

小电导钙激活钾通道在人心房中的增龄性变化*

余奕言¹,何容芳¹,于凤旭²,范学慧¹,张娟¹,李涛¹,李妙龄^{1△}

(1. 医学电生理学教育部重点实验室/医学电生理四川省重点实验室/西南医科大学心血管医学研究所, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学附属医院心脏外科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究增龄对人心房肌小电导钙激活钾(SK2)通道的影响。**方法** 选取3个不同年龄阶段: <40 岁($n=22$)、 $40\sim 60$ 岁($n=34$)和 >60 岁($n=18$)窦性心律(SR)患者为研究对象,于体外循环手术中获取患者右心耳组织。急性酶分离方法分离单个人心房肌细胞,全细胞膜片钳技术检测不同年龄患者心房SK2通道电流的差异。Western blot和qRT-PCR检测不同年龄患者心房组织SK2通道蛋白和基因的表达变化。**结果** 采用该急性酶分离方法可获得细胞完整、横纹清晰、有电生理活性的心房肌细胞; <40 岁患者组($n=18$)与 $40\sim 60$ 岁患者组($n=8$)相比,SK2通道电流无明显变化($P>0.05$),与 <40 岁患者组($n=8$)相比, >60 岁患者组($n=10$)SK2通道电流明显增加(-130 mV, $P<0.01$);与 $40\sim 60$ 岁患者组($n=8$)相比, >60 岁患者组($n=10$)SK2通道电流也增加且差异有统计学意义(-130 mV, $P<0.01$)。分别与 <40 岁($n=12$)和 $40\sim 60$ 岁患者组($n=18$)相比, >60 岁患者组($n=10$)SK2通道蛋白表达和基因表达均明显增加($P<0.05$)。**结论** 随着年龄的增加,人心房组织中SK2通道电流、基因和蛋白表达水平均明显增加,增龄导致的SK2通道重构可能参与了心房颤动的病理生理过程。

[关键词] 心房颤动;小电导钙激活钾通道;老龄;电重构;膜片钳**[中图分类号]** R541.75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)33-4218-05

Aging change of small-conductance calcium-activated potassium channel in human atrium*

YU Yiyan¹, HE Rongfang¹, YU Fengxu², FAN Xuehui¹, ZHANG Juan¹, LI Tao¹, LI Miaoling^{1△}

(1. Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education/Medical Electrophysiological Key Laboratory of Sichuan Province/Institute of Cardiovascular Medical Research, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Cardiothoracic Surgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of ageing on small conductance calcium-activated potassium channels (SK2 channel in human atrium). **Methods** The patients with sinus rhythm (SR) in 3 age groups of <40 years old ($n=22$), $40-59$ years old ($n=34$) and >60 years old ($n=18$) were selected as the research subjects. Their right ear tissues were obtained in cardiopulmonary bypass operation. The acute enzyme digestion method was used to isolate single atrial myocyte. The whole-cell patch clamp technique was used to detect the difference of SK2 channel current in different age groups. Western blot and qRT-PCR were used to measure the expression levels of atrial tissue SK2 channel protein and gene. **Results** The atrial myocyte with intact cell, clear band and electrophysiological activity could be obtained by adopting the acute enzyme digestion method; the SK2 channel current had no obvious change between the <40 years old group ($n=8$) and $40-60$ year old group ($n=8$) ($P>0.05$); compared with the >60 years old group ($n=10$), the SK2 channel current in the <40 years old group ($n=8$) was significantly increased (-130 mV, $P<0.01$); compared with the $40-60$ years old group ($n=8$), the SK2 current in the >60 years old group, was also increased with statistical difference (-130 mV, $P<0.01$). Compared with the <40 years old group ($n=12$) and $40-60$ years old group ($n=18$), the SK2 channel protein and gene expressions in the >60 years old group were significantly increased. **Conclusion** The SK2 channel current and the expression levels of gene and protein are significantly increased with the age increase. Aging caused SK2 channel reconstruction may be involved in pathophysiological process of atrial fibrillation.

