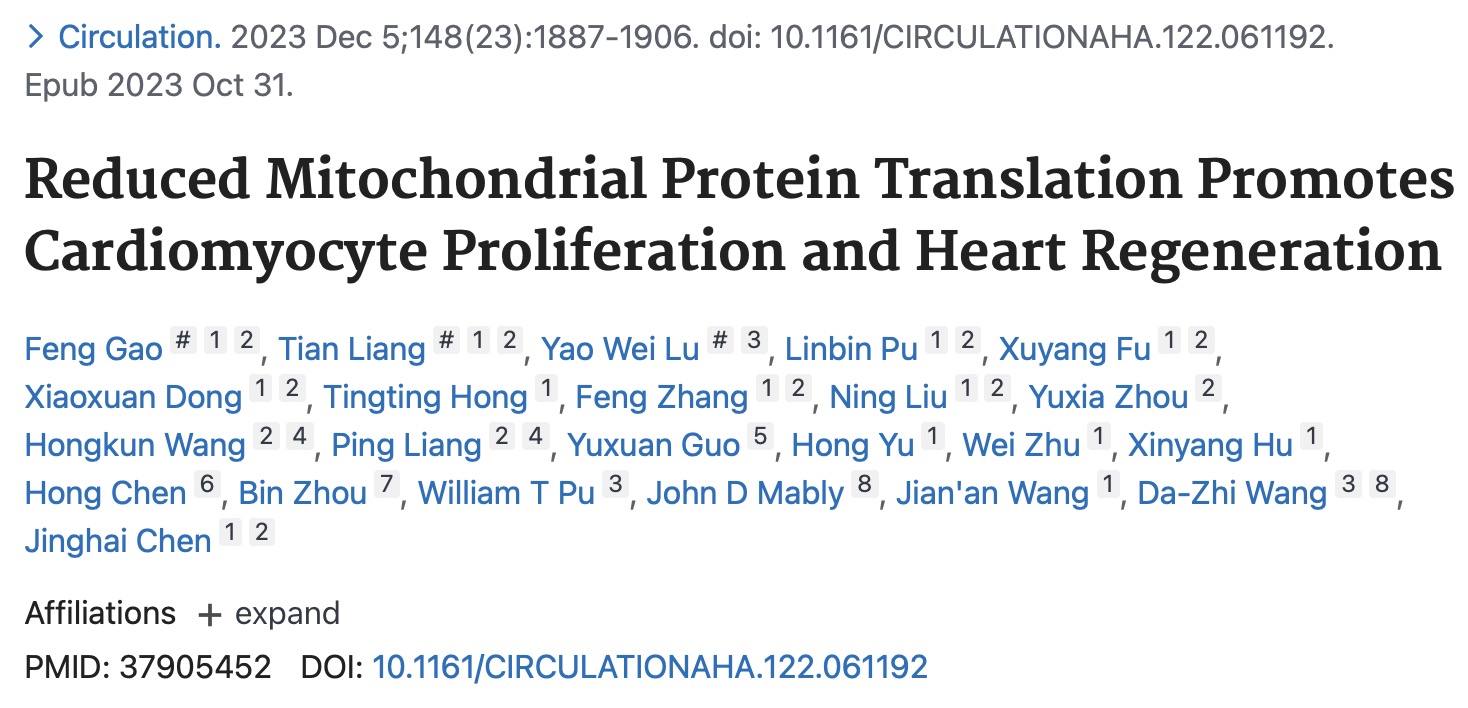
**减少线粒体蛋白翻译促进心肌细胞增殖和心脏再生**

****



翻译：于新迪 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心

审校：陈凤 南京市儿童医院

**摘要**

**背景**

线粒体在正常心脏功能中的重要性已充分被大家认识，最近的研究表明线粒体代谢的改变与一些心脏疾病有关。前期的研究表明通过小干扰RNA（siRNA）敲除线粒体核糖体蛋白S5（MRPS5）后抑制线粒体的翻译从而引起线粒体蛋白失衡。因此，我们决定研究MRPS5缺失的影响以及这些过程对心肌细胞增殖的作用。

**方法**

我们在小鼠中删除MRPS5的单个等位基因，建立左冠状动脉前降支结扎手术诱导小鼠心肌损伤模型。在体内和体外检测心肌细胞增殖和心脏再生情况。多西环素处理用于抑制蛋白质翻译。超声心动图评估小鼠心功能。实时定量聚合酶链反应和RNA测序用于评估转录的变化，染色质免疫沉淀（ChIP）和BioCHIP用于评估染色质效应。蛋白质印迹法（WB）检测蛋白质水平的变化，组织学和末端脱氧核苷酸转移酶缺口末端标记（TUNEL）法检测细胞增殖或死亡。使用腺病毒过表达相关基因，荧光素酶报告基因实验检测启动子的活性。并同步分析线粒体氧耗率、ATP水平和活性氧簇等结果。

