

# WNK 激酶的研究进展

张 翀 陈 楠\*

(上海交通大学医学院附属瑞金医院肾内科, 上海 200025)

**摘要** WNK 家族是近年来新发现的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 因其激酶结构域第 2 亚单位上缺乏其他激酶所具有的用来结合 ATP 的赖氨酸残基而得名。哺乳动物的 4 种 WNK 激酶都由氨基端结构域, 高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域, 自抑制结构域和至少两个螺旋-螺旋结构域组成。WNK1 基因第一内含子的大片段缺失和 WNK4 螺旋-螺旋结构域一段高度保守区域的错义突变, 可导致 Gordon 综合征, 进一步研究发现 WNK 激酶能调节肾小管多种离子转运蛋白和离子通道, 以维持电解质平衡。它不仅是遗传性高血压 Gordon 综合征的致病基因, 而且可能参与原发性高血压的发病。此外, WNK 激酶还与信号转导, 细胞生长、凋亡和胚胎发育有关。

**关键词** WNK 激酶; Gordon 综合征; 高血压; 离子转运

2000 年, Xu 等<sup>[1]</sup>从大鼠脑 cDNA 文库中筛选 MEK 激酶家族新成员时发现 WNK1, 它是 WNK 家族中第一个被发现的成员。以前发现的几乎所有的蛋白激酶在激酶结构域第 2 亚单位( $\beta 3$  链)都有一个赖氨酸残基, 它参与结合 ATP 及随后的激酶磷酸化作用, 而在 WNK 激酶, 此处高度保守的赖氨酸残基被半胱氨酸残基所替代, 因此得名 With No K kinase(K 为赖氨酸缩写), 取首字母缩略为 WNK<sup>[2]</sup>。进一步研究发现 WNK1 结构域第 1 亚单位( $\beta 2$  链)的赖氨酸残基取代甘氨酸残基, 与 ATP 结合并发挥磷酸化作用, 此位点的氨基酸残基改变将使 WNK 激酶完全丧失激酶活性, 即使将  $\beta 3$  链上的半胱氨酸残基换回赖氨酸残基, 激酶活性也不能恢复。随后 WNK 家族的其他 3 个成员 WNK2、WNK3、WNK4 相继被发现, 它们都具有以上相似的结构和功能特点。由于低等生物如酵母和细菌基因组不含 WNK 激酶, 而几乎只有哺乳动物存在全部的 4 种 WNK 激酶, 所以 WNK 激酶是生物进化过程中较晚出现的、存在于复杂真核生物体的蛋白质<sup>[3]</sup>。

## 1 WNK 激酶的结构

所有哺乳动物的 WNK 激酶都有一个短的氨基端结构域, 高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶结构域, 自抑制结构域和至少两个螺旋-螺旋结构域。WNK 激酶结构域第 1 亚单位( $\beta 2$  链)的赖氨酸残基发挥结合 ATP 和磷酸化的作用。激酶结构域的下游是自抑制结构域, 通过自抑制结构域的自磷酸化, 使 WNK 激酶自身处于低活性状态。如 WNK1 第 378 位丝氨酸

残基的自磷酸化可减低 WNK1 活性达 50%, WNK1 第 382 位丝氨酸残基的自磷酸化可使 WNK1 活性降低至野生型的 1%~3%。WNK 激酶的自抑制结构域除了对自身的抑制作用, 还能对其他种类 WNK 激酶产生交互抑制, 如 WNK1 的自抑制结构域可抑制 WNK4 和 WNK3, WNK4 的自抑制结构域也能抑制 WNK1<sup>[4]</sup>。WNK 激酶的羧基端是两个螺旋-螺旋结构域, 参与与其他蛋白质的结合(图 1)。