[Key words] atrial fibrillation; small conductance calcium-activated potassium channel; ageing; electrical remodeling; patch-clamp technique

心房颤动(atrial fibrillation, AF)已成为全球重大的公共卫生问题,据不完全统计,直到 2010 年,全球 AF 患者已达到 33.5 亿^[1]。且除了 AF 自身的危害以外,还会增加卒中及心力衰竭的发病率以及致死率。AF 是临床最为常见的持续性心律失常,一般人群发病率为 1%~2%,80 岁以上可高达 8%。在所有 AF 患者中,70% 的 AF 患者年龄在 65~85 岁。对 1999—2001 年我国 AF 住院患者病因分析显示,老年 58.1%、高血压病 40.3%、冠心病 34.8%、心力衰竭 33.1%、风湿性心脏病 23.9%;阵发性 AF 占 33.7%、持续性 AF 占 16.7%、永久性 AF 占 49.5%^[2]。老年和高血压所占比例排前两位,是 AF 的独立危险因素。

小电导钙激活钾(SK2)通道是近期发现的一种对细胞内钙敏感的一类钙激活钾通道^[3]。SK2 通道主要在心房上表达,在心房复极末期发挥重要作用。众多研究支持 SK 通道的结构与功能变化与 AF 的发生与发展密切相关^[4-7],参与了 AF 电重构过程。本课题组前期研究报道,AF 时 SK 通道的功能明显增强^[8]。AF 的发生随年龄增加明显增加,因此本研究旨在探究是否随着年龄的增加,SK2 通道功能会发生改变,进而增加 AF 的发生率,为阐明 AF 的发生和治疗提供新的思路和新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 取材 选取在西南医科大学附属医院心脏外科进行体外循环的不同年龄段(<40 岁、40~60 岁、>60 岁)窦性心律(SR)患者的新鲜右心耳组织。所有受试者均签署知情同意书,且获得西南医科大学伦理委员会的同意,所有程序均遵照国内相关法律法规。

1.1.2 主要试剂 V 型胶原酶、X X IV 型胶原酶、牛血清清蛋白、Apamin 均购于 Sigma 公司,Rever Tra Ace q RT-PCR Master Mix 逆转录试剂盒购于 Toyobo 公司,SYBR Green 定量 PCR 试剂盒购于 Qiagen 公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器 低温高速离心机购于 Thermo Fisher 公司,PCR 仪、Real-time PCR 仪购于 Applied Biosystems 公司,全功能酶标仪购于 NanoDrop 公司,凝胶成像系统购于 Bio-Rad 公司。微管电极拉制仪(PC-10, Narishige, 日本)用于拉制玻璃微电极、膜片钳放大器(EPC-10, HEKA, 德国)用于全细胞膜片钳记录。

1.2 实验方法

1.2.1 人心房肌细胞急性酶分离方法 将手术室中快速取回的心房组织置于培养皿中氧饱和的心肌转运液(牛磺酸 10 mmol/L,腺苷 5 mmol/L,硫酸镁 8 mmol/L, HEPES 10 mmol/L,磷酸二氢钾 50 mmol/L,甘露醇 100 mmol/L,葡萄糖 140 mmol/L,用氢氧化钾调 pH 值至 7.4)中清洗并将心房组织剪为约 1 mm³ 的小块,再将组织块置于酶液 I(蛋白酶、

胶原酶和牛血清清蛋白)于 37 °C 水浴中消化约 50 min,再将心房组织转移至酶液 II(胶原酶、清蛋白)中进行消化,随时观察细胞状态,一般约 5~8 min,低倍视野下出现 3~5 个细胞即可终止酶液 II 消化,重复酶液 II 消化 3 次。以上所有过程均保持组织处于持续充氧状态。收集 3 次消化的酶液并离心 5 min (500 r/min),离心后去除上清液加入 KB 液(牛磺酸 10 mmol/L,β-羧基丁酸 10 mmol/L,磷酸二氢钾 10 mmol/L,氯化钾 20 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 10 mmol/L,甘露醇 5 mmol/L,葡萄糖 25 mmol/L,谷氨酸钾 70 mmol/L,清蛋白 1 mg/mL,用氢氧化钾调 pH 值至 7.4)重悬后 4 °C 保存,1 h 后可用于电生理实验^[9]。

