Synaptobrevin-2促进心房肌SK2通道转运的机制研究

李涛, 范学慧, 余奕言, 陈琳琳, 黄文俊, 杨艳, 曹济民, 曾晓荣*, 谭晓秋*

西南医科大学心血管医学研究所, 医学电生理学教育部重点实验室, 四川省心血管疾病预防协同创新中心, 泸州 646000

* 联系人, E-mail: tanxiaoqiu@swmu.edu.cn; lyxjd7151@163.com

收稿日期: 2017-05-18; 接受日期: 2017-06-19; 网络版发表日期: 2018-01-11

国家自然科学基金(批准号: 30870903, 31300948, 81670130, 81670313)和四川省科技支撑计划(批准号: 2011FZ0106)资助

摘要 小电导钙激活钾通道亚型2 (SK2通道) 主要在心房表达, 与心房颤动有关. 高频刺激模拟心房快速起搏可以增加SK2电流, 但是其中的机制并不完全清楚. 本研究旨在研究转运调节蛋白Synaptobrevin-2 (VAMP2) 在调节心房肌细胞膜SK2通道转运过程中的作用. 以培养的新生大鼠(*Rattus norvegicus*)心房肌细胞(NRAMs)和表达有SK2通道的HEK293细胞为研究对象, 采用蛋白质印迹、膜片钳、共聚焦显微成像、流式细胞术和全内荧光反射等技术研究VAMP2对SK2通道转运的影响. 结果发现, 快速起搏可上调VAMP2蛋白和增加SK2通道蛋白在细胞膜上的表达, 而敲低VAMP2可降低NRAMs细胞膜上SK2通道蛋白的表达. 在HEK293细胞上共表达VAMP2和SK2, 增加了SK2的表达, 加速了SK2向细胞膜的转运, 并通过抑制SK2内吞来稳定SK2通道蛋白在细胞膜上表达. 由以上结果可知, VAMP2可能通过促进SK2通道的表达, 转运和稳定细胞膜上的表达, 参与快速起搏心房肌细胞SK2功能的增强.

关键词 SK2通道, VAMP2, SNAREs, 转运, 心律失常

小电导Ca²⁺激活钾通道(SK2通道)在各种组织中广泛表达, 因其整合了胞内Ca²⁺和膜电位的变化, 在细胞功能调节中起重要作用^[1]. 直到2003年, Xu等人^[2]和Skibbye等人^[3]首先确定在人和小鼠(*Mus musculus*)心房肌细胞中表达有SK2通道并证实SK通道参与调节心房动作电位的复极化过程. 因SK2通道在心房肌表达明显高于心室, 所以针对该通道的调控可能成为治疗房性心律失常(包括房颤)的潜在靶点^[4-6]. 既往研究表明, SK通道的过表达或敲除均可导致房性心律失常(包括房颤)的发生^[7,8]. 因此, SK通道表达的平衡和精

确调节对于保持正常的心房电生理特性和抑制房性心律失常尤为重要^[9]. Qi等人^[10]研究报道SK2通道在房颤(AF)中明显上调. 此外, Ozgen等人^[11]发现, 心房快速起搏可以加速SK2通道蛋白从细胞质向细胞膜的转运. 然而, 潜在的机制仍然未知. Chiamvimonvat课题组^[12,13]发现, α -肌动蛋白2等细胞骨架蛋白促进了SK2通道蛋白向细胞膜的转运, 增加了SK2的细胞膜水平, 提示SK2通道蛋白转运受到多种因素的调控和影响.

