

· 论著 ·

人诱导多潜能干细胞向心肌细胞分化的实验研究

张伟 权大君 王晔 唐艳红 宋思维 陈玉婷 王腾 向杰 黄从新

(武汉大学人民医院心内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北重点实验室, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探究通过阶段性调控经典 Wnt 信号通路促使人诱导多潜能干细胞向心肌细胞分化。**方法** 采用阶段性激活或抑制 Wnt 信号通路的方案使人尿路上皮细胞来源的多潜能干细胞(U1 细胞系)定向分化为心肌细胞,在分化第 14 天,采用流式细胞术检测 U1 细胞向心肌细胞分化的效率,利用免疫细胞化学检测心肌细胞肌钙蛋白表达,通过激光扫描共聚焦荧光显微镜检测人诱导多潜能干细胞来源的心肌细胞(hiPSC-CMs)的 Ca^{2+} 活动,利用全细胞膜片钳技术记录 hiPSC-CMs 的电生理特性。**结果** U1 细胞系向 hiPSC-CMs 分化的效率为 $(88\pm 3)\%$;全细胞膜片钳技术记录的动作电位特征显示 hiPSC-CMs 可分为心室肌样细胞、心房肌样细胞和窦房结样细胞,其中主要是心室肌样细胞。窦房结样细胞的比例、动作电位时程、动作电位幅度及最大去极化速率均明显小于心室肌样细胞和心房肌样细胞。**结论** 阶段性调控 Wnt 信号通路能促使 hiPSCs 定向分化为 hiPSC-CMs,并且 hiPSC-CMs 具有哺乳动物心肌细胞相似的电生理特征。

【关键词】 人诱导多潜能干细胞; Wnt 信号通路; 心肌细胞; 动作电位

【DOI】 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.07.020

Experimental Research on Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Cardiomyocytes

ZHANG Wei, QUAN Dajun, WANG Xi, TANG Yanhong, SONG Siwei, CHEN Yuting, WANG Teng, XIANG Jie, HUANG Congxin

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute, Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To promote the differentiation of human induced pluripotent stem cells(hiPSCs) into cardiomyocytes through the manipulation of the canonical Wnt signaling pathway. **Methods** hiPSCs(U1 cell lines) derived from undifferentiated healthy adult urothelium cells were differentiated into cardiomyocytes by staged activation or inhibition of the Wnt signaling pathway. On the 14th day of differentiation, flow cytometry was used to detect the differentiation efficiency of U1 cell lines into cardiomyocytes. Immunocytochemistry was utilized to detect cardiac troponin T expression in cardiomyocytes. The calcium activity of hiPSC-CMs was recorded by laser scanning confocal fluorescence microscopy. The electrophysiological characteristics of hiPSC-CMs were detected by whole cell patch clamp techniques. **Results** The efficiency of U1 cell line differentiation to hiPSC-CMs was $(88\pm 3)\%$. Action potential characteristics recorded by whole-cell patch-clamp techniques demonstrated that hiPSC-CMs could be divided into ventricular-like cardiomyocytes, atrial-like cardiomyocytes and sinoatrial node-like pacemaker cells, but mainly ventricular-like cardiomyocytes. The proportion, action potential duration, action potential amplitude and maximum depolarization rate of sinoatrial node-like pacemaker cells were significantly lower than those of ventricular-like cardiomyocytes and atrial-like cardiomyocytes. **Conclusion** The phased modulation of Wnt signaling pathway could induce hiPSCs to differentiate into hiPSC-CMs with high differentiation efficiency, and hiPSC-CMs have similar electrophysiological characteristics with mammalian cardiomyocytes.

