自然科学一等奖、重庆市科技进步一等奖等 5 个奖项;获 2021 年度美国 ACC 杰出科学家奖、全国科技先进工作者、重庆市青年科技创新杰出奖、全国十大杰出青年提名奖、重庆市五四青年奖章等荣誉。主研的“成年心肌增殖”工作被评为“中国心血管领域十大进展、十大影响力事件”、被 *Nat Rev Cardiol* 评为年度里程碑影响;“GRK4 在高血压中的研究作用”成果被美国高血压学会评为 2015 年年度最具转化前景的工作,并被美国 NIH 的 STTR 项目委员会推荐为年度具有研发前景的 12 个项目之一。担任 *Clin Exp Hypertens*、*Hypertension*(中文版)和《中华高血压杂志》副主编、SCI 收录的国外 20 余种期刊编委。在 *Circulation*、*Circ Res*、*Eur Heart J* 等 SCI 收录的期刊发表 160 余篇。主要从事高血压病和心肌再生的基础和临床方面的研究。E-mail: chunyuzeng01@163.com

1000-5404/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

development direction of single-cell technologies in the field in order to provide positive and reasonable reference for the future research.

[**Key words**] single-cell multi-omics sequencing; cardiac regeneration; cardiomyocyte proliferation

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81930008). Corresponding author: ZENG Chunyu, E-mail: chunyuzeng01@163.com

心肌梗死(myocardial infarction,MI)是常见的危重心血管疾病之一,虽然早期的再灌注和药物治疗可以降低 MI 的发病率和死亡率,但由于心肌细胞的大量丢失,心室重构的进展仍然不可逆转,因此心肌再生与修复是逆转心肌损伤后重构的重要研究方向。单细胞多组学测序技术是在单细胞分辨率下精确分析细胞异质性和基因调控网络的新技术,将该技术与心肌再生领域的最新进展相结合,对于进一步研究心肌细胞增殖的模式、分化路径和调控基因具有积极的推动作用。

1 心肌细胞增殖的研究概况

1.1 内源性心肌细胞增殖的来源

最新的前沿研究已阐明成年后心肌再生的来源主要为原有心肌细胞的增殖,而心脏干细胞(cardiac stem cell,CSC)或心脏前体细胞仅在胚胎发育阶段可以转分化为心肌细胞[1]。最早报道的具有多向分化能力的成年心脏干细胞以 c-Kit 分子作为标志,c-Kit$^+$ CSC 能够在 MI 损伤后分化为心肌细胞,促进心肌再生[2-3]。此外,以 Sca1、Bmi1、Isl1 和 ABCG2 作为分子标志的心脏干细胞也被证实可以在成年心肌损伤后分化为心肌细胞[1]。然而,随着谱系示踪技术的发展和应用,成年心脏干细胞分化为心肌细胞的潜能是否存在于成年哺乳动物心脏内一直饱受质疑。直到新一代双重组酶谱系示踪体系的出现,真正阐明了成年后心肌细胞增殖的来源。应用 Cre-loxp 和 Dre-rox 的双重组酶体系首先解决了单重组酶体系重组酶泄露的潜在局限性,严格控制 Cre 重组酶仅在目标细胞中发挥剪切重组作用,荧光报告基因分别标记心肌细胞和 c-Kit$^+$的非心肌细胞,证实成年后 c-Kit$^+$的非心肌细胞在生理和病理情况下均无法转分化为心肌细胞,既往发现的 c-Kit$^+$ CSC 表达心肌细胞标记的现象主要是由于细胞融合或 Cre 重组酶泄露作用于非目标细胞的结果[4]。采用同样的策略无特殊分子标记示踪非心肌细胞和心肌细胞,再次证明成年后不仅是 c-Kit$^+$细胞,非心肌细胞均不可以分化为心肌细胞,心肌损伤后新生的心肌细胞主要来自于其本身的分裂增殖[1]。