**结果**

我们发现MRPS5的单个等位基因的缺失导致小鼠心肌细胞增殖和心脏再生，这一结果与心肌梗死（MI）后心功能的改善息息相关；ATF4（激活转录因子4）是Mrps5+/-小鼠心肌细胞线粒体应激反应的关键调节因子；在心肌细胞增殖过程中，ATF4通过调节Knl1（着丝粒支架1）导致胞质分裂增加。敲除ATF4（Mrps5+/-/Atf4+/-）削弱了Mrps5+/-组心肌细胞的增殖现象，使得心脏不能再生。MRPS5抑制剂（多西环素治疗）可激活保守的调节机制从而增加人诱导多能干细胞来源的心肌细胞的增殖。

**结论**

这些数据强调了MRPS5/ATF4在心肌细胞中的关键作用，并为治疗心肌损伤提供了振奋人心的新研究途径。

**前言**

尽管我们对心血管疾病机制的研究已经取得了巨大进展，但其仍然是工业化国家和发展中国家导致患者死亡的主要原因。成人心肌在损伤后无法进行自我修复，所以MI后或其他心肌损伤后通常会导致心力衰竭。虽然新生哺乳动物心脏在短时间内具有再生能力，但这种再生能力仅仅持续到出生后7天。尽管成年小鼠和人类心脏具有一定的心肌细胞更新能力，但这种较低更新率的心肌细胞不足以完全替换受损组织所需的心肌细胞数量。为了解决这一难题，全球心脏研究人员正努力研究心脏再生机制。哺乳动物模型在人类心脏病治疗的转化中具有重要的意义，是这些研究中使用的关键工具。本研究提供了动物模型中心肌再生能力的相关细节，并对出生后心肌细胞增殖的几种分子调节因子进行了详细阐述。

在哺乳动物心脏失去再生能力的同时，由于线粒体的成熟，心脏发生了从无氧糖酵解和乳酸生成向有氧糖酵解和氧化磷酸化的转变，后一过程也依赖于脂肪酸的利用。最近研究表明，抑制脂肪酸的利用或代谢模式向无氧糖酵解的转变均可促进心肌细胞增殖。这些发现提示让线粒体代谢恢复到更不成熟的状态，从而具有更低的相对氧物质产生和DNA损伤应答水平，对心脏再生会起到一定的作用。然而，仅这一代谢发生变化是不够的，更要确定与这一过程相关的其他信号通路起到的重要作用。

从线粒体到细胞核的通讯（称为线粒体逆行信号）是否在调节心肌细胞增殖中起作用尚不清楚。线粒体-细胞核通讯包括顺行（从细胞核到线粒体）和逆行，旨在维持细胞在基础条件下的稳态和应对各种应激反应。线粒体未折叠蛋白反应（UPRmt）是线粒体到核的主要信号通路，可维持线粒体蛋白稳态，介导组织间信号传导，并调节机体衰老。在哺乳动物中，整合应激反应是UPRmt激活的重要前体。整合应激反应是由4种激酶调节的适应性翻译程序，这些激酶通过磷酸化eIF2α（真核起始因子α）被不同的应激源激活。磷酸化时，磷酸化eIF2α优先翻译5 ' UTR中含有uORFs的mRNAs。编码转录因子CHOP（C/EBP同源蛋白）、ATF4和ATF5的mRNAs都含有多个uORFs，它们的翻译需要eIF2α的磷酸化。这些转录因子转位到细胞核内，激活UPRmt或调节其他下游应激基因的转录，从而促进细胞存活和线粒体网络的恢复。尽管UPRmt已被证明在不同的心脏疾病模型中（如慢性压力超负荷、缺血再灌注）具有心脏保护作用，但其在心肌细胞增殖和心脏再生中的作用仍不明确。最近一项研究表明，多西环素治疗小鼠心脏通过抑制线粒体翻译和激活UPRmt增强了细胞周期和分裂相关的转录组。这些结果提示UPRmt在心肌细胞增殖中的重要作用。此外，在ATF4功能缺失分析中观察到细胞增殖显著降低，表明ATF4对于维持细胞增殖和保护线粒体应对应激反应是必不可少的。对果蝇的研究发现ATF4可通过诱导瓦氏效应促进细胞增殖，这进一步证明了ATF4在调节细胞增殖中的作用。

线粒体是半自主性的细胞器，然而它们的功能在很大程度上仍然依赖于多种核编码蛋白的输入，但其中许多核编码蛋白仍有待确定。它们通过线粒体核糖体复合体利用自身的翻译机制，产生由线粒体基因组编码的13种蛋白质，这些也包括参与电子传递链的蛋白质类。MRPS5（线粒体核糖体蛋白S5）是线粒体核糖体小亚基的重要组成部分，被认为是线粒体mRNA翻译的调节因子。此外，通过siRNA敲除MRPS5可抑制线粒体翻译，从而导致线粒体蛋白失衡。这触发了秀丽隐杆线虫的UPRmt，是一种保守的长寿机制。线粒体翻译抑制、ATF4信号传导和UPRmt之间的有趣联系使我们假设这些过程影响心肌细胞增殖。本研究报道了线粒体翻译抑制对心肌细胞增殖和心脏再生的调控作用，并发现在小鼠心脏中MRPS5的杂合缺失可通过激活ATF4信号增强心肌梗死后的心肌细胞增殖和心脏再生。

