

· 综述 ·

单细胞测序在心血管系统中的应用

潘乐 汪翔 龚惠

(上海市中山医院心血管病研究所 复旦大学生物医学研究所, 上海 200030)

【摘要】近十年,高通量测序技术高速发展,特别是在单细胞转录组学领域。单细胞测序是从单个细胞的水平检测基因表达信息,从而可以揭示那些原本在组织样本测序中被掩盖的信息,这一新兴测序技术各个领域都有着广阔的应用前景,特别是在肿瘤、免疫等领域,是近年来迅速兴起的一项技术。单细胞测序可以区分不同的细胞类型及其亚型,了解其基因表达,这一新兴技术在心脏发育和疾病模型的探索中已得到广泛的应用。现就聚焦单细胞测序技术的发展及其在心血管领域的应用前景做一综述。

【关键词】单细胞 RNA 测序;心脏细胞;心血管疾病

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.12.001

Application of Single Cell Sequencing in Cardiovascular System

PAN Le, WANG Xiang, GONG Hui

(Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Institutes of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】In the last decade, high-throughput sequencing technologies have developed rapidly, especially in the field of single-cell transcriptomics. Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) detects gene expression information at the level of a single cell, thus revealing information that would otherwise be obscured in tissue sample sequencing. This new sequencing technology has a good application prospect in various fields, especially in tumor, immunity and other fields. It has developed rapidly in recent years. ScRNA-seq can distinguish between different cell types and their subtypes to understand their gene expression, thus, this emerging technology has been widely used in the exploration of models of heart development and disease. This article focus on the development of single-cell transcriptomics and its application in the cardiovascular field.

【Key words】Single-cell RNA sequencing; Heart cells; Cardiovascular disease

高通量测序技术已成为基因组学和转录组学的研究热点。高通量测序技术能够对多个 DNA 分子进行并行测序,使数亿个 DNA 分子能够同时被检测出来。传统的基因表达分析技术(例如定量聚合酶链式反应、微阵列和大量 RNA 测序)往往研究的是一群在基因表达水平上存在异质性的细胞,并把这些细胞的基因表达水平的平均值检测出来,但对于含量比较低而在常规 RNA 测序检测中被忽视的细胞亚群和细胞群体中不同个体细胞,这样的检测显然是不合适的^[1]。由此产生了单细胞测序,单细胞测序是指在单细胞水平对基因组和转录组进行测序分析的技术。在本综述中,主要讨论单细胞测序的实验工作流程,及其在心血管研究中的应用,聚焦单细胞转录组学的发展及其在心血管领域的应用前景。

1 单细胞测序技术

1.1 单细胞测序技术概述

单细胞测序技术的主要优势就是在给定的样品中以较高的分辨率和深度分析每个细胞的转录组学信息^[2]。特别是,单细胞测序技术可以无偏差地评估细胞异质性,鉴定新的种群以及细胞状态,并以高的分辨率和准确性阐明发育和分化过程中的动态细胞转变^[3]。

单细胞测序技术在心血管研究中的应用广泛。除了识别稀有的细胞亚群以外,单细胞测序还可以基于每个细胞的转录组进行细胞轨迹分析,这对于阐明心脏发育、祖细胞或干细胞分化过程中的细胞状态转变有重要意义。此外,单细胞测序技术还可以通过分析成年小鼠和人类胎儿的心脏和冠状血管等重要组织,

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81770239)

通信作者:潘乐, E-mail:19211210014@fudan.edu.cn

得到这些重要组织的转录组信息和表观遗传图。基于此,可以评估常见心血管细胞类型的器官特异性或组织特异性的转录组特征,以阐明普遍存在的细胞类型的功能异质性。单细胞测序还能够交叉分析给定样品中存在的多种细胞类型的单细胞,根据基因表达预测配体与受体结合的细胞间通讯^[4]。随着空间转录组学的发展,这对于分析细胞间通讯等将得到极大的补充^[5]。将单细胞基因组学、转录组学、表观基因组学和蛋白质组学结合,将对评估细胞群体异质性及其对患者特异性药物反应和不良反应的贡献具有重要意义。