1.2 心肌细胞增殖基本模式

心肌细胞的增殖模式具有一定的物种保守性。在低等脊椎动物斑马鱼中,心尖切除后,心肌细胞由功能态转换为增殖态,首先要经历以肌小节解聚和细胞间距增宽为特征的去分化,随后表达细胞周期相关基因进行分裂增殖[5];成年小鼠在急性 MI 或慢性扩张性心肌病的过程中同样也会导致心肌细胞去分化,值得注意的是,心肌细胞持续处于去分化的状态并不利于心功能的恢复,只有去分化的心肌细胞增殖、分裂、增加心肌细胞数量后进行再分化,完成肌小节解聚后再重组,形成具有收缩和舒张功能的心肌细胞,才能修复心肌损伤[6]。进一步的研究巧妙地建立了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,模拟在体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,首次连续动态观察成年心肌细胞的去分化、增殖和再分化的全过程[7]。因此,心肌再生需要以原有细胞分裂为源头,通过去分化、增殖和再分化的过程,最终增加功能态心肌细胞的数量,以逆转 MI 后心力衰竭。

2 单细胞组学技术在心肌再生中的应用

2.1 单细胞组学技术的概况

转录组、表观基因组、蛋白组学和代谢组学的差异赋予了组织内同样基因组背景下的单个细胞的功能特异性[8]。单个细胞的组学变化决定了组织器官的功能状态,因此,阐明组织的细胞异质性是破译器官生理功能和病理演变的关键。然而,以 bulk RNA 测序等为代表的传统方法掩盖了细胞的异质性,仅代表细胞组学变化的平均水平[8]。近 10 年来,单细胞组学技术应运而生,实现了在单细胞分辨率下研究分子的变化规律。其中应用最广泛也最成熟的为单细胞 RNA 测序(single-cell RNA sequencing,scRNA-seq),根据测序深度的不同,可分为 5' 或 3' 末端测序以及全长测序,全长测序的覆盖率更广,除表达差异外,还可得到可变剪接、单碱基突变、转录起始位点、单等位基因和印迹基因等信息[9-11]。染色体的开放程度与基因的转录密切相关,单细胞染色体的可及性测序(single-cell chromatin accessibility sequencing,scATAC-seq)是表观基因组层面基因表达变化的分析技术,其原理是通过高敏性的 Tn5 转座酶标记开放染色质区域的 DNA 片段,单细胞分辨率下的染色质可及性分析有助于揭示基因调控的顺式作用元件(启动子和增强子等)和反式作用因子(转录因子等)的变化信息[12],结合单细胞转录组学信息后,能够绘制基因组与转录组调控网络图谱。单细胞水平的蛋白组学技术目前仍处于瓶颈期,将流式细胞技术与质谱分析技术结合发展而来的

质谱流式细胞术(cytometry by time-of-flight,CyTOF)可实现单细胞水平上同时检测最高 42 种蛋白的表达变化[13]。另外基于酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)和单细胞标签技术衍生的单细胞蛋白标签芯片(single-cell barcode chip,SCBC)也可以同时检测同一细胞中超过 40 种蛋白的表达,并支持细胞培养来检测分泌型蛋白[14]。在同一个细胞中结合应用两种或两种以上的单细胞组学技术,可以为研究分子调控网络提供更高的分辨率,保证更准确地识别细胞亚群和细胞状态。目前已应用的单细胞多组学联合分析包括转录组和基因组、转录组和 DNA 甲基化、转录组和染色质可及性、转录组和蛋白组[8]。未来更深、更广的多组学联合分析有助于加深理解基因型和表型的联系,在包括心肌再生在内的各个生物学领域应用前景广阔。