1.2.2 全细胞膜片钳技术 倒置相差显微镜下选取呈杆状、横纹清楚、无收缩且贴壁良好的心房肌细胞进行电生理的实验,实验电极选用硬质玻璃且用微管电极拉制仪通过两步法拉制而成,充灌电极后电极阻抗为 2~5 Ω。采用膜片钳放大器(EPC-10, HEKA)记录电流信号,用 Patch Master 软件采集数据,采样频率为 10 kHz,低通滤波频率为 2 kHz。记录 SK 通道电流(I_{SK}),电流保持电位 -60 mV,指令电压从 -130 mV 到 +60 mV, Ramp 刺激时间持续 500 ms。可记录到一内向整流特性的钾电流,在此基础上加入 SK 通道特异性阻断剂 Apamin 后电流明显减小,加药前后相减的电流为 SK 通道电流。记录电流的细胞外液(N 甲基氨基葡萄糖 140 mmol/L,氯化钾 4 mmol/L,氯化镁 1 mmol/L,葡萄糖 5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L,用盐酸调 pH 值至 7.4);电极液(葡萄糖 144 mmol/L,氯化镁 1.55 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 5 mmol/L,用氢氧化钾调至 7.2)。

1.2.3 Western blot 检测心房组织中 SK2 通道蛋白的表达

1.2.3.1 总蛋白的提取 将获取的心房组织剪碎清洗,液氮研磨后加入 RAPI 裂解液(含蛋白酶抑制剂)在冰上裂解 30 min,再用细胞破碎仪处理 2 min。4 °C 12 000 r/min 离心 15 min。用 BCA 法测蛋白浓度后加入 5× Loading Buffer 99 °C 变性 10 min 置于 -20 °C 备用。

1.2.3.2 Western blot 制备分离胶与浓缩胶,待胶凝固后上样、电泳、转膜、封闭。一抗 4 °C 孵育过夜。第二天室温孵育二抗 1 h。再用 TBST 清洗, Bio-RAD 凝胶成像系统显影,采用 Quantity One 软件进行数据分析。

1.2.4 qRT-PCR 检测心房组织中 KCNN2 基因的表达

1.2.4.1 组织 RNA 提取 将获取的心房组织剪碎清洗,加入 Trizol 后用液氮研磨,加入氯仿后涡旋振荡混匀,室温静置 5 min 后离心。离心后取出上层水相并加入异丙醇离心后沉淀 RNA。弃上清液,加入

75%乙醇清洗后挥干,加入 DEPC 水吹打混匀,用全功能酶标仪检测 mRNA 水平。

1.2.4.2 引物的设计 根据 GenBank 中 KCNN2、 β -actin 的引物序列来设计引物,引物序列见表 1。

表 1 KCNN2 及 β -actin 引物序列

Primer 名称	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
KCNN2	正向:GCATCGTGGTCATGGTCATC	123
	反向:TGATCAGACCGAGCAGGATC	
β -actin	正向:ACACTGTGCCATCTACG	153
	反向:TGTCACGCACGATTCC	

1.2.4.3 逆转录获得 cDNA 的第一链 将 RNA 统一标准化为 500 ng/ μ L,用 Toyobo 逆转录试剂盒进行逆转录,取 1 μ L 总 RNA,反应体系为 10 μ L,反应条件为 37 $^{\circ}$ C 15 min,50 $^{\circ}$ C 5 min,98 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4.4 实时荧光定量 PCR 荧光定量采用 SYBR Green(QIAGEN 公司)试剂盒,反应体系为 20 μ L,反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,57 $^{\circ}$ C 退火 10 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s,共 40 个循环。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件对数据进行统计分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病历资料 本研究中 <40 岁组患者 22 例,40~60 岁组患者 34 例和 >60 岁组患者 18 例, <40 岁组的患者中主要以先天性心脏病(简称先心病)为主,而 40~60 岁组和 >60 岁组患者主要以二尖瓣或主动脉瓣病变为主,各组心脏的基础性疾病及用药的差异,见表 2。