【Key words】 Human induced pluripotent stem cells; Wnt signal pathway; Cardiomyocytes; Action potential

心血管疾病仍是威胁人类健康的主要杀手,世界各国每年要为此承担巨大的医疗负担^[1]。终末分化

基金项目:湖北省技术创新专项(2016ACA153)

通讯作者:黄从新, E-mail: huangcongxin@vip.163.com

的心肌细胞无再生能力,对于心肌细胞损伤或老化导致的心脏疾病,目前的治疗手段仍有限^[2]。缺乏足够来源的人源性心肌细胞阻碍了对心脏疾病的深入研究,不可否认,利用传统动物来源心肌细胞研究心脏病对疾病的诊疗有很大的指导意义,但人与动物之间存在不可逾越的种属差异,使得种属间心肌细胞的特性也存在很大的差别;而利用人胚胎干细胞研究心脏疾病又存在伦理学相关问题^[3]。人诱导多潜能干细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)^[4]具有与人胚胎干细胞相似的无限增殖与多向分化的潜能,利用 hiPSCs 研究心脏疾病很好地解决了胚胎干细胞的局限性。目前诱导 hiPSCs 向心肌细胞分化的主流方案是在体外模拟胚胎向心脏的发育过程,阶段性地调控 Wnt 通路,进而促使 hiPSCs 向心肌细胞定向分化^[5-7]。本研究通过调控 Wnt 通路诱导 hiPSCs 向心肌细胞定向分化,并使用流式细胞术、免疫细胞化学及膜片钳技术对人诱导多潜能干细胞来源的心肌细胞(hiPSC-CMs)进行鉴定,为 hiPSCs 向心肌细胞的定向分化提供参考。

1 材料与方法

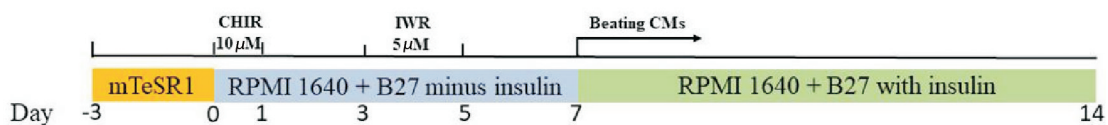
1.1 实验材料

人尿路上皮细胞来源的诱导多潜能干细胞(北京赛贝生物); Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix(Life Sciences); RPMI1640 培养基、含胰岛素 B27、不含胰岛素 B27、Versene Solution(Gibco)、不含葡萄糖 DMEM、KnockOut™-DMEM(美国 Gibco); L-抗坏血酸 2-磷酸倍半镁盐合物(Sigma-Aldrich); mTeSR™1 培养基、糖原合成酶 3 抑制剂 CHIR99021、Wnt 通路抑制剂 IWR-1-endo(加拿大 STEMCELL Technologies); 荧光鼠抗心肌钙蛋白抗

体(BD Pharmingen™), 鼠单克隆抗心肌钙蛋白抗体(abcam); 荧光猴抗兔 IgG 二抗(武汉安特捷生物); CaridoEasy® 人心肌细胞消化液 I、CaridoEasy® 人心肌细胞消化液 II(北京赛贝生物); 倒置显微镜(Olympus); 流式细胞仪(BD, FACSCalibur); 离心机(Neofuge 15R, Heal Force); 激光扫描共聚焦荧光显微镜(Leica); 膜片钳系统(HEKA)等。

1.2 hiPSCs 培养及向 hiPSC-CMs 分化

将 U1 细胞系接种于包被有胚胎干细胞专用基质胶(Corning® Matrigel® hESC-Qualified Matrix) 的 6 孔培养板,使用 mTeSR™1 培养基在 5% CO₂、37℃ 的培养箱中维持培养,每天更换 mTeSR™1 培养基,当细胞汇合度为 80% ~ 100% 时可进行传代培养,根据细胞的生长速度调整传代时间,一般 3 ~ 5 d 比较适宜。本实验采用二维单层细胞培养的方法,时序性激活及抑制 Wnt 信号通路诱导 U1 细胞向心肌细胞定向分化。首先将 U1 细胞系接种于包被有基质胶的 12 孔培养板准备分化,使用 mTeSR™1 培养基维持培养,每天更换 mTeSR™1 培养基,当细胞汇合度为 90% ~ 100% 时开始分化,分化的前两天在基础分化培养基(RPMI1640+不含胰岛素的 B27+抗坏血酸+青链霉素)中加入 10 μmol/L CHIR99021 激活 Wnt 信号通路以促进 U1 细胞向中胚层分化,分化第 3 天使用基础分化培养基维持培养,分化第 4 ~ 5 天在基础分化培养基中加入 5 μmol/L IWR-1-endo 抑制 Wnt 信号通路以促使中胚层细胞向心肌细胞富集分化,此后隔天更换基础分化培养基。分化第 7 ~ 8 天可在显微镜下观察到心肌细胞微弱的收缩搏动,分化第 14 天时可观察到稳定且明显的心肌细胞收缩搏动,分化流程见图 1。