2.2 单细胞组学技术研究心肌再生的最新进展

既往研究发现小鼠出生后 1~7 d 的心脏具有完全的再生能力,之后迅速减退,成年后再生能力基本丧失[15],利用这一特点,CUI 等[16]应用 scRNA-seq 对比出生后 1 d 和 8 d 小鼠在 MI 损伤后心肌细胞核的转录组差异,发现在可再生心脏中特异性出现的心肌细胞群可能是心肌再生的来源,这群细胞高表达 NFYa 和 NFE2L1 两种转录因子,并具有较高的糖代谢水平和 DNA 损伤清除能力,将表达 NFYa 和 NFE2L1 的 AAV9 病毒注射于成年小鼠心肌组织后可以促进 MI 后心肌再生和修复;此外,应用 scRNA-seq 和 scATAC-seq 联合分析转录组和染色质可及性差异,绘制再生心脏多细胞调控网络发现,心外膜细胞通过分泌 RSPO1 蛋白,激活内皮细胞膜上的 LRP6 和 LGR4 受体,以及下游的 Wnt/beta-catenin 信号通路,可以促进再生心肌的血管新生,同时巨噬细胞和单核细胞分泌的 CLCF1 蛋白也是促心肌细胞增殖的关键分子[17]。针对小鼠出生后 1~7 d 心脏可再生的特点,小鼠出生后早期阶段也是常见的研究心肌发育与增殖相关因子的筛选模型,近期研究提取细胞核应用 scRNA-seq 分析小鼠出生后 6 d 和 10 d 的转录组学图谱,将心肌细胞分为 3 种状态:发育态、增殖态和成熟态,建立了心肌细胞特异性的基因调控网络,验证了 Gdf15 分子是调控心肌细胞早期发育和成熟的关键因素[18]。另一项独立研究将出生后 1、4、7、14、56 d 小鼠心脏行 scRNA-seq,建立更全面的心脏发育图谱,发现小鼠心脏增殖下降的过程伴随着成纤维细胞和心肌细胞的成熟,将幼稚心肌细胞与幼稚或成熟成纤维细胞共培养后,观察到成熟成纤维细胞能够诱导心肌细胞的成熟和增殖能力下降,成熟的成纤维细胞往往导致细胞外基质的合成增加,应用细胞外基质合成抑制剂(Plerixafor 和 BP-1-102)能够有效逆转心肌细胞的成熟,促进心肌细胞增殖[19]。幼年期斑马鱼心尖切除后可完全再生,采用 scRNA-seq 分析损伤后修复的心肌,鉴定出一群具有显著去分化和增殖特征的心肌细胞,分析代谢相关基因,结果提示这群细胞糖代谢水平上升而线粒体氧化磷酸化水平下降,通过拟时分析模拟损伤边缘区和远离损伤区心肌细胞的变化轨迹,阐明了 Nrg1/Erbb2 信号通路是调控心肌细胞代谢模式转换和增殖的关键通路[20]。

2.3 不同单细胞测序技术平台研究心肌细胞增殖的优势与局限性

以单细胞 RNA 测序为例,其主要流程包括单细胞捕获、逆转录、扩增、文库制备、测序和数据分析等[21]。不同操作平台的差异主要体现在单细胞的获取层面,既具有各自的优势和劣势,需要根据组织细胞形状、体积以及实验目的的不同选取最合适的平台。针对心肌细胞的研究而言,幼年心肌细胞可经酶消化后形成直径小于 40 μm 的球体或椭球体,而成年心肌细胞为长度 50~150 μm 的杆状细胞。那么,如何选择最适于成年心肌细胞增殖研究的单细胞平台呢? 首先,以 10× Genomics 平台为代表的液滴微流控分选单细胞的技术具有高通量(每个样本 500~10 000 个细胞)、低成本和盲选捕获的优点,但是要求细胞为直径<40 μm 的球体或椭球体[22],因此此类型的平台仅可应用于幼年心肌细胞的研究,无法捕获成年杆状心肌细胞。另一种液滴微流控研究非球体单细胞的替代方式是捕获单个细胞核而不是完整的细胞,称作单细胞核 RNA 测序(single-nucleus RNA sequencing,snRNAseq)[16]。然而,成年小鼠心肌细胞根据细胞核数量的多少包括单核二倍体、单核四倍体、双核四倍体和多核多倍体细胞等,而且细胞核数量本身与成年心肌细胞增殖潜能具有联系[23],以单细胞核测序替代单细胞测序不可避免地高估了细胞的数量并且无法准确获得心肌细胞增殖过程的多组学变化情况。第二大类单细胞捕获方式是以 Smart-seq2 或 Smart-seq3 为代表的微管人工吸取或激光纤维切割的方式,不仅不受细胞形状和体积的限制,而且具有测序覆盖率更广和敏感性更高的优势,缺点是通量低和费时、费力[24]。最新的 ICELL8 平台是 Smart-seq2 体系的改良和优化,可以实现可视化地分选捕获单细胞,并具备较高的通量(约 2 000 个细胞)[25],因此,目前看来研究成年心肌细胞增殖最合适的单细胞捕获平台为 ICELL8。WANG 等[25]已经通过 ICELL8 平台建立人类成年心脏在正常、心力衰竭和左室辅助装置治疗后单细胞转录组学图谱,通过分析细胞异质性和细胞间调控网络发现,ACKR1 阳性的内皮细胞对心功能的恢复具有重要作用,应用 ICELL8 建立胚胎期、发育早期、幼稚期和成年期心脏的发育与再