膜通道蛋白的精确定位对于通道功能是必需的. 囊泡运输是离子通道蛋白质最终定位到细胞

引用格式: 李涛, 范学慧, 余奕言, 等. Synaptobrevin-2促进心房肌SK2通道转运的机制研究. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 84-92, doi: [10.1360/N052017-00209](https://doi.org/10.1360/N052017-00209)
英文版见: Li T, Fan X H, Yu Y Y, et al. Synaptobrevin-2 facilitates the trafficking and function of atrial SK2 channel. Sci China Life Sci, 2018, doi: [10.1007/s11427-017-9139-7](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9139-7)

膜的主要途径. 可溶性*N*-乙基马来酰亚胺敏感因子(*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF)附着蛋白受体复合物(soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors, SNAREs)在囊泡融合与转运中发挥重要作用^[14,15]. 研究发现, 众多SNAREs蛋白在心肌细胞和其他组织中表达, 并调节钾通道的转运, 如ATP敏感K⁺通道(K_{ATP})^[16]. Synaptobrevin-2, 也称为囊泡相关转运蛋白2 (vesicle associated membrane protein 2, VAMP2), 是SNAREs家族的重要成分, 通过单跨膜结构域锚定在囊泡膜中, 并在囊泡运输和融合中起重要作用. Ferlito等人^[17]报道, VAMP2在心房组织中广泛表达, 并调节心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)的分泌. 然而VAMP2是否参与了SK2的转运仍不清楚. 因此, 本文采用新生大鼠(*Rattus norvegicus*)心房肌细胞(NRAMs)和HEK293细胞(表达VAMP2和/或SK2的HEK293细胞)为对象, 研究了VAMP2对SK2通道表达和转运的影响.

1 材料与方法

1.1 NRAMs培养

从新生大鼠(1~2天龄, 取自西南医科大学动物中心)解剖心脏, 通过常规酶离心房肌细胞, 并用于原代心房肌细胞培养. 使用细胞刺激器(6孔培养皿电极系统, Ionoptix, 美国)将NRAMs在6孔板中培养48 h, 然后以15 V和10 Hz的脉冲连续起搏24 h, 以建立细胞水平的快速起搏模型.

1.2 质粒构建

在本实验室已构建含有人类心房SK2通道 α 亚基的表达质粒pIRES-GFP-SK2的基础上^[18], 使用pIRES-GFP-SK2质粒作为模板, 使用重叠PCR方案^[19]并将Flag标签(DYKDDDDK)插入到S1和S2片段(AY-DKADYKDDDDKSLYS)之间的细胞外环中, 并连接到质粒pEGFP-N3上, 构建融合表达质粒pEGFP-Flag-SK2(缩写为Flag-SK2-GFP). 本课题组已经证实, Flag和GFP标签不影响SK2通道的电生理特性和膜表达. 在VAMP2的N-末端和C末端分别含有HA标签和DsRed标签的表达质粒pGV316-VAMP2购自上海吉凯生物公司.

1.3 HEK293细胞培养和转染

人胚胎肾293 (HEK293)细胞购自ATCC公司(美国), 并在含有10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的Dulbecco's Modified Eagle培养基(DMEM), 5% CO₂培养箱中进行培养. 使用Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 美国)按照使用说明书瞬时转染具有或不具有pGV316-VAMP2的Flag-SK2-GFP的质粒.

1.4 RNA干扰

大鼠VAMP2基因的shRNA干扰质粒购自上海吉凯公司. NRAMs培养密度为80%~90%, 然后根据说明书用慢病毒包装shRNA进行感染. 细胞在感染后48~72 h用于实验. 通过蛋白质印迹(Western blot)检测VAMP2敲低水平.

1.5 电生理学记录

使用EPC-10膜片钳放大器系统(HEKA, 德国)在全细胞构型下记录SK2电流. 电极液含有(mmol/L): K-天冬氨酸(K-Asp) 100, KCl 40, NaCl 5, MgCl₂ 5, HEPES 10, 使用KOH将pH调至7.2左右. 浴液含有(mmol/L): NaCl 5, KCl 140, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, HEPES 10, 使用KOH将pH调至7.4左右. 根据之前的研究计算电极液中的游离Ca²⁺浓度([Ca²⁺]_i)^[20]. 所有记录在室温(23°C±2°C)下进行.

1.6 生物素化法分离细胞膜蛋白

使用细胞膜蛋白分离试剂盒(Pierce公司, 美国), 按照说明书和以前报道的研究方案进行细胞膜蛋白的分离^[19]. 简言之, 将NRAMs和转染的HEK293细胞与含有Sulfo-NHS-SS-Biotin的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)中在冰上孵育30 min, 然后将生物素化反应淬灭. 收集细胞并用NeutrAvidin琼脂糖珠子纯化. 使用2×SDS-PAGE样品缓冲液洗脱结合在珠子的膜蛋白, 并通过Western blot进行分析.