1.2 单细胞测序步骤

单细胞测序主要包括单细胞分离、细胞分离、核酸处理、DNA 扩增、建库与测序和数据分析^[6]。以下主要讨论单细胞分离、质量控制策略和被广泛使用的数据分析方法。

1.2.1 单细胞分离与准备

单细胞分离方法因所用的单细胞测序技术和细胞来源而异。对于培养细胞,可以通过常规的细胞解离方法制备。但对于组织,则需要用酶仔细消化,特别是对于脆弱或易于死亡的细胞群。单细胞分离后,需要立即用染料标记活细胞,然后用流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS)阳性选择活细胞(或用核酸结合染料与双链核酸结合, FACS 阴性选择活细胞)^[7]。体积较小的人胎儿心肌细胞较容易被基于微滴的单细胞测序技术平台(微滴直径 40 μm)获取。成人心肌细胞(直径约 100 μm)主要是通过基于板或微流体的单细胞测序技术平台(直径 130 μm)获取,但这会造成心肌细胞的损伤。对于成人心肌细胞,还可以分离出单细胞的细胞核,用细胞核测序^[8]。最近有研究表明,可通过直径为 500 μm 的大颗粒流式细胞仪用于成人心肌细胞的单细胞测序分析^[9]。

1.2.2 质量控制与归一化

用转录组测序的通用的序列对齐软件 STAR 将产生的原始测序数据与公开可用的平台序列(如 10x Genomics 的 Cell Ranger)对齐,产生特征条形码矩阵(feature-barcode matrices)。其他预处理软件,例如 dropEst、Dr. seq2 和 scPipe,也可用于生成表达矩阵。一些用于处理转录组测序数据的软件,如 FastQC 或 RNA-SeQC,也可用于处理单细胞测序数据^[10]。对齐后,可以使用许多 R 包或 python 包进行数据的质量控制、可视化和分析。迄今为止,Monocle、Scanpy、Scater、Seurat 和 Sincera 软件包最常用于单细胞基因表达分析^[11]。与其他细胞相比,心肌细胞的线粒体含量较高。

1.2.3 降维

单个维表示单个基因的表达,单细胞测序数据是多维的,为了后续的可视化和分析,就需要降维。迄今为止,已有很多降维和聚类的算法,但并无一种是金标准,在选择算法时,需考虑计算上和生物学上的优缺点,选择合适的算法。随着基于液滴的单细胞测序技术的出现,捕获细胞的能力越来越好,生成的数据集不断增大,从而提供了更好的提高识别稀有细胞群的能力。此外,由于高度的缺失和噪声,使得主成分分析等线性变换无法捕获细胞关系,非线性降维算法(如 t-分布领域嵌入算法和统一流形逼近与投影),因其灵活性和更易于生成可视化结果而变得越来越流行^[12]。

2 单细胞测序技术在心血管系统中的应用

单细胞测序技术作为一种功能强大的生物高分辨率分析技术,为对各种细胞类型的基因表达特性的深入认识提供了可能,使人们能够洞察所有正在进行的生物过程,这项技术已经广泛地应用于各种发育与分化、肿瘤与免疫、神经等领域,可使人们对这些系统的病理生理过程有更深刻的理解。下文将聚焦单细胞测序技术在心血管领域的应用前景。

2.1 单细胞测序应用于发育领域

单细胞测序已经可以用于分析心血管系统的各种组织和细胞类型,与许多其他器官一样,心脏的第一个单细胞组学是出现在发育领域的^[13]。DeLaughter 等^[14]通过对胚胎心脏的解剖学定义区域来生成主要心脏细胞类型在发育各个阶段的单细胞图谱,并发现转录因子 NK2 同源盒蛋白 5(NK2 homeobox protein 5, NKX2.5)的缺乏会导致心肌细胞成熟的严重缺陷,并描述了在发育的胚胎中已知心脏细胞类型内存在显著异质性。