注: CHIR: CHIR99021; IWR: IWR-1-endo; CMs: 心肌细胞。

图 1 hiPSCs 向心肌细胞分化流程图

1.3 流式细胞术检测 U1 细胞系向 hiPSC-CMs 分化的效率

hiPSCs 向心肌细胞分化第 14 天时可在显微镜下观察到稳定的自发搏动的 hiPSC-CMs,用 CaridoEasy® 人心肌细胞消化液消化细胞 300 g 离心 10 min,弃上清后加入 4% 多聚甲醛与细胞混匀,4℃ 冰箱过夜固定或室温固定 30 min;固定的细胞离心后弃上清,加入适量封闭液并重悬,4℃ 冰箱过夜。向封闭液中加入适量

偶联荧光素的抗心肌钙蛋白 T(cardiac troponin T, cTnT)抗体并轻柔吹打混匀细胞,室温避光孵育 1 h,随后 300 g 离心 10 min,用 500 μL 的 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液重悬细胞,根据直标抗体上荧光染料选择适合的通道进行上机检测,用 FlowJo 软件分析 U1 细胞系向 hiPSC-CMs 分化的效率(以 cTnT 阳性率表示)。

1.4 免疫细胞化学检测 cTnT 表达

hiPSCs 分化 2 周后,将 hiPSC-CMs 消化后再接种

于 6 孔板制作细胞爬片, 3 ~ 4 d 后用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 用含 0.2% TritonX-100 和 3% H_2O_2 的甲醇溶液封闭 15 ~ 30 min, 2% 牛血清白蛋白封闭 15 min 后加入 cTnT 的一抗 4℃ 过夜, 荧光标记的二抗室温孵育 1 h, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚室温核染 10 min 后, 抗荧光淬灭封闭剂封片, 超高分辨率共聚焦荧光显微镜观察并拍照记录。

1.5 激光扫描共聚焦荧光显微镜检测 hiPSC-CMs 的 Ca^{2+} 活动

hiPSCs 向心肌细胞分化 14 d 后, 用 CaridoEasy® 人心肌细胞消化液将心肌细胞消化后再接种于 24 孔培养板制作细胞爬片, 2 d 后更换心肌细胞培养基, 4 d 后用 Ca^{2+} 荧光指示剂 Fluo4-AM 转染心肌细胞, 37℃ 培养箱孵育 30 min 后使用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察, 用 Leica Application Suite X 软件进行图像采集心肌细胞的 Ca^{2+} 活动。

1.6 全细胞膜片钳检测 hiPSC-CMs 的电生理特性

将 hiPSC-CMs 消化后再接种于新的 24 孔培养板制作细胞爬片, 接种密度约为 1×10^4 /mL, 3 ~ 4 d 后将细胞爬片置于细胞外液 (124 mmol/L NaCl、5.4 mmol/L KCl、1.2 mmol/L $CaCl_2$ 、1 mmol/L $MgCl_2$ 、5 mmol/L Glucose、10 mmol/L HEPES、2 mol/L NaOH 调节 pH 7.4) 中, 选择单个边缘清晰且能自发搏动的心肌细胞作为记录细胞。含有细胞内液 (130 mmol/L 葡萄糖酸钾、10 mmol/L KCl、5 mmol/L NaCl、