1.7 蛋白质印迹

Western blot实验根据以前的研究进行^[19]. 将50 μ g总蛋白用SDS-PAGE分离, 并转移到PVDF膜中, 然后与抗SK2 (1:1000, Alomone, 以色列), 抗VAMP2 (1:1000, SYSY, 德国), 抗Na⁺-K⁺ ATP酶 β 1亚基(1:1000, Abcam,

英国)或抗GAPDH (1:20000, Sigma, 美国)在4℃下孵育过夜. 然后将PVDF膜与辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000, MBL, 日本)在室温下孵育1 h, 加入化学发光显影液(Engreen Biosystem Co Ltd., 北京), 使用Quantity One软件(Bio-Rad, 美国)进行图像收集并分析.

1.8 免疫共沉淀

免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, co-IP)实验用于研究共表达Flag-SK2-GFP和pGV316-HA-VAMP2的HEK293细胞中SK2和VAMP2之间的相互作用. 实验使用Protein A/G PLUS琼脂糖免疫沉淀试剂(Santa Cruz, 美国)进行. 裂解缓冲液为: 50 mmol/L Tris-Cl (pH7.4), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 0.5%脱氧胆酸钠和蛋白酶抑制剂. 将1 μg的一抗(抗Flag或抗HA)加入到样品中, 并在4℃下孵育2 h. 然后, 将复合物与A/G琼脂糖珠子4℃孵育过夜. 混合物用冷PBS洗涤3次, 最后加入2×SDS样品缓冲液, 在95℃加热5 min, 离心获得上清液. 然后通过Western blot进行分析.

1.9 细胞免疫荧光

用4%多聚甲醛固定培养在盖玻片(直径13 mm)上的NRAMs或表达Flag-SK2-GFP的HEK293细胞15 min, 然后用5% BSA封闭1 h. 是否使用0.1% Triton-X100取决于检测蛋白质的位置. 为了标记细胞膜的SK2通道, 不进行Triton-X100处理, 标记整个细胞的SK2通道时使用Triton-X100处理15 min. 封闭后, 将细胞与小鼠抗Flag一抗(1:1000, Sigma)用于标记在HEK293细胞中表达的SK2通道或使用兔抗SK2一抗(1:500, Alomone)用于NRAMs的SK2通道检测. 洗涤后, 在HEK293细胞中的SK2通道上用DyLight 550标记的驴抗小鼠二抗(1:200, Abcam), 或用DyLight®488标记的驴抗兔二抗(1:200, Abcam)用于标记NRAMs中的SK2通道, 在室温下孵育1 h. 罗丹明标记的鬼笔环肽(Cytoskeleton, 美国)用于标记NRAMs中的F-actin. 使用激光共聚焦扫描显微镜(Olympus, 日本)进行细胞免疫荧光标记的检测.

1.10 流式细胞术

进一步使用表达Flag-SK2-GFP的HEK293细胞系结合流式细胞术(flow cytometry, FCM)来研究SK2通道蛋白向细胞膜的转运^[19]. 平均荧光强度(median fluorescent intensity, MFI)用公式 $MFI = (FI_{\text{sample}} - FI_{\text{negative}}) / FI_{\text{negative}}$

计算, 其中 FI_{sample} 是样品的荧光强度, FI_{negative} 是不表达Flag-SK2-GFP但与APC偶联的抗Flag抗体孵育的细胞荧光强度, MFI_{Flag} 代表细胞膜上SK2的表达水平, MFI_{GFP} 是全细胞中SK2的表达水平. $MFI_{\text{Flag}}/MFI_{\text{GFP}}$ 的比例是细胞膜SK2通道与总蛋白的比例, 用于评估SK2通道的运输过程.