表 2 患者资料

患者资料	<40 岁组	40~60 岁组	>60 岁组
例数(n)	22	34	18
性别(男/女)	9/13	18/16	8/10
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	30.2 \pm 2.6	49.4 \pm 3.6	67.6 \pm 6.8
冠心病(n)	0	5	8
先心病(n)	13	2	2
二尖瓣/主动脉瓣病变(n)	4	27	15
冠心病+二尖瓣/主动脉瓣病变(n)	0	2	5
高血压(n)	2	3	6
糖尿病(n)	1	2	5
NYHA 心功能分级(n)			
II	15	24	15
III	3	9	1
IV	0	1	2

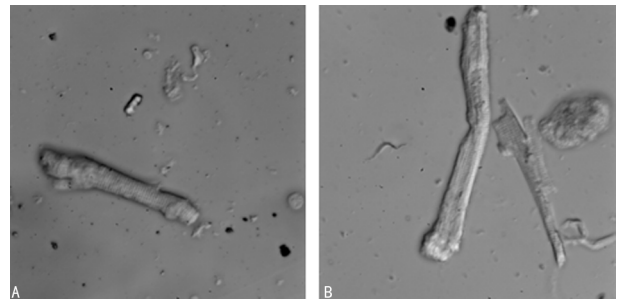
超声心动图

续表 2 患者资料

患者资料	<40 岁组	40~60 岁组	>60 岁组
射血分数($\bar{x} \pm s$,%)	64.1 \pm 4.5	56.2 \pm 3.5	50.2 \pm 4.2
左房直径($\bar{x} \pm s$,mm)	40.3 \pm 4.6	43.0 \pm 3.5	48.0 \pm 5.3
室间隔厚度($\bar{x} \pm s$,mm)	9.3 \pm 1.2	10.2 \pm 1.5	10.8 \pm 2.4
左室后壁厚度($\bar{x} \pm s$,mm)	9.1 \pm 1.1	10.1 \pm 1.3	10.7 \pm 2.6
用药(n)			
地高辛	0	1	2
ACE 抑制剂/ARBs	2	4	7
β 受体阻断剂	0	1	4
利尿剂	7	21	15
降脂药	0	4	10

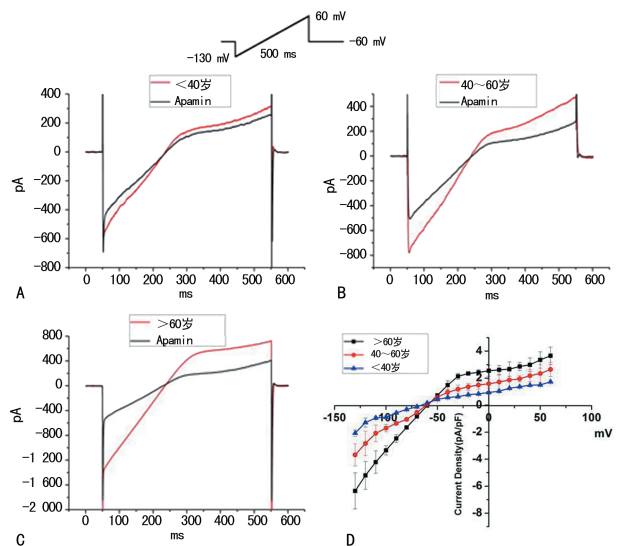
相同年龄段患者心房组织存在共用情况,故导致不同实验中例数不完全一致

2.2 急性酶分离的心肌细胞 两步酶法分离出的人心房肌细胞在显微镜下呈杆状,细胞膜光滑,折光性好,横纹清楚,不收缩,活性好(图 1A);细胞表面光滑平整或有一处多处小凹陷(图 1B),但并不影响封接破膜,均适宜做下一步的膜片钳实验。



A:横纹清晰的人心房肌细胞;B:细胞有凹陷的人心房肌细胞

图 1 急性分离的人心房肌细胞($\times 400$)