单细胞测序对鉴定调节形成心脏早期心肌细胞的出现和分化的机制非常有用。Li 等^[15]通过单细胞测序分析了来自早期发育心脏的心脏细胞,证实细胞周期基因表达是转录变异的主要决定因素。另在对心肌细胞的细胞周期匹配中,发现了 G2/M 期的心肌细胞下调了肌节和细胞骨架标志物。在对小鼠野生型和 Mesp1 敲除的心血管祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)的单细胞测序分析表明, Mesp1 是祖细胞诱导心脏基因表达程序所必需的^[16]。对于 NKX2.5^{+/-}和胰岛素基因增强子结合蛋白 1(insulin gene enhancer binding protein 1, Isl1)^{+/+}的 CPCs 的单细胞测序发现了在心脏发育早期阶段新的祖细胞群,随后进行的发育轨迹分析还显示, NKX2.5 的表达时间延长可能促进 CPCs 向心肌细胞发育,而 Isl1^{+/+}的 CPCs 则通过吸引子状态后进入多个发育分支^[17]。然后,用 Isl1 标记的

第一生心区的 CPCs, NKX2.5 标记的第一生心区和第二生心区的 CPCs, 对胚胎小鼠心脏单细胞测序, 发现第二生心区的 CPCs 通过趋化指导介导的细胞间通讯吸引并扩大了第一生心区的心管区域, 该发现已通过这种趋化作用的药物进行药理学阻断而得到证实, 并揭示了存在于 CPCs 和终末分化的心血管细胞之间的细胞间通讯^[18]。同时, 对有被膜的玻璃海鞘的心咽发育进行单细胞测序分析, 揭示了第一和第二生心区中独特的分子信号通路^[19]。通过基于网络的计算方法预测谱系特异性转录因子, 确定 Hand2 是存在流出道细胞但不是右心室细胞的标志物。有趣的是, 在 Hand2 敲除的小鼠胚胎出现了右心室不能正确形成, 随后的单细胞测序分析表明, 这个先天性心脏缺陷表型的原因是心室流出道形成缺陷, 而不是右心室形成缺陷^[20], 这些发现表明, 对单细胞水平的先天性心脏病致病机制的理解对于准确定义和定位构成该疾病表型的细胞亚群至关重要。

2.2 单细胞测序应用于成人心脏

除胚胎和产后心脏外, 单细胞转录组学已用于区分成年小鼠心脏中的细胞亚群。通过健康成年小鼠心脏的非心肌细胞的单细胞测序, 发现在内皮细胞、心脏成纤维细胞和免疫细胞之间存在广泛的细胞间通讯网络, 这可能与维持心脏动态平衡有关^[4]。此外, Gladka 等^[21]采用基于 FACS 的单细胞测序对在稳态条件下和缺血性损伤后的成年心脏进行分析, 发现已知细胞类型中出现多个新的亚群, 并发现活化的成纤维细胞中 Ckap4 的增加。Nomura 等^[22]使用 Langendorff 灌注法灌注分离小鼠和人的心室, 并在 Smart-seq2 技术平台上对成年心肌细胞进行单细胞测序, 鉴定出肥厚型心肌细胞相关的基因, 并且在对主动脉弓缩窄的小鼠不同时间点的心肌细胞进行单核细胞的细胞轨迹分析, 发现 p53-肌细胞特异性增强因子 2-核因子 E2 相关因子 2 信号轴在促进氧化性 DNA 损伤积累后肥厚型心肌细胞亚群中致病基因的激活中起了关键作用, 同时通过心力衰竭患者心肌细胞的单细胞测序获得的数据证实了这些发现。此外, 不同类型的心脏细胞基因表达的差异和心脏细胞基因表达的性别特异性也可能与心脏稳态和重塑有关。通过对刚出生的小鼠心脏的单个核 RNA 测序, 在儿童线粒体心肌病小鼠模型中发现细胞类型特异性缺陷^[23]。

在心脏传导系统 (cardiac conduction system, CCS) 的发育研究中, 由于 CCS 细胞数量少, 细胞类型多, 解剖结构复杂和难以分离等特点, 其研究进展缓慢, 然而单细胞测序可以在单细胞的分辨率下进行全基因组的基因表达分析。Goodyer 等^[24]通过对发育中的小鼠心