1.11 全内反射荧光系统

全内反射荧光(total internal reflection fluorescence, TIRF)系统(Nikon, 日本)用于研究NRAMs细胞膜SK2通道蛋白的表达. 简言之, NRAMs中的SK2通道用DyLight® 488荧光抗体(Abcam)进行标记, F-actin用罗丹明鬼笔环肽(cytoskeleton)标记, 方法与细胞免疫荧光相似.

1.12 统计分析

数据采用 $\bar{x} \pm SE$ 表示, 使用*t*检验用于统计学分析. $P < 0.05$ 的值被认为差异具有统计学意义.

2 结果

2.1 在HEK293细胞中表达的Flag-SK2-GFP的基本性质

为了研究SK2通道蛋白的转运和细胞膜表达, 构建了在细胞外S1-S2环中具有Flag标签, 在C-末端具有EGFP标签的SK2质粒(Flag-SK2-GFP). 在HEK293细胞中的Flag-SK2-GFP的表达和基本性质如图1所示. 图1A显示了Flag-SK2-GFP的结构示意图, 包括细胞外S1-S2环中的Flag标签和细胞内C末端的EGFP标签. 使用膜蛋白提取结合Western blot验证了HEK293细胞和NRAMs细胞膜SK2通道的表达(图1B). 在HEK293细胞中表达的SK2通道的分子量因其与Flag和GFP标签融合, 大于在NRAMs上SK2通道的分子量(图1B). 在全细胞构型下用斜坡方案记录到得SK2宏观电流, 显示呈现内向整流特性(图1C). 共聚焦显微镜显示, 未经Triton-X100处理的抗Flag抗体仅检测到SK2通道在细胞膜的表达(图1D, 第一行). 在经Triton-X100膜透化处理后, 抗Flag抗体可以进入细胞, 因此显示总的SK2通道(胞膜和细胞内)的表达, 显示Flag可与GFP的共定位(图1D, 第二行). 因此, Flag标签在没有膜透化的情况下可以很好地显示细胞膜上SK2的表达, Flag-SK2-GFP

图 1 HEK293细胞中表达的Flag-SK2-GFP的基本性质

A: 标记有Flag和GFP的SK2通道(Flag-SK2-GFP) α 亚基的结构示意图; B: 在HEK293细胞上、NRAMs和人心房组织中表达的SK2通道的Western blot印迹图; C: 在全细胞构型下, 具有-150 mV至+60 mV的斜坡刺激方案记录SK2通道宏观电流; D: 激光共聚焦显微成像显示转染的SK2通道 α 亚基(Flag-SK2-GFP)在HEK293细胞中的亚细胞定位. 在细胞膜没有打孔(P(-))时, 用红色标记的Flag抗体, 表示SK2在细胞膜上的表达, 而细胞膜经过打孔处理后(P(+)), 红色标记的Flag抗体与表示整体SK2通道表达的GFP(绿色)共定位. 标尺: 10 μ m

可作为是研究SK2通道转运的有效工具.

2.2 快速起搏增加 VAMP2 和 SK2 的表达并促进SK2通道向细胞膜的转运

首先研究了快速起搏对NRAMs中SK2通道蛋白表达和转运的影响, 如图2所示. 快速起搏上调NRAMs细胞膜的SK2蛋白和VAMP2总蛋白的表达(图2A). 作为用于膜蛋白研究有力工具的TIRF分析显示快速起搏加速了SK2通道蛋白向细胞膜的运输(图2B). 共聚焦显微镜显示, 没有快速起搏的NRAMs, SK2蛋白主要位于NRAMs的细胞质中, 而快速起搏增加了细胞膜的SK2水平(图2C和D). 有趣的是, 快速起搏增加了SK2通道蛋白与NRAMs中的F-肌动蛋白共定位(图2D).

2.3 VAMP2上调SK2通道的表达和电流

进一步使用VAMP2基因的RNA干扰研究其对NRAMs中SK2蛋白表达的影响. 如图3A所示, 使用特异性的shRNA敲低VAMP2下调了NRAMs中SK2蛋白在细胞膜的表达. Co-IP实验验证在HEK293细胞中

共表达的VAMP2和SK2蛋白之间存在相互作用(图3B). 此外, 本课题组进一步研究了VAMP2对SK2表达和电流的影响. 共表达VAMP2与SK2明显增加SK2通道在细胞膜上的表达(图3C)和电流(图3D和E) ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, $n = 5$).