**方法**

统计学检验方法和信息详见补充材料。

**动物**

本研究使用的动物符合《实验动物护理与使用公共卫生服务指南》，并获得了浙江大学、波士顿儿童医院和南佛罗里达大学机构动物护理与使用委员会的批准。

**人体组织**

人诱导多能干细胞来源于皮肤成纤维细胞，经浙江大学医学院附属第一医院伦理委员会批准。患者签署了书面知情同意。所有方案均按照浙江大学、波士顿儿童医院和南佛罗里达大学的政策实施。

**数据和材料可用性**

所有数据和方法将根据要求提供给研究人员。二代测序数据以登录码GSE200939（出生后第4天MRPS5异质性心脏与对照心脏的RNA测序[P4]）和GSE179958 （ATF4的﻿bioChIP测序）存入高通量基因表达(GEO)数据库。

**统计分析**

动物实验的小鼠在实验前被双盲随机分组。使用GraphPad Prism 9.0进行统计分析和绘图，条形图以平均值±标准差显示。对数据进行正态性检验后采用Shapiro-Wilk正态性检验进行参数统计。采用Brown-Forsythe进行方差齐性检验。两组间比较时，对具有同质方差的正态数据应用双尾Student t检验，对具有异质方差的正态数据应用Welch t检验，对非正态数据应用Mann-Whitney U检验。对于多组之间的比较，进行单向或双向ANOVA，然后对具有同质方差的正态数据进行Sidak或Tukey多重比较检验。Brown-Forsythe和Welch ANOVA应用于具有异质性方差的正态数据，Kruskal-Wallis检验应用于非正态数据。以P<0.05为具有统计学差异。

**结果**

**Mrps5杂合子小鼠的心肌细胞增殖增加**

MRPS5是线粒体核糖体的重要组成部分，对线粒体的蛋白翻译至关重要。我们制备了心脏特异性**Mrps5**突变小鼠，发现心脏内**Mrps5**缺失导致线粒体缺陷，从而导致心力衰竭。出乎意料的是，我们发现Mrps5杂合子小鼠（Mrps5flox/+；Myh6-Cre，以下称为Mrps5cHET）的心脏显著大于对照组小鼠（Mrps5flox/+）（图1A和图1B），但对照组小鼠（Mrps5flox/+）和Myh6-Cre小鼠在形态学和功能方面并无差异（图S1A至S1C）。我们发现Mrps5cHET小鼠心脏中的Mrps5和MT-CO1（线粒体编码的细胞色素c氧化酶I）蛋白表达水平降低（图S2A）。这一观察结果促使我们对出生后第1天（P1）至2个月的小鼠进行了系统的研究。我们分离了P1 Mrps5cHET小鼠和对照组小鼠的心肌细胞；和对照组相比，Mrps5cHET心脏的心肌细胞数量增加，但心肌细胞的大小却无明显差异（图S2B）。从P4到P28，Mrps5cHET小鼠的心脏重量与体重（HW/BW）的比值较高（图1C）。组织切片和小麦胚芽凝集素染色分析表明，在P14、P21和P28，Mrps5cHET心脏中的心肌细胞大小明显较小（图1D和1E）。为了证实上述结果，更好地确定心肌细胞大小与成核分布的相关性，我们分离了成年Mrps5cHET小鼠和对照小鼠的心肌细胞（图1F），发现Mrps5cHET心脏中的单核心肌细胞增加，双核心肌细胞减少，而多核心肌细胞的比例无显著差异（图1F）。从Mrps5cHET小鼠分离出的心肌细胞的面积较小（[通过测量长度和宽度]图1F），这与组织学结果一致。