脏进行单细胞测序, 观察 CCS 在发育过程中的转录情况, 发现了一些新的 CCS 基因, 并通过荧光原位杂交和体成像技术进行了验证。此外, 聚类分析揭示了不同的 CCS 细胞亚型, 其中包括临床相关但缺乏特征的连接 CCS 和周围心肌的过渡细胞。

为了研究心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后新生血管中内皮细胞的异质性, Li 等^[25]从 MI 前和后 7 d 的小鼠心脏中分离内皮细胞进行单细胞测序。结果表明在主成分分析鉴定出的 10 个内皮细胞簇中, MI 后 7 d 其中 5 个簇明显富集, 还发现了与心脏重塑、内皮细胞-细胞外基质相互作用、增殖和细胞周期调控有关的基因上调。结果还表明在 MI 后的小鼠模型和人心脏中, 有 5 个簇中的 3 个, 血浆雌性囊泡相关蛋白表达量升高^[25]。有趣的是, 囊泡相关蛋白表达量的升高, 主要出现在梗死边界区的内皮细胞, 这同时也是可以促进 MI 后内源性心脏组织修复的生长因子高表达的区域^[26]。越来越多的研究使用单细胞测序阐明了 MI 后各种非心肌细胞群体的作用, 从而对缺血组织的重塑过程中微环境的变化有了更深入的理解, 上述这些研究将对未来的研究产生重要的作用, 尤其是在对于损伤后的各个阶段, 例如早期急性炎症 (MI 后 1 d) 和后期重塑 (MI 之后 30 d), 这样的研究可以更好地描述病理性心肌纤维化过程中内皮向间充质转变的动态过程或新生血管形成过程中间充质向内皮的转变。See 等^[27]在对健康和心力衰竭心脏的心肌细胞进行单个核的单细胞测序时, 发现小鼠、人类衰竭心脏和非衰竭心脏均存在较大的细胞异质性, 通过共表达网络分析, 发现病变区域心脏的心肌细胞的数个亚群出现了去分化和细胞周期相关基因的高表达, 并且发现了两种新的必要调控因子长链非编码 RNAs (miR-99/100 和 Let-7a)。目前, 对于组织修复和重塑过程中, 非心肌细胞与心肌细胞之间的细胞间通讯的转录组学研究以及相应的验证研究并不多, 对这些方面的研究将对理解心脏损伤和修复的不同阶段细胞反应至关重要。在最近的研究中, 通过对 0、2、5 和 11 周心力衰竭小鼠的主要心脏细胞 (包括心肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞和巨噬细胞) 进行单细胞测序, 通过细胞串扰分析揭示巨噬细胞激活和亚型转换是心脏肥大中期的关键事件, 达格列净 (一种钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂) 可以靶向心力衰竭患者, TD139 和 Arglablin (一种小白菊内酯衍生物) 可以减轻心肌纤维化^[28]。

2.3 单细胞测序应用于多能干细胞

人类诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) 已被证明可用于特定患者的疾病建模和再生疗法, 主要的问题仍然是 iPSCs 诱导的心血管细胞的不成熟性

和异质性。因此,许多研究已经使用单细胞测序寻找所涉及信号传导途径,并鉴定分化产生的细胞类型,以生成特定的心血管细胞。使用目前可用的方法产生的人 iPSCs 诱导的心肌细胞 (iPSC-derived cardiomyocytes, iPSC-CMs) 体现了胎儿心肌细胞类似的形态、大小、电生理、收缩力和代谢方面的特征。Friedman 等^[29]对 iPSC-CMs 分化的各个阶段超过 40 000 个细胞进行单细胞测序,发现非 DNA 结合同源域蛋白 HOPX 的失调可能导致 iPSC-CMs 持续处于未成熟状态。在另一项对超过 10 000 个 iPSC-CMs 细胞的单细胞测序中,发现了心脏转录调节因子。表达核受体亚家族 2 组 F 成员 2 和 T-框蛋白 5 的 iPSC-CMs 往往更不成熟,出现类似心房的心肌细胞的特征,而表达 Hairy 相关基因的 HEY2、IRX4 和 MYL2 的 iPSC-CMs 具有类似心室的心肌细胞的特征^[30]。总之,这些研究的结果突出了 iPSC-CMs 的异质性,并揭示了一些调控细胞成熟地定位于心室的心脏转录因子。