2.4 VAMP2促进了SK2通道蛋白向细胞膜的转运

使用FCM进一步研究了VAMP2是否影响SK2通道从细胞质到细胞膜的运输过程. 图4A~C显示的是FCM的原始记录图, 显示了SK2通道的亚细胞表达水平. 首先分析了所有选择的细胞(图4A中的红色区域)中GFP阳性细胞的百分比, 其代表SK2通道的总体表达水平. 结果显示, VAMP2增加GFP阳性细胞的百分比(图4D), 表明VAMP2增加了HEK293细胞中SK2通道的表达. 此外, 在GFP阳性细胞中, VAMP2增加了Flag阳性细胞的百分比(图4D), 表明在HEK293细胞中, VAMP2升高SK2通道的膜蛋白水平. VAMP2还增加了GFP阳性细胞中的MFI_{Flag}/MFI_{GFP}比例(图4E), 这进一步表明VAMP2加速SK2通道蛋白向细胞膜的转运.

图2 快速起搏对NRAMs中的SK2通道蛋白表达和分布的影响

A: Western blot分析SK2和VAMP2蛋白在快速起搏NRCMs中的表达. 从 Na^+/K^+ ATP酶β1亚基(NKA-β1)作为膜蛋白的内参. GAPDH作为总蛋白的内参. 统计学结果表明, SK2和VAMP2在快速起搏的NRAMs中明显上调; B: TIRF分析快速起搏的NRAMs中细胞膜SK2表达和分布. 标尺: 20 μm; C: 共聚焦图像显示快速起搏的NRAMs中SK2表达与分布. 标尺: 30 μm. 在图B和C中, SK2蛋白标记为绿色, F-actin为红色. 用DAPI (蓝色)染色细胞核; D: F-actin和SK2的荧光强度对应于在图C右栏中用白线标记的区域. 与对照组相比, *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

2.5 VAMP2通过抑制内吞来稳定SK2通道蛋白在细胞膜上的表达

通道需停留在细胞膜上才能发挥其作用. 因此, 进一步使用FCM研究了VAMP2对表达在HEK293细胞中的SK2蛋白内吞过程的影响(图5). 图5A显示了FCM检测SK2通道内吞过程的实验方案. 与对照组(与对照质粒GV316共转染)相比, VAMP2的共表达抑制了细胞膜SK2通道蛋白的内吞, 内吞循环的半数时

间($T_{1/2}$)从对照组19.73 min增加到在VAMP2共表达的30.29 min (图5B). 统计显示, VAMP2在60 min后增加剩余在细胞膜上的SK2蛋白($P < 0.01$) (图5C). 这些结果表明, VAMP2通过抑制细胞膜上SK2通道的内吞来稳定其在细胞膜上的表达.

3 讨论

离子通道的功能很大程度上依赖于细胞膜中的

图3 VAMP2对NRAMs和HEK293细胞中SK2通道表达和电流的影响

A: Western blot显示特异的shRNA敲低VAMP2可降低SK2通道在细胞膜上的表达; B: Co-IP分析显示, 在HEK293细胞中表达的SK2 (Flag和GFP标记)和VAMP2 (HA和DsRed标记)之间存在相互作用。 “No Ab”表示琼脂糖没有使用一抗进行孵育; C: Western blot显示VAMP2与SK2的共表达增加了表达在HEK293细胞中的SK2通道膜蛋白; D: 与SK2和VAMP2共表达的HEK293细胞的SK2通道电流; E: SK2电流的I-V曲线 ($n=5$)。 VAMP2共表达增加了多个电压下的SK2电流。 与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$

通道表达数。离子通道在细胞膜上的数量由通道蛋白质转运过程决定,其中包括从细胞内到细胞膜的通道蛋白质运输,以及在细胞膜上的通道蛋白通过内吞和再循环到细胞膜上发挥其功能。这些过程都被多种蛋白分子所调节^[21,22]。研究发现,许多蛋白分子,包括RabGTP酶和细胞骨架蛋白,可引导囊泡转运和通道蛋白命运^[23-25]。本研究发现,VAMP2 (一种重要的SNAREs蛋白)可以促进心房肌细胞中SK2通道蛋白的转运。