1 mmol/L $MgCl_2$ 、10 mmol/L HEPES、2 mol/L NaOH 调节 pH 7.2) 的玻璃微电极入液阻抗为 3 ~ 5 MΩ, 使用微操纵器将玻璃电极缓慢移向记录细胞, 当电极靠近细胞膜后, 用 5 mL 注射器轻轻施加负压于电极内, 数秒后电极尖端与细胞膜形成 1 GΩ 以上的高阻抗封接, 随后补偿电极电容, 再轻吸注射器给予电极内负压以吸破细胞膜, 补偿细胞膜电容, 串联电阻补偿 50% ~ 60%, 稳定数分钟后, 切换到电流钳模式下, 使用 free gap 模式记录 hiPSC-CMs 自发的动作电位, 每个细胞记录 1 min, 实验过程通过 PULSE 软件控制, 采用 EPC9 放大器采集信号, 用 Clampfit10 及 Graphpad Prism8.0 软件进行数据分析。

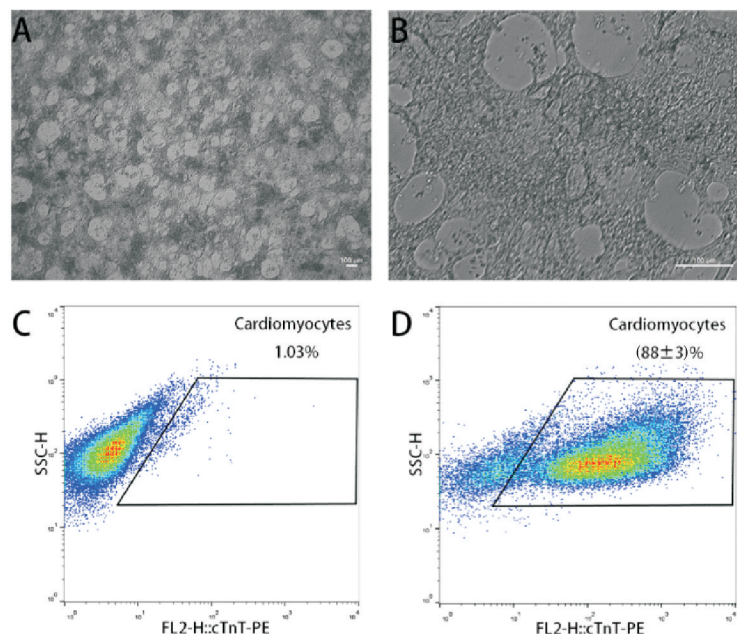
1.7 数据处理

应用 Graphpad Prism8.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 hiPSCs-CMs 分化效率鉴定

流式细胞术结果显示, hiPSC-CMs 的 cTnT 阳性率为 $(88 \pm 3)\%$, 即该分化方案下所产生的心肌细胞纯度接近 90% (图 2); 免疫荧光结果显示, hiPSC-CMs 表现出心肌细胞肌节样结构 (图 3), 以上结果表明 hiPSC-CMs 可用于后续实验研究。



注: A、B 分别表示分化第 14 天 hiPSC-CMs 在 ×4 和 ×10 倍镜下形态; C (阴性对照组)、D (实验组) 分别表示 hiPSC-CMs 流式 cTnT 阳性率。

图 2 显微镜下观察 hiPSC-CMs 以及流式检测分化效率

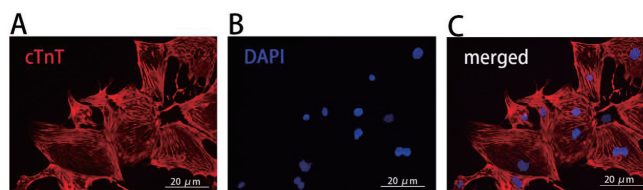


图 3 免疫荧光:hiPSC-CMs 表达 cTnT

2.2 hiPSC-CMs 具有自发的节律性 Ca^{2+} 活动

Ca^{2+} 作为一种普遍的第二信使参与了各种细胞的病理生理过程,心肌细胞内 Ca^{2+} 浓度节律性改变是心脏收缩功能的基础。心肌细胞的兴奋收缩偶联过程均伴随着细胞内 Ca^{2+} 浓度的改变,这种浓度变化的时