人类 iPSCs 诱导的内皮细胞 (iPSC-derived endothelial cells, iPSC-ECs) 也广泛地用于血管疾病的研究,揭示了遗传和环境因素对体外血管功能障碍的影响^[31]。与 iPSC-CMs 一样,当前可用的 iPSC-ECs 受细胞难以成熟和异质性大的限制。在对 iPSC-ECs 进行单细胞测序后,鉴定出了 iPSC-ECs 的四个主要亚群,这些亚群都特征性 APNRR、CLDN5、ESM1 和 GJA5 等基因的高表达。CLDN5⁺簇代表代谢活跃的 iPSC-ECs, GJA5⁺簇代表动脉样 iPSC-ECs, APNLR⁺簇代表炎症反应型 iPSC-ECs, ESM1⁺亚群代表活化的细胞^[32]。

3 展望

尽管仍然存在一些技术限制,但随着实验和分析技术的不断改进和标准化,单细胞测序在基础研究和翻译研究中的应用有望呈指数增长。特别是目前正在研究将单细胞测序与其他组学技术(例如单细胞基因组学和单细胞表观基因组学)结合使用,并有望以单细胞分辨率阐明基因调控机制,对将多组学方法集成到当前的工作流程提出了许多挑战,但也有望与实验室和诊所中的现有方法协同工作。因此,单细胞测序技术不仅具有改变基础科学的潜力,而且还具有促进精密医学发展的潜力。

参考文献

- [1] Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(6): 1292-1305.
- [2] Wagner A, Regev A, Yosef N. Revealing the vectors of cellular identity with single-cell genomics[J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(11): 1145-1160.
- [3] Potter SS. Single-cell RNA sequencing for the study of development, physiology and disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(8): 479-492.
- [4] Skelly DA, Squiers GT, McLellan MA, et al. Single-cell transcriptional profiling

reveals cellular diversity and intercommunication in the mouse heart[J]. *Cell Rep*, 2018, 22(3): 600-610.