这一观察结果促使我们继续研究Mrps5cHET心脏中心肌细胞的增殖是否增加。我们分析了Mrps5cHET心脏从出生后4天到2个月的增殖标志物的免疫染色结果。发现从P4到P28, Mrps5cHET心脏中的Ki67、磷酸化组蛋白H3（pH3）和Aurora B阳性心肌细胞数量均增加（图1G到1J；图S2C和S3）。P4心脏纵切面的pH3和Ki67阳性信号显示Mrps5cHET心脏的心室中有更多增殖的心肌细胞（图1G；图S2C）。心肌细胞增殖的增加似乎在出生后2个月开始逐渐减少（图1L；图S3）。为了确定成年期Mrps5的减少是否也可以促进心肌细胞增殖，我们建立了他莫昔芬（TAM）诱导的心脏特异性Mrps5杂合子小鼠模型（Mrps5flox/+；Myh6-MerCreMer，以下称为Mrps5iHET），并使用谱系追踪系统（MADM[双标记镶嵌分析]）小鼠细胞系（Mrps5iHET；MADM）检查心肌细胞分裂的情况（图1K）。MADM小鼠显示更多的单标绿色或红色心肌细胞，表明Mrps5减少导致新的心肌细胞形成（图1M）。我们分析细胞死亡情况发现P4时Mrps5cHET心脏的凋亡减少（图S4A和S4B）。然而，P14和P21的细胞凋亡却没有差异（图S4A和S4B）。我们还发现Mrps5cHET小鼠和对照组小鼠的心脏疾病标记基因的表达水平并无差异（图S4C）。Mrps5cHET小鼠和对照小鼠在P21、P28和P120时的心功能参数基本相似（图S4D）。这些结果表明在出生后和成年早期，线粒体翻译减少可促进心肌细胞增殖但不损害心功能。

**Mrps5水平降低可增强成年小鼠的心脏再生**

用Mrps5iHET和对照组（Mrps5flox/+）小鼠确定心脏中Mrps5水平的降低是否有利于心肌细胞增殖和心脏再生。对照（Mrps5flox/+）小鼠与Myh6-MerCreMer（MCM）小鼠相比，心脏形态和心功能并无差异（图1D至1H）。给8 ~ 10周龄Mrps5iHET小鼠和对照组小鼠注射TAM诱导MI模型，然后通过5-乙炔基-2 '脱氧尿嘧啶核苷（EdU）评估细胞增殖情况（图2A）。连续超声心动图分析射血分数、短轴缩短率、收缩期和舒张期的左心室内径和容积显示，Mrps5iHET小鼠MI后的心功能优于对照组小鼠（图2B和图2C；图S5A ~ S5D）。Mrps5iHET小鼠心脏梗死面积显著减少（图2D和图2E）。

我们对MI后7天的心肌细胞增殖情况进行评估，发现Mrps5iHET小鼠中pH3（图2F）和Aurora B阳性的心肌细胞（图2G）显著增加。MI后3周和9周，成年Mrps5iHET心脏的心肌细胞中EdU的增加也支持了以上结果（图2H和2I；图S5E）。小麦胚芽凝集素染色和心脏切片定量显示，Mrps5iHET心脏中的心肌细胞更小，这与MI后的心肌细胞增殖结果一致（图2J）。通过TUNEL染色进行心肌细胞凋亡检测，发现MI后3周Mrps5iHET心脏中TUNEL阳性心肌细胞显著减少（图2K）。为了确定减少Mrps5是否能增强MI后的心脏再生，分析了Mrps5iHET; MADM和MCM; MADM心肌梗塞后新的心肌细胞生成情况。发现Mrps5iHET中单标绿色或红色的心肌细胞更多。MADM心脏表明Mrps5的减少增强了MI后的心脏再生（图2L）。总之这些数据表明，成年小鼠中Mrps5和线粒体翻译的减少可通过激活心肌细胞增殖保护心脏免受与MI相关的损伤。

**线粒体翻译的减少触发线粒体应激反应并激活ATF4信号通路**

细胞和线粒体应激主要通过eIF2α激酶、GCN2（一般性调控阻遏蛋白激酶2）和PERK（蛋白激酶R样内质网激酶）诱导真核细胞起始因子2（eIF2α）的α亚基磷酸化。磷酸化eIF2α （p-eIF2α）与应激时能量守恒的整体平移抑制有关。因此，我们利用这些研究线粒体翻译减少是否会在Mrps5cHET小鼠的心脏中触发线粒体应激。我们发现Mrps5cHET心脏中GCN2和PERK的蛋白水平均显著增加（图3A和图3B）。如预期一致，p-eIF2α显著增加，但总eIF2α蛋白并无显著增加（图3A ~ 3C）。据报道细胞质蛋白合成抑制与线粒体蛋白合成抑制同时存在，这可能有助于细胞大小的整体缩小。然而P1 Mrps5cHET心肌细胞并未发生显著变化（图S2B）。

Mrps5cHET心脏中p-eIF2α的增加与ATF4的增加息息相关（图3A和图3B）。典型UPRmt因子ATF5的蛋白水平并未发生变化（图S6）。之前的研究表明ATF4信号通路激活促凋亡转录因子DDIT3（CHOP，C/EBP同源蛋白）；然而我们发现Mrps5cHET心脏中CHOP的表达降低（图S6），这与出生后Mrps5cHET心脏中凋亡减少的结果一致（图S4A和S4B）。在Mrps5cHET小鼠的心脏中，PGC1α（线粒体生物发生所必需的蛋白质）、LONP1（线粒体离子肽酶1）（一种负责选择性降解的ATP依赖性蛋白酶）和PDHA1（丙酮酸脱氢酶E1亚基α1）（PDH（丙酮酸脱氢酶）复合物的一个亚基）等的蛋白水平并未改变（图S6）。这些结果表明Mrps5的下调特异性地激活了心脏中GCN2/PERK-eIF2α-ATF4通路。通过分析P4 Mrps5cHET心脏中线粒体应激反应相关基因的表达水平（图3D），我们发现ATF4 mRNA水平显著升高。在Mrps5iHET梗死的心脏中也观察到ATF4的上调；MI后7天Mrps5iHET心脏的其他线粒体应激反应水平也有所增加（图3E）。