生图谱也许是未来研究心肌细胞增殖的新方式之一。

3 展望

3.1 结合谱系示踪技术探索心肌细胞增殖的动态变化

单细胞测序分析的特色功能之一是根据斜坡理论模拟和重构细胞分化的路径,即拟时分析。心肌细胞分化路径之一为增殖,既往研究已经证明成年心肌细胞再生的变化路径主要为原有心肌细胞经去分化、增殖和再分化[7]。然而,心肌细胞在此路径中转录组、表观基因组、蛋白组学和代谢组学的动态变化图谱仍未被阐明,是否具有新的增殖分支路径和专职增殖心肌细胞群仍不十分清楚。结合谱系示踪技术,分选处于增殖路径的心肌细胞,利用 ICELL8 等单细胞测序分析平台,有助于建立心肌细胞增殖多组学图谱,全面、宏观、系统地解析心肌再生,寻求该领域的突破性进展。

3.2 建立连续细胞周期分子标志监测的心肌细胞增殖评价体系

细胞分裂期包括 G_1、S、G_2、M 期,分为细胞核分裂和胞质分裂两个阶段,心肌再生的重要标准为心肌细胞数量的增加,因此细胞分裂必须经历胞质分裂阶段。传统基于增殖分子标志的免疫荧光染色评估心肌细胞增殖的主要方式包括核分裂标志(Ki67、PH3 和 PCNA)和胞质分裂标志(Aurkb 和 Anillin)[26]。然而,核分裂标志物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,胞质分裂标志虽可较为敏感地标记心肌细胞的胞质分裂,但染色困难,受非心肌细胞增殖影响而难以识别。为了标记增殖的心肌细胞并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多种心肌细胞特异性增殖分子荧光标记小鼠体系,包括心肌细胞特异性 Cyclin A2、Ki67、Anillin 和 Aurkb 的表达谱小鼠体系[23,27-29],但仍然无法解决分子标志本身与胞质分裂匹配程度的问题。为了解决这一难题,ALI 等[30]利用有丝分裂染色体重组现象来荧光标记子代心肌细胞,建立了双重镶嵌标记系统(mosaic analysis with double markers,MADM),心肌细胞必须完成胞质分裂的全过程才会产生红色和绿色荧光标记的对称性子代细胞。然而,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。单细胞转录组学测序可以将所有细胞 DNA 复制、核分裂和胞质分裂的分子标志整合,多种心肌细胞特异性的分子标志又可以排除非心肌细胞的影响,通过系统性评价 G_0、G_1、S、G_2、M 期心肌细胞的构成比例,可以进一步减少单一或几个细胞周期分子标志多个时期表达的局限性,可能成为未来评价心肌细胞增殖能力的策略之一。

3.3 结合空间转录组学探索增殖心肌细胞空间分布

心肌损伤后伴随着心肌细胞的大量死亡和丢失,心肌再生逆转心力衰竭的根本方式是补充梗死区域的心肌细胞,替换成纤维细胞,因此,增殖态心肌细胞的组织空间分布十分关键。近期研究通过建立心肌细胞特异性 Ki67 表达谱转基因小鼠体系发现,在正常和 MI 后,增殖态心肌细胞主要位于左室内层心肌,MI 后增殖态心肌细胞增加并集中分布在梗死边缘区[31]。全面探究心肌细胞增殖的时空组学是未来的发展方向之一。近期 ASP 等[32]已应用空间转录组技术构建了人类胚胎期心脏发育的转录组学三维图谱,目前 10×Genomics 平台可以提供分辨率为 55 μm 直径和 100 μm 间距的空间转录组学技术,能够同时检测 10 000 以上的转录本,结合单细胞测序和谱系示踪技术,有望进一步绘制时间和空间维度下心肌再生的图谱。