- [5] 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.
- [6] Grün D, van Oudenaarden A. Design and analysis of single-cell sequencing experiments[J]. *Cell*, 2015, 163(4): 799-810.
- [7] Williams JW, Winkels H, Durant CP, et al. Single cell RNA sequencing in atherosclerosis research[J]. *Circ Res*, 2020, 126(9): 1112-1126.
- [8] Ackers-Johnson M, Tan WLW, Foo RS. Following hearts, one cell at a time: recent applications of single-cell RNA sequencing to the understanding of heart disease[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4434.
- [9] Kannan S, Miyamoto M, Lin BL, et al. Large particle fluorescence-activated cell sorting enables high-quality single-cell RNA sequencing and functional analysis of adult cardiomyocytes[J]. *Circ Res*, 2019, 125(5): 567-569.
- [10] Skinnider MA, Squair JW, Foster LJ. Evaluating measures of association for single-cell transcriptomics[J]. *Nat Methods*, 2019, 16(5): 381-386.
- [11] Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(8): 96.
- [12] Wu Y, Zhang K. Tools for the analysis of high-dimensional single-cell RNA sequencing data[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(7): 408-421.
- [13] Kokkinopoulos I, Ishida H, Saba R, et al. Single-cell expression profiling reveals a dynamic state of cardiac precursor cells in the early mouse embryo[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0140831.
- [14] DeLaughter DM, Bick AG, Wakimoto H, et al. Single-cell resolution of temporal gene expression during heart development[J]. *Dev Cell*, 2016, 39(4): 480-490.
- [15] Li G, Tian L, Goodyer W, et al. Single cell expression analysis reveals anatomical and cell cycle-dependent transcriptional shifts during heart development[J]. *Development*, 2019, 146(12): dev173476.
- [16] Lescroart F, Wang X, Lin X, et al. Defining the earliest step of cardiovascular lineage segregation by single-cell RNA-seq[J]. *Science*, 2018, 359(6380): 1177-1181.
- [17] Jia G, Preussner J, Chen X, et al. Single cell RNA-seq and ATAC-seq analysis of cardiac progenitor cell transition states and lineage settlement[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4877.
- [18] Xiong H, Luo Y, Yue Y, et al. Single-cell transcriptomics reveals chemotaxis-mediated intraorgan crosstalk during cardiogenesis[J]. *Circ Res*, 2019, 125(4): 398-410.
- [19] Wang W, Niu X, Stuart T, et al. A single-cell transcriptional roadmap for cardiopharyngeal fate diversification[J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(6): 674-686.
- [20] de Soysa TY, Ranade SS, Okawa S, et al. Single-cell analysis of cardiogenesis reveals basis for organ-level developmental defects[J]. *Nature*, 2019, 572(7767): 120-124.
- [21] Gladka MM, Molenaar B, de Ruiter H, et al. Single-cell sequencing of the healthy and diseased heart reveals cytoskeleton-associated protein 4 as a new modulator of fibroblasts activation[J]. *Circulation*, 2018, 138(2): 166-180.
- [22] Nomura S, Satoh M, Fujita T, et al. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4435.
- [23] 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.
- [24] Goodyer WR, Beyersdorf BM, Paik DT, et al. Transcriptomic profiling of the developing cardiac conduction system at single-cell resolution[J]. *Circ Res*, 2019, 125(4): 379-397.

(下转第 1267 页)

种与各种疾病相关的综合征,如淋巴系统疾病、自身免疫性疾病或癌症。当医源性损伤胸导管或侧支淋巴管时,可同时出现指甲变色和淋巴水肿。两个病例均是保守治疗无效后给予胸膜固定术,且治疗时间长,黄甲综合征提示淋巴引流受损,预示着恢复困难,常需要手术治疗。

治疗乳糜胸的手术方法有右侧入路胸导管结扎术、胸腔镜下胸导管结扎术、胸导管或其分支介入栓塞术^[3]。如果这些手术方法无效,可通过胸膜切除、胸膜固定术、应用抗炎药物或胸膜-腹腔分流术来修复淋巴管。