接下来，我们研究了线粒体翻译减少是否会影响Mrps5cHET心脏线粒体的结构和功能。透射电子显微镜检查显示Mrps5cHET小鼠和对照小鼠心脏的线粒体形态并无差异（图3F）。与对照组相比，Mrps5cHET小鼠的相对氧物质水平和ATP含量均无变化（图3G-I）。两组心脏在TCA循环、电子传递链和糖酵解相关基因的表达水平方面没有统计学差异（图3J）。为了建立体外的代谢状态，我们使用siRNA敲除新生小鼠心肌细胞中的Mrps5，发现Mrps5敲除后氧消耗率轻度降低，但细胞外酸化率无显著变化（图3K）。这些数据表明，尽管Mrps5杂合子小鼠的线粒体翻译减少，但正常的线粒体功能得以维持且与ATF4信号的激活相关。

**抑制ATF4可降低Mrps5杂合子心脏的心肌细胞增殖和消除心脏再生潜能**

ATF4的激活能够恢复细胞稳态和细胞存活以响应细胞应激的基因表达程序。有研究表明ATF4可以促进哺乳动物细胞或果蝇细胞的增殖。为了确定ATF4在心肌细胞增殖和心脏再生中的作用，我们验证了Mrps5cHET心脏中的ATF4可促进线粒体翻译减少后的细胞增殖效应。我们建立了Mrps5和Atf4双杂合小鼠（Mrps5flox/+;Atf4flox /+；Myh6-Cre[下文称为dHET]）和对照小鼠（Mrps5flox/+； Atf4flox/+，dCtrl；图S7A）。WB检测MRPS5和ATF4蛋白表达水平发现Mrps5cHET和dHET心脏中的MRPS5水平降低，而ATF4水平在Mrps5cHET中升高，在dHET心脏中的表达不变（图S8A）。由于ATF4水平在单个等位基因缺失时被标准化，我们可以在dHET小鼠中进行分析，并未将我们的分析与ATF4完全敲除相关的ATF4功能缺失效应相合并。和对照组相比，Mrps5cHET小鼠的心脏大小和HW/BW比值显著增加，但dHET小鼠的这些增加在P4和P21中均被消除，并且4组之间的HW/BW比值差异在2个月时减小（图S7B和S7C）。Mrps5cHET心脏的心肌细胞体积减小，这与前期数据结果一致（图1D和图1E）。然而，dHET小鼠的心肌细胞大小与dCtrl小鼠相似（图S7D和S7E）。通过Ki67、pH3和Aurora B染色检测心肌细胞增殖（图S7F-S7H, S9A-S9C），发现Mrps5cHET心脏的细胞增殖显著增加，而dHET与dCtrl心脏未见明显的细胞增殖（图S7F至S7H和S9A至S9C）。在出生后21日和2月龄时，4组的心功能均无差异（图S8B至S8I）。这些数据表明在出生后心脏中ATF4通过发挥Mrps5下游的功能调节心肌细胞增殖。

为了确定ATF4是否在成年Mrps5杂合子小鼠的心肌细胞增殖的调节中起作用，我们使用TAM诱导Mrps5和ATF4双杂合子小鼠（Mrps5flox/+；ATF4 flox/+；Myh6-MerCreMer），及其阴性对照（Mrps 5flox/+；Atf4flox/+，以下称idCtrl）（图4A；图S10A）。虽然Mrps5iHET小鼠的心脏大小和HW/BW比值均增加，但这种增加在idHET小鼠的心脏中受到抑制（图4B和4C）。Mrps5iHET心脏的心肌细胞体积减小，这与我们前期数据结果一致（图1D和图1E）；idHET小鼠中的心肌细胞大小与idCtrl小鼠相当（图4D）。EdU测量显示Mrps5iHET心脏中心肌细胞增殖增加（图4E和4F），但TAM注射后2周和4周，idHET心脏与idCtrl心脏相比心肌细胞增殖未见明显差异（图4E和4F）。pH3和Aurora B染色提示，Mrps5iHET心脏中有丝分裂和胞质分裂的心肌细胞数量明显增加，而在idHET心脏中显著减少（图4G和4H）。注射TAM后，4组的心功能均未受到影响（图S10B至S10I）。这些数据表明ATF4参与了Mrps5杂合子小鼠出生后和成年期心肌细胞增殖的调节。