参考文献:

[1] LI Y, HE L, HUANG X, *et al*. Genetic lineage tracing of nonmyocyte population by dual recombinases [J]. Circulation, 2018, 138(8): 793-805. DOI: 10.1161/circulationaha.118.034250.

[2] VAN BERLO J H, KANISICAK O, MAILLET M, *et al*. C-kit$^+$ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart [J]. Nature, 2014, 509(7500): 337-341. DOI: 10.1038/nature13309.

[3] LIU Q Z, YANG R, HUANG X Z, *et al*. Genetic lineage tracing identifies *in situ* Kit-expressing cardiomyocytes [J]. Cell Res, 2016, 26(1): 119-130. DOI: 10.1038/cr.2015.143.

[4] HE L, LI Y, LI Y, *et al*. Enhancing the precision of genetic lineage tracing using dual recombinases[J]. Nat Med, 2017, 23(12): 1488-1498. DOI: 10.1038/nm.4437.

[5] JOPLING C, SLEEP E, RAYA M, *et al*. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation[J]. Nature, 2010, 464(7288): 606-609. DOI: 10.1038/nature08899.

[6] KUBIN T, PÖLING J, KOSTIN S, *et al*. Oncostatin M is a major mediator of cardiomyocyte dedifferentiation and remodeling[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(5): 420-432. DOI: 10.1016/j.stem.2011.08.013.

[7] WANG W E, LI L, XIA X, *et al*. Dedifferentiation, proliferation, and redifferentiation of adult mammalian cardiomyocytes after ischemic injury[J]. Circulation, 2017, 136(9): 834-848. DOI: 10.1161/circulationaha.116.024307.

[8] CHEN Y, LIU Y, GAO X. The application of single-cell technologies in cardiovascular research[J]. Front Cell Dev