间及空间效应形成了心肌细胞内的钙瞬变。本实验用 Ca^{2+} 指示剂 Fluo4-AM 转染 hiPSC-CMs,并用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察,用 Leica Application Suite X 软件进行图像采集。结果显示,hiPSC-CMs 展现出自发的节律性 Ca^{2+} 活动(图 4)。

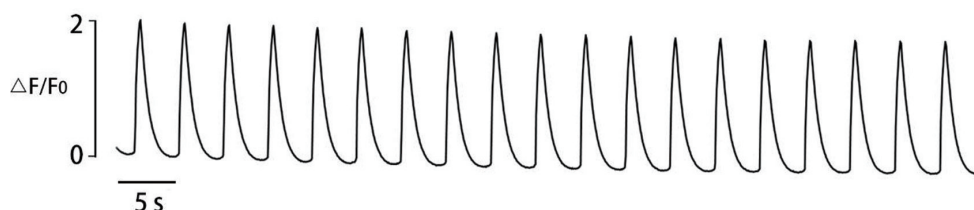


图 4 hiPSC-CMs 自发的节律性 Ca^{2+} 活动

2.3 hiPSC-CMs 的动作电位特征

全细胞膜片钳结果显示,hiPSC-CMs 根据其动作电位的形态特征可分为心室肌样细胞(ventricle-like cardiomyocytes, VLCMs)、心房肌样细胞(atrium-like cardiomyocytes, ALCMs)以及窦房结样起搏细胞(sinoatrial node-like pacemaker cells, SANLPCs)(图 5A),VLCMs 具有明显的 2 期平台期,SANLPCs 有明显的 4 期自动去极化,而 ALCMs 则无明显的 2 期平台期及 4 期自动去极化(图 5A),这些结果表明(表 1),hiPSC-CMs 的动作电位特征与哺乳动物相似。进一步

对不同类型心肌样细胞的动作电位参数进行分析表明,SANLPCs 的动作电位幅度(action potential amplitude, APA)、最大去极化速率(dV/dt)以及静息电位(resting potential, RP)均明显低于 VLCMs 和 ALCMs($P < 0.0001$),SANLPCs 的动作电位时程(action potential duration, APD)和超射(overshoot, OS)与 VLCMs、ALCMs 相比均有统计学差异($P < 0.05$),但 VLCMs 与 ALCMs 的 APD 和 OS 则无明显差别($P > 0.05$)(图 5B)。

表 1 hiPSC-CMs 的动作电位参数

细胞类型	APA(mV)	APD(s)	OS(mV)	$\text{dV}/\text{dt}(\text{V}/\text{s})$	RP(mV)
VLCMs($n=20$)	$114.30 \pm 1.521^{\#}$	0.48 ± 0.016	41.71 ± 1.146	$38.80 \pm 1.490^{\#}$	$-72.72 \pm 1.356^{\#}$
ALCMs($n=8$)	$104.30 \pm 1.918^{##}$	0.45 ± 0.014	$39.72 \pm 0.868^{##}$	$27.01 \pm 1.504^{##}$	$-66.23 \pm 1.753^{##}$
SANLPC($n=5$)	$68.36 \pm 1.611^{###}$	$0.39 \pm 0.022^{###}$	$36.05 \pm 0.735^{###}$	$13.19 \pm 1.244^{###}$	$-37.67 \pm 3.497^{###}$

注: $^{\#}$ 表示 VLCMs vs ALCMs, $P < 0.05$; $^{##}$ 表示 ALCMs vs SANLPCs, $P < 0.05$; $^{###}$ 表示 VLCMs vs SANLPCs, $P < 0.05$ 。