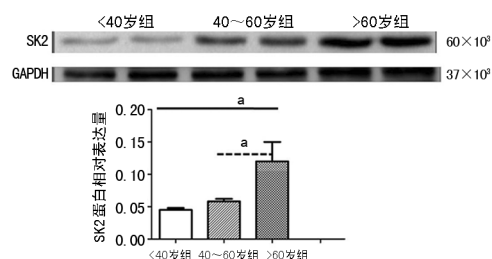
A: <40 岁组加入 Apamin 前后电流原始记录图;B:40~60 岁组加入 Apamin 前后电流原始记录图;C: >60 岁组加入 Apamin 前后电流原始记录图;D:各组电流密度-电压关系曲线(I~V 曲线);加药前后电流相减即为 SK2 通道电流

图 2 不同年龄组 SK2 通道电流的变化

2.3 老年患者心房肌细胞 SK2 通道电流的变化 记

录 SK2 通道电流的电极内液的游离钙离子浓度为 5×10^{-7} mol/L, 保证 SK 通道的充分激活。 < 40 岁组 ($n=16$ 个细胞, 来自 8 例患者心房) 与 40~60 岁组 ($n=20$ 个细胞, 来自 8 例患者心房) 比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), < 40 岁组与 > 60 岁组 ($n=18$ 个细胞, 来自 10 例患者心房) 比较, 在多个膜电位水平 (电压从 -130 mV 到 -80 mV、+50 mV 到 +60 mV) 电流幅度明显增加 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。 40~60 岁组 ($n=20$) 与 > 60 岁组 ($n=18$) 比较, 在多个膜电位水平 (电压从 -130 mV 到 -80 mV、+50 mV 到 +60 mV) 电流幅度均明显增加 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。 见图 2。

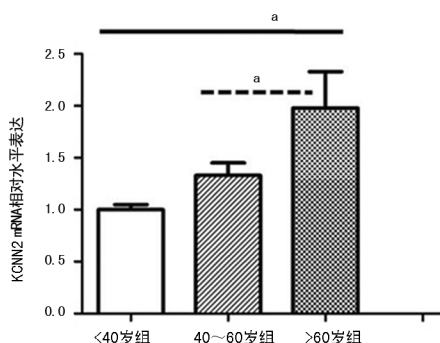
2.4 人心房组织 SK2 蛋白的表达 与 < 40 岁组 ($n=12$) 比较, 40~60 岁组 ($n=18$) 和 > 60 岁组 ($n=10$) SK2 通道蛋白的表达均有所增加, 但只有与 > 60 岁组比较蛋白表达差异有统计学意义 ($P<0.05$); 40~60 岁组 ($n=18$) 与 > 60 岁组 ($n=10$) 比较差异也有统计学意义 ($P<0.05$)。 见图 3。



a: $P<0.05$

图 3 不同年龄组 SK2 通道蛋白表达的变化

2.5 荧光定量 PCR 检测心房组织 KCNN2 基因的表达变化 荧光定量 PCR 结果显示, 与 < 40 岁组 ($n=12$) 比较 40~60 岁组 ($n=18$) 和 > 60 岁组 ($n=10$) KCNN2 基因表达均有所增加, 但只有 > 60 岁组 KCNN2 基因表达上调差异有统计学意义 ($P<0.05$); 40~60 岁组 ($n=18$) 和 > 60 岁组 ($n=10$) 比较 KCNN2 基因表达差异也有统计学意义 ($P<0.05$)。 见图 4。