Biol, 2021, 9: 751371. DOI:10.3389/fcell.2021.751371.
[9] NATARAJAN K N. Single-cell tagged reverse transcription (STRT-seq)[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1979: 133-153. DOI:10.1007/978-1-4939-9240-9_9.
[10] BAGERITZ J, RADDI G. Single-cell RNA sequencing with drop-seq[J]. Methods Mol Biol, 2019, 1979: 73-85. DOI:10.1007/978-1-4939-9240-9_6.
[11] HAGEMANN-JENSEN M, ZIEGENHAIN C, CHEN P, *et al*. Single-cell RNA counting at allele and isoform resolution using Smart-seq3[J]. Nat Biotechnol, 2020, 38(6): 708-714. DOI:10.1038/s41587-020-0497-0.
[12] BUENROSTRO J D, WU B, CHANG H Y, *et al*. ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide[J]. Curr Protoc Mol Biol, 2015, 109: 21.29.1-21.29.9. DOI:10.1002/0471142727.mb2129s109.
[13] CHEUNG R K, UTZ P J. Screening: CyTOF-the next generation of cell detection[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(9): 502-503. DOI:10.1038/nrrheum.2011.110.
[14] SHI Q, QIN L, WEI W, *et al*. Single-cell proteomic chip for profiling intracellular signaling pathways in single tumor cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(2): 419-424. DOI:10.1073/pnas.1110865109.
[15] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, *et al*. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart[J]. Science, 2011, 331(6020): 1078-1080. DOI:10.1126/science.1200708.
[16] CUI M, WANG Z, CHEN K, *et al*. Dynamic transcriptional responses to injury of regenerative and non-regenerative cardiomyocytes revealed by single-nucleus RNA sequencing[J]. Dev Cell, 2020, 53(1): 102-116.e8. DOI:10.1016/j.devcel.2020.02.019.
[17] WANG Z, CUI M, SHAH A M, *et al*. Cell-type-specific gene regulatory networks underlying murine neonatal heart regeneration at single-cell resolution[J]. Cell Rep, 2020, 33(10): 108472. DOI:10.1016/j.celrep.2020.108472.
[18] HU P, LIU J, ZHAO J, *et al*. Single-nucleus transcriptomic survey of cell diversity and functional maturation in postnatal mammalian hearts[J]. Genes Dev, 2018, 32(19/20): 1344-1357. DOI:10.1101/gad.316802.118.
[19] WANG Y, YAO F, WANG L, *et al*. Single-cell analysis of murine fibroblasts identifies neonatal to adult switching that regulates cardiomyocyte maturation[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2585. DOI:10.1038/s41467-020-16204-w.
[20] HONKOOP H, DE BAKKER DE, AHARONOV A, *et al*. Single-cell analysis uncovers that metabolic reprogramming by ErbB2 signaling is essential for cardiomyocyte proliferation in the regenerating heart[J]. Elife, 2019, 8: e50163. DOI: 10.7554/eLife.50163.
[21] POTTER S S. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(8): 479-492. DOI:10.1038/s41581-018-0021-7.
[22] GAO C, ZHANG M, CHEN L. The comparison of two single-cell sequencing platforms: BD rhapsody and 10× genomics chromium[J]. Curr Genomics, 2020, 21(8): 602-609. DOI:10.2174/1389202921999200625220812.
[23] FU W B, LIAO Q, LI L P, *et al*. An aurora kinase B-based mouse system to efficiently identify and analyze proliferating cardiomyocytes[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 570252. DOI:10.3389/fcell.2020.570252.
[24] PICELLI S, BJÖRKLUND Å K, FARIDANI O R, *et al*. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells[J]. Nat Methods, 2013, 10(11): 1096-1098. DOI:10.1038/nmeth.2639.
[25] WANG L, YU P, ZHOU B, *et al*. Single-cell reconstruction of the adult human heart during heart failure and recovery reveals the cellular landscape underlying cardiac function[J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(1): 108-119. DOI:10.1038/s41556-019-0446-7.
[26] 付文斌, 王伟, 曾春雨. 心肌细胞增殖影响因素和评价方法[J]. 中国科学: 生命科学, 2021, 1(1):1-13. DOI:10.1360/SSV-2020-0327.
FU W B, WANG W, ZENG C Y. Influencing factors and evaluation methods of cardiomyocyte proliferation[J]. Sci Sin Vitae, 2021, 1(1):1-13. DOI:10.1360/SSV-2020-0327.
[27] HIRAI M, CHEN J, EVANS S M. Tissue-specific cell cycle indicator reveals unexpected findings for cardiac myocyte proliferation[J]. Circ Res, 2016, 118(1): 20-28. DOI:10.1161/circresaha.115.307697.
[28] KRETZSCHMAR K, POST Y, BANNIER-HÉLAOUËT M, *et al*. Profiling proliferative cells and their progeny in damaged murine hearts[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(52): E12245-E12254. DOI:10.1073/pnas.1805829115.
[29] HESSE M, DOENGI M, BECKER A, *et al*. Midbody positioning and distance between daughter nuclei enable unequivocal identification of cardiomyocyte cell division in mice[J]. Circ Res, 2018, 123(9): 1039-1052. DOI:10.1161/circresaha.118.312792.
[30] ALI S R, HIPPENMEYER S, SAADAT L V, *et al*. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(24): 8850-8855. DOI:10.1073/pnas.1408233111.
[31] LIU X X, PU W J, HE L J, *et al*. Cell proliferation fate mapping reveals regional cardiomyocyte cell-cycle activity in subendocardial muscle of left ventricle[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5784. DOI:10.1038/s41467-021-25933-5.
[32] ASP M, GIACOMELLO S, LARSSON L, *et al*. A spatiotemporal organ-wide gene expression and cell atlas of the developing human heart[J]. Cell, 2019, 179(7): 1647-1660.e19. DOI:10.1016/j.cell.2019.11.025.

(**收稿**:2021-11-23;**修回**:2021-12-07)
(编辑 汪勤俭)