WNK1 包括 150 kb 的基因组序列, 由 28 个外显子组成, 有多个转录起始位点, 在不同的组织有不同的转录产物<sup>[5]</sup>。全长的 WNK1 (full-length WNK1, L-WNK1) 有 12 kb, 广泛表达在人的多种组织中, 于心脏和骨骼肌有较高表达。肾内表达占优势的 WNK1 较 L-WNK1 短, 它从第 4 个内含子开始转录, 没有完整的激酶结构域, 称为肾特异的 WNK1 (kidney-specific WNK1, KS-WNK1)。在肾内, KS-WNK1 的表达是 L-WNK1 的大约十倍<sup>[6,7]</sup>, L-WNK1 表达量虽低, 但在肾内广泛表达, 而 KS-WNK1 的表达仅限于远端肾单位。值得一提的是, KS-WNK1 在远端肾单位的表达是不均一的, 在远曲小管处表达最高, 到连接管和皮质集合管处逐渐降低。此外, WNK1 还有一些少见的、可能是组织特异的截短形式, 这些截短形式的 WNK1 的目的和功能尚未搞清。免疫染色

收稿日期: 2008-08-18 接受日期: 2008-09-11

上海市重点学科(No.T0201)和上海市卫生局重点学科基金(No.05 III 001)资助项目

\* 通讯作者。Tel: 021-64370045-665233, E-mail: chen-nan@medmail.com.cn

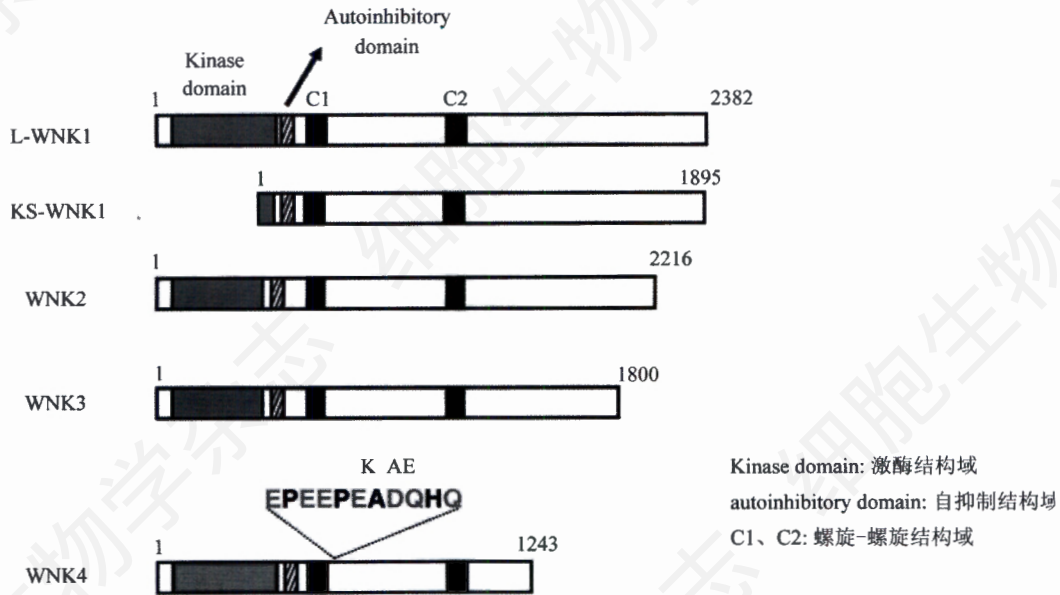


图1 WNK 激酶结构示意图<sup>[12]</sup>

发现 WNK1 在不同组织的定位也有所不同,在肾脏、结肠黏膜上皮和胆囊, WNK1 主要位于细胞质,然而在肝内胆管和胰管 WNK1 主要位于侧边膜<sup>[8]</sup>。

WNK2 由 2 216 个氨基酸残基组成,其基因位于染色体 9q22.31,其组织定位目前还不清楚。

WNK3 的基因组序列长 165 kb,包含 24 个外显子<sup>[9]</sup>,有基于 18 号和 22 号外显子的两个不同转录本。WNK3 的表达量很低, Northern 分析常检测不到,但 RT-PCR 显示在所有组织都有表达,胎儿组织中的表达更为明显。带 18 号外显子的 WNK3 只在脑组织可以检测到。值得注意的是, WNK3 基因位于 X 染色体,和 WNK2 的 9q22.31 位点是同线基因,提示 WNK2 和 WNK3 来源于同一个祖先基因。由于在蠕虫和两翼昆虫 WNK1 是唯一存在的 WNK 激酶,有人甚至推测 WNK2、WNK3、WNK4 来源于共同的祖先基因 WNK1。