a: $P<0.05$

图 4 不同年龄组 KCNN2 mRNA 表达的变化

3 讨论

AF 是临床最为常见的心律失常, 心房电重构和结构重构是 AF 发生和维持的重要病理基础。这些

异常是由不同的病理生理学机制引起的, 而 AF 发生的机制至今还未清楚。流行病学资料显示 AF 的发生与患者的年龄密切相关, 老龄很有可能是易于导致 AF 的重要原因, 研究老龄患者的心房电重构, 对临床上指导老龄患者用药具有重要的参考价值。统计资料显示, 因心律失常住院的患者中, 约 1/3 的人是因为 AF。对大多数人来说, 40 岁以后发生 AF 的风险接近 25%^[10], 而且随着年龄的增加风险指数也随之增加。尽管 AF 没有带来毁灭性的伤害, 但是它会大大降低人们的生活质量及增加脑卒中的风险^[11-13]。多种临床危险因素如高龄、高血压、糖尿病、吸烟、心衰、肥胖等, 还有一些心电图和超声心动图的特性变化及一些生物化学的标志蛋白的变化都与发生 AF 风险增加有关。而在 2014 年美国心脏协会心 AF 治疗指南中, 将高龄列为 AF 发生的第一危险因素^[14]。有研究表明, 在 < 60 岁的受试者中, AF 的发生率男性为 0.78%、女性为 0.76%。而在 ≥ 60 岁的受试者中, 男性、女性 AF 的发生率均增加为 1.83%^[15]。

小电导钙激活钾通道是一类对细胞内游离钙离子敏感而对膜电位不敏感的钾通道^[16]。2007 年 OZGEN 等^[17] 发现快速电刺激可导致 SK 通道蛋白从细胞内向膜上转运导致心肌复极加速, 第一次提出 SK 参与心房电重构。2009 年 LI 等^[18] 研究发现, SK2 基因敲除小鼠易发生 AF, 但却没有出现室性心律失常。2010 年 DINESS 等^[19] 在乙酰胆碱结合电刺激诱发的 AF 模型上发现, AF 发生后给予 SK 通道的阻滞剂可预防和终止 AF 的发生, 且对心房具有明显的靶向性。这些研究表明, SK 通道在 AF 的发生中发挥重要作用, 小电导钙激活钾通道是新近发现在心脏中发挥重要功能作用的一类钾通道。近年来, 越来越多的人关注这类通道, 因为它可能作为心房特异性选择的靶点。所以抑制 SK 通道的表达可能作为 AF 治疗的新靶点^[10]。

本研究结果表明, 在急性酶分离的细胞中记录到 Apamin 敏感的 SK2 电流。老年患者心房的 SK2 通道电流明显增加, 并伴随着基因和蛋白的表达同时上调, 表明随着年龄的增加, SK2 通道的功能明显增强。从而为增龄与 AF 发生间的相关性提供了新的依据。随着年龄的增加, 心房 SK2 通道表达增加, 可能是引起 AF 发生存在的底物, 其具体的机制还有待进一步的探索。本研究未选取动物模型作为实验对象, 而是直接选取临床上 3 个年龄阶段 (< 40 岁、40~60 岁和 > 60 岁) 窦性心律患者的心房组织, 更具有临床指导意义。为探究高龄与 AF 间关系的机制提供新的思路, 为 AF 的治疗和预防提供新的方向。

参考文献

[1] CHUGH S S, HAVMOELLER R, NARAYANAN K, et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation a global