为了证实在Mrps5杂合子小鼠中观察到的心脏再生增强是通过激活ATF4信号介导的，我们建立了 iCtrl、Mrps5iHET、idCtrl和idHET的MI模型（图5A）。MI后4组1周的心功能无差异。超声心动图评估显示Mrps5iHET小鼠（MI后3周和5周）心功能明显改善，但其他3组无明显差异（图5B和图5C）。MI后5周，idHET心脏的梗死面积并未减少（图5D）。这些结果表明Mrps5iHET小鼠中ATF4的降低完全消除了由于Mrps5的降低而获得的心脏再生潜能。我们验证了Mrps5的表达水平在iHET和idHET组中降低，Atf4的表达仅在iHET组中增加（图5E）。细胞增殖标志基因（如Mki67, Aurkb和Top2a）在iHET心脏中表达上调；然而idHET心脏并未观察到明显变化（图5E）。此外，MCM和Atf4fl/+的心功能和心肌细胞增殖潜能未见显著差异（图S11A-S11C）。为了确定ATF4是否直接参与Mrps5介导的心肌细胞增殖，我们测定了MI后1周和5周的心脏中EdU情况。发现EdU阳性心肌细胞百分比在Mrps5iHET心脏中显著增强，而在idHET心脏中显著降低（图5F和5G；图S12A和S12B）。总之，这些结果表明在出生后和成年心脏中，ATF4介导了Mrps5在调节心肌细胞增殖和心脏再生中的功能。

**ATF4调节Mrps5cHET心脏中细胞分裂相关基因的表达并促进心肌细胞增殖**

为了深入了解线粒体翻译减少引发心肌细胞增殖的潜在分子机制，我们对P4 Mrps5cHET心脏进行了RNA测序（图6A）。测序数据显示Mrps5cHET心脏中877个上调基因，908个下调基因（图S13A和S13B）。基因本体论富集分析和基因集富集分析均显示，大部分上调通路与细胞增殖和分裂相关（如细胞分裂、染色质分离、核DNA复制和有丝分裂的细胞质分裂途径）（图6B和6C；图S13C）。通过实时荧光定量聚合酶链反应实验，我们验证了Mrps5cHET心脏在P4和P28细胞分裂相关的上调基因（图6D；图S13D）。这些结果强烈支持Mrps5cHET心脏中心肌细胞增殖显著增加。下调基因的通路分析表明它们与补体和凝血级联反应、金黄色葡萄球菌感染、醚脂代谢等相关（图S13E）。

由于心脏中Mrps5水平的降低增强了ATF4信号通路并导致心肌细胞增殖的增加，我们下一步研究了ATF4是否直接调控心脏中细胞增殖基因的表达。我们在P1时将腺相关病毒（AAV）-bioHA-ATF4注射到Rosa26birA/+小鼠中，在P28获取心脏进行ATF4 BioChIP测序（图S14A）。我们发现4880个以上的ATF4结合峰（图6E）；这些基因（Knl1, Mki67, Top2a, Kif11和Incenp）对细胞分裂和增殖起到重要作用，而且ATF4与以上基因的启动子和增强子息息相关（图S14B-S14F）。ChIP-定量聚合酶链反应发现ATF4与Knl1启动子结合紧密（图6F）；通过荧光素酶报告分析对此进行了验证，提示过表达ATF4增加了Knl1启动子的活性（图6G）。我们还发现 Mrps5cHET小鼠心脏中的KNL1蛋白水平（图6H），与ATF4蛋白水平增加相关（图3A）。有趣的是，我们发现在Mrps5cHET心脏中显著上调的84个基因中，有21个（25%）与ATF4 BioChIP测序基因集重叠（图6I），表明ATF4通过与这21个基因的启动子/增强子结合从而激活转录。对这21个基因进行GO分析，发现它们与细胞分裂、核分裂、染色体分离和染色质组织有关（图6J）。对其余63个基因的进一步GO分析表明，核染色体分离基因在Mrps5cHET心脏中富集最显著（图6K）。这些结果支持ATF4在Mrps5cHET心脏细胞分裂相关基因的转录调控中发挥作用。

为了确定ATF4表达是否触发出生后的心肌细胞增殖，我们将P1的野生型小鼠感染AAV9-ATF4或AAV9-荧光素酶（图S15A）。ATF4及其下游靶基因在AAV9-ATF4注射的心脏中发生了上调（图S15B）。我们进行心脏取材并使用细胞增殖标志物进行免疫染色，发现P7时Ki67和PH3阳性心肌细胞数量增加（图S15C和S15D）。为了研究ATF4表达是否促进成年心肌细胞增殖和MI后的心脏再生，我们对野生型小鼠建立MI模型并感染AAV9-ATF4或AAV9-荧光素酶，注射EdU监测细胞增殖（图S15E），在MI后7天进行心脏取材。ATF4过表达组和对照注射组的HW/BW比值无显著差异（图S15F）；AAV9-ATF4注射的心脏中，ATF4及其下游靶基因发生了上调（图S15G）。为了进一步确定ATF4是否直接参与MI后的心肌细胞增殖，我们测定MI后7天心脏中的EdU。发现感染AAV9-ATF4的梗死心脏中，EdU阳性心肌细胞的百分比显著增加（图S15H）。以上数据表明ATF4的表达可以触发出生后的心肌细胞增殖和成年MI后的心脏再生。