综上所述,单纯乳糜胸保守治疗似乎是一个较好的选择,如果保守治疗失败,手术干预仍是最后的选择。

参考文献

- [1] Kanakis MA, Misthos P, Kokotsakis JN, et al. Chylothorax complicating thoracic aortic surgery[J]. *J Card Surg*, 2011, 26(4):410-414.
- [2] Hsu YJ, Chen PR, Lin YS, et al. Chylothorax following endovascular aortic repair with subclavian revascularization—a case report[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2014, 9:165.
- [3] Wu D, Chesnokova AE, Akvan S, et al. Postoperative chylothorax after thoracoabdominal aortic aneurysm repair[J]. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2018, 30(2):215-219.
- [4] Waikar HD, Kamalaneson P, Mohamad ZM, et al. Chylothorax after off-pump coronary artery bypass graft surgery: management strategy [J]. *Ann Card Anaesth*, 2018, 21(3):300-303.
- [5] Deguchi K, Yamauchi T, Maeda S, et al. Chylothorax after coronary artery bypass grafting using the right internal thoracic artery[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2015, 63(7):416-421.
- [6] Waliyan S, Chandler J, Hovsepian D, et al. Yellow nail syndrome with chylothorax after coronary artery bypass grafting[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2018, 13(1):93.
- [7] Sabzi F, Yaghoobi A. The combination of breast necrosis and chylothorax following the OPCAB[J]. *J Cardiovasc Thorac Res*, 2016, 8(2):88-90.
- [8] Altun G, Pulathan Z, Kutanis D, et al. Conservative management of chylothorax after coronary artery bypass grafting[J]. *Tex Heart Inst J*, 2015, 42(2):148-151.
- [9] Hoskote SS, Devarapally SR, Dasgupta R, et al. Fatal pulmonary embolism complicating a postoperative chylothorax despite adequate thromboprophylaxis [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2013, 24(8):887-889.
- [10] Mand'ak J, Habal P, Stetina M, et al. Chylothorax—a rare complication after cardiac surgery(a case report) [J]. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2011, 54(1):37-39.
- [11] Karimi A, Salehiomran A, Yazdanifard P. Chylothorax after coronary artery bypass and internal mammary artery harvesting: a case report[J]. *East Mediterr Health J*, 2010, 16(10):1103-1104.
- [12] Sarmast H, Takriti A. Yellow nail syndrome resulting from cardiac mitral valve replacement[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2019, 14(1):72.
- [13] Tasoglu I, Lafci G, Sahin S, et al. Chylomediastinum following mitral valve replacement[J]. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2012, 60(7):480-481.
- [14] Kitahara H, Yoshitake A, Hachiya T, et al. Management of aortic replacement-induced chylothorax by lipiodol lymphography[J]. *Ann Vasc Dis*, 2015, 8(2):110-112.
- [15] Lee KH, Jung JS, Cho SB, et al. Thoracic duct embolization with lipiodol for chylothorax due to thoracic endovascular aortic repair with debranching procedure[J]. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*, 2015, 48(1):74-77.
- [16] Oguz E, Apaydin AZ, Ayik F, et al. Chylothorax after thoracoabdominal aneurysm repair: efficacy of somatostatin[J]. *Ann Vasc Surg*, 2011, 25(2):211-267.
- [17] Lazopoulos A, Paliouras D, Barbetakis N. Surgical technique and chylothorax following coronary artery bypass grafting[J]. *Ann Card Anaesth*, 2018, 21(4):468.
- [18] Sato S, Nakamura A, Shimizu Y, et al. Early and mid-term outcomes of simultaneous thoracic endovascular stent grafting and combined resection of thoracic malignancies and the aortic wall [J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2019, 67(2):227-233.
- [19] Ismail NA, Gordon J, Dunning J. The use of octreotide in the treatment of chylothorax following cardiothoracic surgery [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2015, 20(6):848-854.

收稿日期:2020-03-12

(上接第 1230 页)

- [25] Li Z, Solomonidis EG, Meloni M, et al. Single-cell transcriptome analyses reveal novel targets modulating cardiac neovascularization by resident endothelial cells following myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2019, 40(30):2507-2520.
- [26] Paik DT, Rai M, Ryzhov S, et al. Wnt10b gain-of-function improves cardiac repair by arteriole formation and attenuation of fibrosis[J]. *Circ Res*, 2015, 117(9):804-816.
- [27] See K, Tan WLW, Lim EH, et al. Single cardiomyocyte nuclear transcriptomes reveal a lincRNA-regulated de-differentiation and cell cycle stress-response in vivo[J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):225.
- [28] Ren Z, Yu P, Li D, et al. Single-cell reconstruction of progression trajectory reveals intervention principles in pathological cardiac hypertrophy [J]. *Circulation*, 2020, 141(21):1704-1719.
- [29] Friedman CE, Nguyen Q, Lukowski SW, et al. Single-cell transcriptomic analysis of cardiac differentiation from human PSCs reveals HOPX-dependent cardiomyocyte maturation[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4):586-598.
- [30] Churko JM, Garg P, Treutlein B, et al. Defining human cardiac transcription factor hierarchies using integrated single-cell heterogeneity analysis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):4906.
- [31] Gu M, Shao NY, Sa S, et al. Patient-specific iPSC-derived endothelial cells uncover pathways that protect against pulmonary hypertension in BMPR2 mutation carriers[J]. *Cell Stem Cell*, 2017, 20(4):490-504.
- [32] Paik DT, Tian L, Lee J, et al. Large-scale single-cell RNA-seq reveals molecular signatures of heterogeneous populations of human induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2018, 123(4):443-450.

收稿日期:2020-06-09