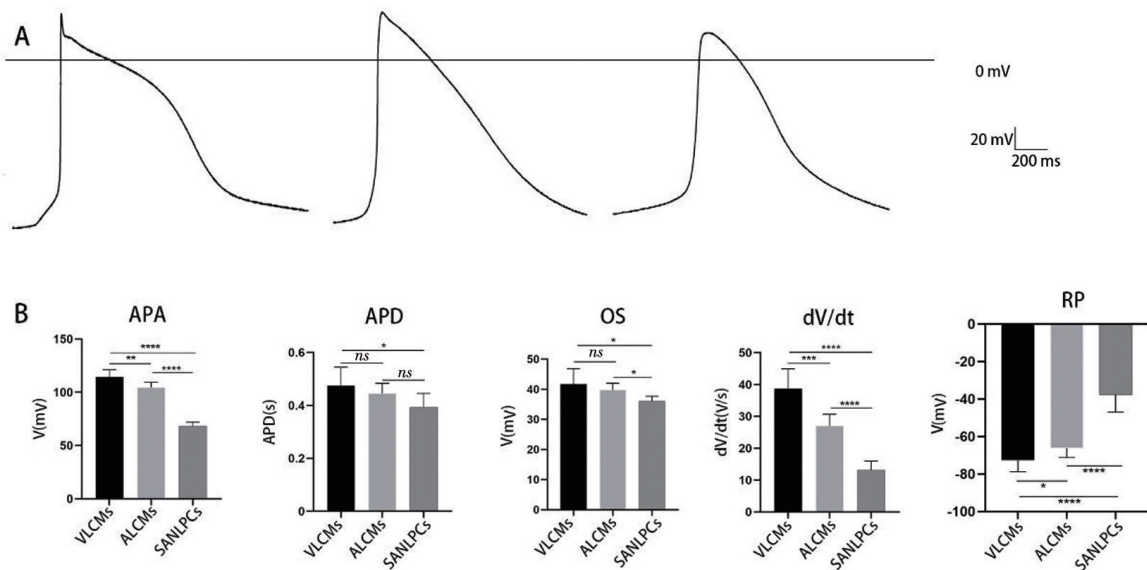
3 讨论

目前心脏疾病仍是威胁人类健康的主要“杀手”,由于心肌细胞的不可再生性和难以获得性,导致学者们难以获得足够的心肌细胞来进行相关的心脏疾病研究。幸运的是,hiPSCs 具有与人胚胎干细胞相似的特性,可向三胚层分化。通过定向分化,可将 hiPSCs 分化为心肌细胞,这很好地解决了心肌细胞来源不足的问题。自 2007 年问世以来,hiPSCs 在疾病模型构

建、药物筛选、转化和再生医学等领域引起了学者们的广泛关注。随着 hiPSCs 技术的不断发展,hiPSCs 向心肌细胞分化的方案也愈加成熟,如今 hiPSC-CMs 已成为研究心血管疾病重要的细胞模型^[8]。经典的 Wnt 信号通路在心脏发育过程中具有双时相性,在早期诱导胚胎向中胚层发展,而在晚期抑制中胚层向心肌细胞分化^[7]。本研究模拟 Wnt 信号通路在心脏发育中的作用,使用糖原合成激酶 3 抑制剂(CHIR99021)和

β -catenin 的抑制剂 (IWR-1-endo) 时序性调控 Wnt 信号通路,以诱导 hiPSCs 向心肌细胞定向分化。通过流式细胞术、免疫细胞化学、全细胞膜片钳技术以及检测心肌细胞 Ca^{2+} 活动,验证了 hiPSCs 成功分化为心肌细胞,这与 Lian 等^[5]的研究结果一致。对全细胞膜片钳数据进行进一步分析,本实验分化出的 hiPSC-CMs 所具有的电生理特征与哺乳动物心肌细胞的特性相似。VLCM 动作电位、ALCM 动作电位以及 SANLPCs

动作电位特征也与其他文献报道的 hiPSCs 分化的心肌细胞的特征基本相似。根据 hiPSC-CMs 典型的心肌细胞样动作电位特征,提示 hiPSC-CMs 具有基本表达了参与动作电位形成的重要离子通道蛋白,但由于不同细胞系以及各实验室诱导分化方案的不同,使得 hiPSC-CMs 的 APD、APA、OS、 dV/dt 和 RP 水平等方面存在细微的差异。