心房和心室中钾通道的差异分布与两种心脏组织的电生理特征密切相关。由于 I_{to} , I_{Kur} , I_{Kr} , I_{K-Ach} 和 I_{SK} 等多个钾通道的分布不均,心房动作电位时程(action potential duration, APD)短于心室^[26]。Xu等人^[2]首先发现SK通道,尤其是SK2通道在心房肌细胞中的表达明

显高于心室肌细胞。SK2通道在心脏表达的差异性提示可能成为房性心律失常(如AF)的潜在治疗靶点。然而,现有报告显示,SK通道的敲除和过表达通过不同的机制均会增加对AF的敏感性^[7,8]。Ozgen等人^[11]研究发现,心房快速起搏加速了SK2通道蛋白的转运。因此,SK2通道的精确调节可能比对通道直接过表达或者敲除更有利于AF的治疗。

本研究发现,SNAREs家族的重要转运调节蛋白VAMP2,在快速起搏的NRAMs中表达上调。结果提示,VAMP2可能参与心房快速起搏中SK2通道的调节。因此,进一步研究了VAMP2对NRAMs及VAMP2和SK2共表达的HEK293细胞中SK2通道表达和转运的影响。在NRAMs中,发现快速起搏增强了SK2和VAMP2的表达(图2A)。快速起搏也促进了SK2蛋白向细胞膜的转

图4 FCM显示VAMP2促进了HEK293细胞中SK2通道蛋白向细胞膜的转运

A: 未转染和共同转染Flag-SK2-EGFP与pGV316-VAMP2 (具有DsRed标签) HEK293细胞的FCM检测原始散点图; B: 在图A的P1区域中表达EGFP和DsRed的细胞分布; C: APC标记的细胞在EGFP和DsRed阳性细胞中区域的分布; D: 统计结果显示VAMP2增加GFP阳性细胞的比例, 也增加了GFP阳性细胞中的Flag阳性细胞的比例; E: 统计结果显示VAMP2增加MFI_{Flag}/MFI_{GFP}比例. 与对照组相比, *: $P < 0.05$

图5 FCM显示VAMP2抑制了HEK293细胞中SK2通道蛋白的内吞过程

A: 检测细胞膜SK2通道内吞过程的模式图; B: 标准化荧光强度-时间(normalized FI-time)曲线显示VAMP2对细胞膜上SK2通道内吞的影响. 曲线通过指数函数拟合, VAMP2将对半数抑制时间($T_{1/2}$)从对照组的19.73到30.29 min; C: 统计数据显示VAMP2增加细胞膜上的SK2通道蛋白水平. 与对照组相比, **: $P < 0.01$, $n=5$

运. 为了验证NRAMs的发现, 进一步使用HEK293细胞来研究VAMP2对SK2通道活性的影响, 结果表明VAMP2可加速SK2蛋白向细胞膜的转运, 通过抑制SK2蛋白的内吞稳定SK2通道在细胞膜上的表达.

有趣的是, 快速起搏促进了SK2蛋白与F-肌动蛋白(F-actin)的共定位(图3), 这表明快速起搏可以通过F-actin加速SK2蛋白向细胞膜的转运. 但是具体机制

有待进一步研究.

总之, 本研究表明, VAMP2促进SK2通道蛋白的运输, 并增加SK2通道电流, 并且快速起搏上调VAMP2, 从而增加SK2通道的功能. 靶向针对VAMP2可能是更有利于精准调节SK2通道功能, 因此可能有益于治疗房性快速性心律失常, 这些发现可能为发现AF治疗靶点提供了潜在的方向.