**多西环素诱导线粒体轻度应激并促进心脏再生**

多种细胞因子触发整合应激反应会导致心肌病和心力衰竭。既往研究表明高剂量多西环素治疗可导致心力衰竭。相比之下，接受较低剂量多西环素治疗的动物显示出对心脏有益的作用。为了确定Mrps5-ATF4信号是否在多西环素的治疗中起到心脏保护和心脏再生作用，我们使用多西环素处理成年野生型小鼠，并进行MI手术，以诱导心脏损伤和再生（图7A）。超声心动图显示，在MI后5周，接受多西环素治疗的小鼠心功能增强（图7B和7C），梗死面积减小（图7D）。我们认为多西环素处理的心脏中心肌细胞增殖有可能增加；与对照组相比，注射多西环素的小鼠通过EdU、pH3和Aurora B染色提示，进行DNA复制、有丝分裂和胞质分裂的心肌细胞百分比增加（图7E至7G；图S16A和S16B）。与之前的报道一致，我们发现多西环素治疗激活了线粒体的应激反应，MI后1周，p-eIF2α及其上游激酶GCN2和PERK的增加证明了这一点（图7H）。如预期一致在多西环素处理的心脏MI后ATF4和Knl1的蛋白水平均增加（图7H），ANP表达水平降低（图7H）。但是在MI后5周，多西环素激活的eIF2α-ATF4信号通路却受到了抑制（图S17）。

其次我们要确定MI后多西环素的治疗作用。成年野生型小鼠 MI后6h进行首次多西环素注射，MI后4周接受第二次注射（图S18A）。超声心动图显示，MI后4 ~ 8周接受多西环素治疗的小鼠心功能增强（图S18B至S18E），梗死面积减小（图S18F）。我们通过WB验证线粒体应激反应相关调节因子和心脏疾病标志物的表达水平，发现MI后8周UPRmt被激活，p-eIF2α、p-eIF2α/eIF2α和CLPP水平在多西环素处理的心脏中表达上调。

然后我们研究了多西环素处理是否激活ATF4信号通路并激活H9c2心肌细胞中Knl1的表达。多西环素处理显著诱导ATF4、KNL1、PERK和磷酸化eIF2α蛋白的表达（图S19A）。基于siRNA的ATF4抑制导致KNL1表达降低（图S19B），表明在多西环素刺激的H9c2心肌细胞中，ATF4是KNL1表达所必需。另外，多西环素处理后ATF4与Knl1启动子的结合增强（图6F）。综上所述，这些数据表明多西环素抑制线粒体翻译通过激活eIF2α-ATF4-Knl1信号通路促进心肌细胞增殖和心脏再生。

**抑制线粒体翻译可增强人iPSC来源的心肌细胞增殖**

为了确定减少线粒体翻译是否可以促进人心肌细胞的增殖，我们在人诱导多能干细胞衍生的心肌细胞（hiPSC-CMs）中敲除了Mrps5基因。当Mrps5被抑制时，细胞分裂相关基因（Cenpf, Knl1, Gem和Mki67）的表达均有所增加（图8A），这与小鼠心脏中观察到的结果一致。我们通过在小干扰Mrps5样本中增加EdU和pH3染色也证明了Mrps5的抑制导致hiPSC-CMs中的细胞增殖显著增加（图8B和8C）。与之前的实验结果一致，多西环素处理促进了hiPSC的心肌细胞增殖（图8D和8E）。以上数据表明，减少线粒体翻译可以显著促进hiPSC-CMs的细胞增殖。

**抑制线粒体翻译促进功能性心肌细胞增殖**

这些发现提示抑制线粒体翻译在调节心肌细胞增殖和心脏再生中起了重要作用。为了研究这种增殖激活是否是一种肌细胞特有的现象，我们检测了抑制线粒体翻译在其他细胞类型中细胞周期和分裂相关基因的表达水平。与对照相比，细胞周期和分裂相关基因在P4 Mrps5cHET心脏中上调（图S20A）。从P1 Mrps5fl/+心脏中分离出非肌细胞，使用Ad-Cre敲除Mrps5，并未观察到细胞周期和分裂相关基因的表达水平发生显著变化（图S20B）。最后，我们使用人心肌细胞系（AC16）、未分化的人诱导多能干细胞和MEF细胞，敲除Mrps5或用多西环素处理，检测细胞周期和分裂相关基因的表达水平；结果均未观察到显著变化（图S20C至S20F）。这些数据表明，线粒体翻译抑制可增强功能性心肌细胞的增殖。在增殖细胞类型（非心肌细胞、MEF细胞、甚至未分化的人诱导多能干细胞和AC16细胞）中，细胞周期和分裂相关基因的表达水平在线粒体翻译抑制后未见明显变化。