- burden of disease 2010 study[J]. *Circulation*, 2014, 129(8):837-847.
- [2] 周自强,胡大一,陈捷,等.中国心房颤动现状的流行病学研究[J].*中华内科杂志*,2004,43(7):491-494.
- [3] NATTEL S. Calcium-activated Potassium current:a novel ion Channel candidate in atrial fibrillation[J]. *J Physiol (London)*,2009,587(7):1385-1386.
- [4] QI X Y, DINESS J G, BRUNDEL B J, et al. Role of small-conductance calcium-activated Potassium channels in atrial electrophysiology and fibrillation in the dog[J]. *Circulation*,2014,129(4):430-440.
- [5] YU T, DENG C Y, WU R B et al. Decreased expression of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels SK1 and SK2 in human chronic atrial fibrillation [J]. *Life Sci*, 2012,90(5/6):219-227.
- [6] SKIBSBY L, POULET C, DINESE J G, et al. Small-conductance calcium-activated Potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atrial [J]. *Cardiovasc Res*,2014,103(1):156-167.
- [7] NATTEL S, DOBREV D. Electrophysiological and molecular mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation[J]. *Nat Rev Cardiol*,2016,13(10):575-590.
- [8] 李妙龄,李涛,雷明,等.持续性心房颤动患者心房肌细胞小电导钙激活钾通道电流的增强[J].*中华心血管病杂志*,2011,39(2):147-151.
- [9] 王笑宇,范忠才,周伟,等.人心房肌细胞分离方法的改良研究[J].*重庆医学*,2017,46(14):1941-1943,1946.
- [10] DINESS J G, SKIBSBY L, SIMO-VICENS R, et al. Role of calcium activated potassium channels in AF pathophysiology and therapy[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*,2015,66(5):441-448.
- [11] SCHNABEL R B, YIN X Y, GONA P, et al. 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study[J]. *Lancet*,2015,386(9989):154-162.
- [12] European Heart Rhythm Association; European Association for Cardio-Thoracic Surgery, CAMM A J, KIRCHHOF P, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation; the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. *Eur Heart J*, 2010,31(19):2369-2429.
- [13] LLOYD-JONES D M, WANG T J, LEIP E P, et al. Lifetime risk for development of atrial fibrillation-the framingham heart study[J]. *Circulation*,2004,110(9):1042-1046.
- [14] JANUARY C T, WANN L S, ALPERT J S, et al. 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary; a report of the American college of cardiology/American heart association task force on practice guidelines and the heart rhythm society [J]. *Circulation*, 2014, 130(23):2071-2140.
- [15] LI Y, WU Y F, CHEN K P, et al. Prevalence of atrial fibrillation in China and its risk factors[J]. *Biomed Environ Sci*,2013,26(9):709-716.
- [16] 张薇薇,杨新春,刘泰熹.小电导钙激活钾通道分子结构及其电生理特性[J].*中国心脏起搏与心电生理杂志*,2007,21(1):75-78.
- [17] OZGEN N, DUN WEN, SOSUNOV E A, et al. Early electrical remodeling in rabbit pulmonary vein results from trafficking of intracellular SK2 channels to membrane sites[J]. *Cardiovasc Res*,2007,75(4):758-769.
- [18] LI N, TIMOFEYEV V, TUTEJA D, et al. Ablation of a Ca^{2+} -activated K^{+} Channel (SK2 Channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation[J]. *J Physiol (London)*, 2009, 587(5):1087-1100.
- [19] DINESS J G, SORENSEN U S, NISSEN J D, et al. Inhibition of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels terminates and protects against atrial fibrillation[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*,2010,3(4):380-390.

(收稿日期:2018-03-18 修回日期:2018-07-16)

(上接第 4217 页)

- urinary system and male genital organs[M]. France: Iarc Press,2016:16-17.
- [6] BEKTAS S, BAHADIR B, KANDEMIR N O, et al. Intraobserver and interobserver variability of Fuhrman and modified Fuhrman grading systems for conventional renal cell carcinoma[J]. *Kaohsiung J Med Sci*,2009,25(11):596-600.
- [7] LANG H, LINDNER V, DE FROMONT M, et al. Multi-center determination of optimal interobserver agreement using the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma[J]. *Assessment of 241 patients with >15-year follow up*. *Cancer*,2005,103(3):625-629.
- [8] LANIGAN D, CONROY R, BARRY-WALSH C, et al. A comparative analysis of grading systems in renal adenocarcinoma[J]. *Histopathology*,1994,24(5):473-476.
- [9] BRETHERAU D, LECHEVALLIER E, DE FROMONT M, et al. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma[J]. *Cancer*,1995,76(12):2543-2549.
- [10] HONG SK, JEONG CW, PARK JH, et al. Application of simplified Fuhrman grading system in clear-cell renal cell carcinoma[J]. *BJU Int*,2011,107(3):409-415.
- [11] SMITH ZL, PIETZAK EJ, MEISE CK, et al. Simplification of the Fuhrman grading system for renal cell carcinoma[J]. *Can J Urol*,2015,22(6):8069-8073.
- [12] FICARRA V, MARTIGNONI G, MAFFEI N, et al. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system; a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma[J]. *Cancer*, 2005, 103(1):68-75.
- [13] LOPEZ J I. Gleason and fuhrman no longer make the grade[J]. *Histopathology*,2016,69(2):340-341.

(收稿日期:2018-03-18 修回日期:2018-05-10)