参考文献

- Adelman J P, Maylie J, Sah P. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. *Annu Rev Physiol*, 2012, 74: 245–269
- Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, et al. Molecular identification and functional roles of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel in human and mouse hearts. *J Biol Chem*, 2003, 278: 49085–49094
- Skibsbjerg L, Poulet C, Diness J G, et al. Small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels contribute to action potential repolarization in human atria. *Cardiovasc Res*, 2014, 103: 156–167
- Nattel S. Calcium-activated potassium current: a novel ion channel candidate in atrial fibrillation. *J Physiol*, 2009, 587: 1385–1386
- Diness J G, Sørensen U S, Nissen J D, et al. Inhibition of small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels terminates and protects against atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010, 3: 380–390
- Skibsbjerg L. Antiarrhythmic principle of SK channel inhibition in atrial fibrillation. *Dan Med J*, 2015, 62: pii: B5112
- 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 Physiol*, 2009, 587: 1087–1100
- Zhang X D, Timofeyev V, Li N, et al. Critical roles of a small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel (SK3) in the repolarization process of atrial myocytes. *Cardiovasc Res*, 2014, 101: 317–325
- Schumacher S M, Martens J R. Ion channel trafficking: a new therapeutic horizon for atrial fibrillation. *Heart Rhythm*, 2010, 7: 1309–1315
- 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. *Circulation*, 2014, 129: 430–440
- Ozgen N, Dun W, Sosunov E A, et al. Early electrical remodeling in rabbit pulmonary vein results from trafficking of intracellular SK2 channels to membrane sites. *Cardiovasc Res*, 2007, 75: 758–769
- Rafizadeh S, Zhang Z, Woltz R L, et al. Functional interaction with filamin A and intracellular Ca^{2+} enhance the surface membrane expression of a small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} (SK2) channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 9989–9994
- Lu L, Timofeyev V, Li N, et al. Alpha-actinin2 cytoskeletal protein is required for the functional membrane localization of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel (SK2 channel). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 18402–18407
- Fang Q, Lindau M. How could SNARE proteins open a fusion pore? *Physiology (Bethesda)*, 2014, 29: 278–285
- Hay J C. SNARE complex structure and function. *Exp Cell Res*, 2001, 271: 10–21
- Pasyk E A, Kang Y, Huang X, et al. Syntaxin-1A binds the nucleotide-binding folds of sulphonylurea receptor 1 to regulate the K_{ATP} channel. *J Biol Chem*, 2004, 279: 4234–4240
- Ferlito M, Fulton W B, Zauher M A, et al. VAMP-1, VAMP-2, and syntaxin-4 regulate ANP release from cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49: 791–800
- 谭晓秋, 陈桂兰, 李涛, 等. 重叠PCR法构建人心房肌SK2(KCNN2)基因表达质粒及鉴定和序列分析. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28: 381–384
- Tan X Q, Cheng X L, Zhang L, et al. Multi-walled carbon nanotubes impair Kv4.2/4.3 channel activities, delay membrane repolarization and induce bradyarrhythmias in the rat. *PLoS ONE*, 2014, 9: e101545
- Tan X, Yang Y, Cheng J, et al. Unique action of sodium tanshinone II-A sulfonate (DS-201) on the Ca^{2+} dependent BK_{Ca} activation in mouse cerebral arterial smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 2011, 656: 27–32
- Balse E, Steele D F, Abriel H, et al. Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes. *Physiol Rev*, 2012, 92: 1317–1358
- Murphy A S, Bandyopadhyay A, Holstein S E, et al. Endocytotic cycling of PM proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56: 221–251

- 23 Delisle B P, Underkofler H A S, Moungey B M, et al. Small GTPase determinants for the Golgi processing and plasmalemmal expression of human ether-a-go-go related (hERG) K⁺ channels. [J Biol Chem](#), 2009, 284: 2844–2853
- 24 McEwen D P, Schumacher S M, Li Q, et al. Rab-GTPase-dependent endocytic recycling of KV1.5 in atrial myocytes. [J Biol Chem](#), 2007, 282: 29612–29620
- 25 Hutagalung A H, Novick P J. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. [Physiol Rev](#), 2011, 91: 119–149
- 26 Schmitt N, Grunnet M, Olesen S P. Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia. [Physiol Rev](#), 2014, 94: 609–653