注:A 分别表示 VLCMs、ALCMs 以及 SANLPCs 的动作电位;B 表示三种心肌细胞亚型动作电位参数的比较 (* 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.005$, **** 表示 $P < 0.001$, ns 表示无统计学差异)。

图 5 hiPSC-CMs 的电生理特征

随着 hiPSC-CMs 技术的日益成熟,hiPSC-CMs 已广泛应用于疾病模型构建、药物毒性检测以及再生医学等领域^[9-10],结合基因编辑技术及组织工程技术,利用 hiPSC-CMs 进行疾病模型的构建已从单细胞水平过渡到了组织水平,甚至类器官水平^[11-13];将 hiPSCs 定向分化为不同的心肌细胞亚型是体外研究模拟心血管疾病和寻找治疗方案的先决条件,Protze 等^[14]首次报道利用 hiPSCs 向 SANLPCs 分化,并利用其进行生物起搏的研究;Lee 等^[15]以 hiPSCs 为平台,发现心室和心房心肌细胞来源于不同的中胚层细胞群,并可分别根据 CD235a 和 RALDH2 表达进行区分,在中胚层阶段激活视黄酸信号通路能促进 hiPSCs 向心房肌细胞定向分化。虽然这些研究极大地促进了 hiPSC-CMs 在心脏修复、药物毒性检测以及心脏疾病模型构建等领域的应用,但其适用性受到未成熟表型的限制。目前来自 hiPSCs 的心肌细胞更接近于胚胎或胎儿阶段的心肌细胞,尚处于不成熟阶段,在功能和结构上仍与成熟的人心肌细胞有较大的差异。为了克服这一问题,已有报道旨在促使 hiPSC-CMs 更加成熟

的策略,比如延长培养时间、电机械刺激、生化因子干预以及与非心肌细胞共培养等^[16-17]。本实验通过阶段性调控 Wnt 信号通路获得 hiPSC-CMs 同样处于尚不成熟阶段,后期实验需进一步促进其成熟。此外,在调控 Wnt 信号通路诱导 hiPSCs 向心肌细胞分化的过程中,发现其分化效率除了受到小分子作用浓度和作用时间等因素的影响外,还受起始分化时的细胞密度、细胞生长速度以及培养基体积等多种因素的影响,且不同细胞系之间的分化条件也存在一些差异,这对人们探索更优的分化方案具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 梁小婷. 干细胞治疗心力衰竭临床研究进展[J]. 心血管病学进展, 2018, 39(3): 379-384.
- [2] Mummery CL. Perspectives on the use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in biomedical research[J]. Stem Cell Reports, 2018, 11(6): 1306-1311.
- [3] Blau HM, Daley GQ. Stem cells in the treatment of disease[J]. N Engl J Med, 2019, 380(18): 1748-1760.
- [4] Yoshida Y, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells 10 years later: for cardiac applications[J]. Circ Res, 2017, 120(12): 1958-1968.

- [5] Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions[J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(1):162-175.
- [6] Mummery CL, Zhang J, Ng ES, et al. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes; a methods overview [J]. *Circ Res*, 2012, 111(3):344-58.
- [7] Lian X, Hsiao C, Wilson G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(27):E1848-E1857.
- [8] Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery[J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(7):377-388.
- [9] Sharma A, McKeithan WL, Serrano R, et al. Use of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to assess drug cardiotoxicity[J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(12):3018-3041.
- [10] Ross SB, Fraser ST, Semsarian C. Induced pluripotent stem cell technology and inherited arrhythmia syndromes[J]. *Heart Rhythm*, 2018, 15(1):137-144.
- [11] Liu C, Oikonomopoulos A, Sayed N, et al. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells; from 2D to 3D and beyond[J]. *Development*, 2018, 145(5):dev156166.
- [12] Nugraha B, Buono MF, von Boehmer L, et al. Human cardiac organoids for disease modeling[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2019, 105(1):79-85.
- [13] Soldner F, Jaenisch R. Stem cells, genome editing, and the path to translational medicine[J]. *Cell*, 2018, 175(3):615-632.
- [14] Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, et al. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(1):56-68.
- [15] Lee JH, Protze SI, Laksman Z, et al. Human pluripotent stem cell-derived atrial and ventricular cardiomyocytes develop from distinct mesoderm populations [J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 21(2):179-194, e4.
- [16] Tu C, Chao BS, Wu JC. Strategies for improving the maturity of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2018, 123(5):512-514.
- [17] Jiang Y, Park P, Hong SM, et al. Maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells; current strategies and limitations[J]. *Mol Cells*, 2018, 41(7):613-621.