**讨论**

轻度线粒体应激可促进多种物种的寿命。但目前尚不清楚它是否促进心功能改善或心脏再生。我们的研究表明，线粒体翻译减少可促进心肌梗死后心肌细胞增殖、保护心脏功能并促进心脏再生。这些观察结果是基于使用小鼠Mrps5遗传模型（使用了杂合子小鼠）进行的研究。我们在Mrps5 het小鼠中观察到心肌细胞增殖增加和心肌细胞凋亡减少（图1；图S3和S4）。虽然很难确定每个过程的具体贡献，但我们的结果支持Mrps5 het小鼠心脏功能的恢复和梗死面积减少。我们还研究了用多西环素（一种公认的线粒体翻译化学抑制剂）治疗的野生型小鼠，发现ATF4信号通路通过调节细胞分裂相关基因的转录，对心肌细胞增殖，心脏功能和心脏再生起到重要作用。我们的研究表明，线粒体翻译减少可能是促进MI后心脏再生的重要治疗策略（图S21）；心脏不能耐受线粒体蛋白翻译的完全丧失，否则会导致心肌肥厚和心力衰竭；需要密切调整线粒体翻译减少的程度，以免产生有害影响。

虽然线粒体已被证明在调节心肌细胞增殖中发挥重要作用，但其潜在的分子机制仍不清楚，并且细胞分裂的最终分子架构也有待确定。我们的研究发现ATF4是线粒体应激反应的已知介质，也是心肌细胞增殖的重要调节因子。Mrps5杂合子小鼠的心肌细胞增殖增加， Mrps5和ATF4杂合子小鼠中心肌细胞增殖减少。在Mrps5杂合子小鼠中，阻断ATF4信号通路会消除MI后心脏的再生能力。ATF4直接与细胞增殖相关基因（Knl1, Mki67，Top2a，Kif11和Incenp）的启动子区域结合，从而调控这些基因在调节心肌细胞增殖和心脏再生中的表达和功能。另外在Mrps5cHET心脏中上调的细胞增殖相关基因中，只有25%的基因在其启动子或增强子中含有ATF4结合位点。这一观察结果表明，在Mrps5cHET心脏中，除了ATF4之外的其他转录调节因子可能参与了其他与心肌细胞增殖相关的上调基因的调节。

我们发现ATF4信号通路在Mrps5杂合子心脏中增强，表明线粒体应激激活了逆行的线粒体通讯，结果表明适度的线粒体应激不会干扰正常的线粒体和心功能。之前的一项研究发现，敲除Mrps5和多西环素治疗抑制线粒体翻译，可启动Atf5/ Atf4依赖性级联反应从而协同抑制细胞质翻译，这也可作为长寿的研究靶点。然而我们发现ATF5的转录和蛋白水平在出生后Mrps5杂合子心脏中并未发生改变。线粒体应激反应相关转录因子（Atf4, Ddi3和Atf5），以及其他经典的UPRmt基因在Mrps5iHETMI后发生了上调。这些观察表明，额外的调节成分在线粒体应激反应中起到一定的帮助作用，研究经典线粒体应激信号如何在应激下促进心肌细胞增殖和心脏再生也十分有意义。

线粒体是细胞的动力来源，它们产生的ATP为细胞的活动和生存提供了必需的能量。我们的研究发现，在心肌细胞中通过基因敲除Mrps5来完全抑制线粒体蛋白翻译对心脏发育和功能有害；而在Mrps5杂合子小鼠中，适度减少线粒体蛋白翻译可增加心脏再生能力和保护心脏的功能。这种反应表明细胞维持代谢平衡和感知细胞应激和损伤程度的能力，并可以及时应对以减少进一步的损伤。当Mrps5在心肌细胞中完全缺失时线粒体翻译受阻，线粒体结构和功能完全破坏。为了应对这种应激和能量供应耗尽的危险，细胞通过增加糖酵解来激活代谢重编程，以应对氧化磷酸化的减少，Klf15在其中发挥了关键作用，这种作用促进细胞存活并对衰竭的心脏有益。有趣的是成人心脏中氧化磷酸化的减少可增强其再生能力。严重的线粒体功能障碍或发育早期/晚期发生的损伤会缩短秀丽线虫的寿命。相比之下，在Mrps5杂合子心脏中，经历了适度的线粒体应激的细胞，便可激活由Atf4信号通路主导的细胞增殖程序，最终增强心脏的再生能力并保护心功能。这项研究表明，线粒体翻译抑制通过线粒体应激反应和整合应激反应激活的ATF4信号通路促进小鼠和人类的心肌细胞增殖和心脏再生。这项工作进一步强调了线粒体和核通讯在心肌细胞增殖和心脏再生过程中响应线粒体应激的重要作用。

文中附图如下：