收稿日期:2020-01-13

(上接第 740 页)

- [13] Tereshchenko LG, Posnack NG. Does plastic chemical exposure contribute to sudden death of patients on dialysis? [J]. *Heart Rhythm*, 2019, 16(2):312-317.
- [14] Salamon JN, Garcia MJ, Gueffuat M, et al. A heart of stone: rapid metastatic cardiac calcification in an end-stage renal disease patient [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(22):2309.
- [15] Okada M, Kyakuno M, Imamura J, et al. An autopsy case of sudden death in renal transplant recipient [J]. *Clin Transplant*, 2002, 16 Suppl 8:58-61.
- [16] Zhao Y, Chen NX, Shirazi JT, et al. Subcutaneous nerve activity and mechanisms of sudden death in a rat model of chronic kidney disease [J]. *Heart Rhythm*, 2016, 13(5):1105-1112.
- [17] Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, et al. Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, 11(7):1277-1285.
- [18] Franczyk-Skóra B, Gluba A, Banach M, et al. Prevention of sudden cardiac death in patients with chronic kidney disease [J]. *BMC Nephrol*, 2012, 13:162.
- [19] Shamseddin MK, Parfrey PS. Sudden cardiac death in chronic kidney disease: epidemiology and prevention [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(3):145-154.
- [20] Shi JY, Chen C, Xu X, et al. miR-29a promotes pathological cardiac hypertrophy by targeting the PTEN/AKT/mTOR signalling pathway and suppressing autophagy [J]. *Acta Physiol*, 2019, 227(2):e13323.
- [21] Paoletti E, Amidone M, Cassotana P, et al. Effect of sirolimus on left ventricular hypertrophy in kidney transplant recipients; a 1-year nonrandomized controlled trial [J]. *Am J Kidney Dis*, 2008, 52(2):324-330.
- [22] 张耀庭, 李烽, 朱永翔, 等. 沙库巴曲/缬沙坦在室性心律失常中的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2019, 40(7):982-984.
- [23] Feng JL. Incidence and predictors of sudden cardiac death after a major non-fatal cardiovascular event [J]. *Heart Lung Circ*, 2020, 29(5):679-686.
- [24] Schwarz U, Buzello M, Ritz E, et al. Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(2):218-223.
- [25] Kono K, Fujii H, Nakai K, et al. Composition and plaque patterns of coronary culprit lesions and clinical characteristics of patients with chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2012, 82(3):344-351.
- [26] Ureña-Torres P, D' Marco L, Raggi P, et al. Valvular heart disease and calcification in CKD: more common than appreciated [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2019, Jul 21; gzf133.
- [27] Choi MJ, Kim JK, Kim SG, et al. Association between cardiac valvular calcification and myocardial ischemia in asymptomatic high-risk patients with end-stage renal disease [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 229(2):369-373.
- [28] Cice G, Ferrara L, D' Andrea A, et al. Carvedilol increases two-year survival in dialysis patients with dilated cardiomyopathy: a prospective, placebo-controlled trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41(9):1438-1444.
- [29] Pun PH, Leich RW, Smith SR, et al. Predictors of survival after cardiac arrest in outpatient hemodialysis clinics [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2(3):491-500.

收稿日期:2020-01-17