WNK4 全长 16 kb,包括 19 个外显子,几乎只在肾脏远端肾单位表达<sup>[10]</sup>。在远曲小管主要表达于细胞间连接处,而在更远端肾单位, WNK4 在细胞质内表达增多。近年来发现, WNK4 在一些肾外组织如血脑屏障、结肠、胰、胆管和附睾的分泌性上皮内都有表达<sup>[11]</sup>。

## 2 WNK 激酶与 Gordon 综合征

肾每天大约过滤 170 L 血浆,其中含 23 mol 盐。过滤的盐份中超过 99.5% 的盐份要被重吸收以维持

盐平衡,这个重吸收是通过沿着肾小管分布的各种离子通道、交换子和转运子来实现的。其中 60% 的钠在近端小管,主要依靠  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  交换重吸收; 30% 在髓袢升支粗段,主要依靠  $\text{Na-K-2Cl}$  共转运子-2 ( $\text{Na-K-2Cl}$  cotransporter-2, NKCC2)重吸收; 7% 通过远曲小管钠氯共转运子(sodium-chloride cotransporter, NCC)重吸收; 2% 通过皮质集合管的上皮细胞钠通道 (epithelial sodium channel, ENaC)重吸收。尽管在远曲小管和皮质集合管重吸收钠的比例较小,由于 ENaC 和 NCC 的活性受 RAS 系统调节,所以远曲小管和皮质集合管部位在盐平衡和血压维持中起重要作用。

1964 年, Paver 等<sup>[13]</sup>第一次报道了一例高血压伴高钾的男性患者, Gordon 等<sup>[14]</sup>于 1988 年报道了它的遗传方式是常染色体显性遗传,并命名为 Gordon 综合征。该病患者血醛固酮水平以正常血钾的标准衡量表现为正常或升高,然而用硫酸聚苯乙烯钠阳离子交换树脂使高血钾纠正后,血醛固酮降至很低的水平,故此病又被命名为假性醛固酮减少症 II 型 (pseudohypoaldosteronism type II, PHA2, 命名 II 型为与另一疾病假性醛固酮减少症 I 型相区别),表现为高血压、高血钾而肾小球滤过率正常的三联征,部分患者还有高氯血症和远端性肾小管酸中毒。2001 年, Wilson 等发现<sup>[10]</sup>, 12 号染色体 WNK1 基因第一内含子的大片段缺失和 17 号染色体 WNK4 基因激酶结构域下游一段高度保守区域的错义突变,可导致 Gordon

综合征。由 WNK1 内含子缺失所导致者命名为 PHA2C, WNK4 错义突变导致者叫做 PHA2B, 此外还有少数患者是由 1 号染色体 q31-q42 区域的突变所致命名为 PHA2A。还有一些家系其基因突变位点分析与 1、2、17 号染色体都不相关, 提示还有第 4 个突变位点<sup>[15]</sup>。故 Gordon 综合征是一种异质性的疾病, 多个基因位点的突变都可以致病。Gordon 综合征的症状与另一种遗传性肾小管疾病 Gitelman 综合征正好相反, 后者已证实是 NCC “失功能性” 缺陷所致, 且 Gordon 综合征对 NCC 抑制剂噻嗪类利尿剂效果较好, 提示 NCC 参与 Gordon 综合征的发病, Gordon 综合征是 NCC “获功能性” 疾病<sup>[16,17]</sup>。随后的研究发现 WNK4 能降低 NCC 在细胞膜表面的表达, 抑制 NCC 功能。在 PHA2B, WNK4 基因错义突变位于激酶结构域下游的编码带电荷氨基酸的高度保守的序列(EPEEPEADQH), 或更下游的螺旋-螺旋结构域。由于致 PHA2B 的 WNK4 突变体抑制 NCC 的作用减弱, 导致 NCC 活性增加而致病; PHA2C 由于基因突变位于 L-WNK1 的内含子, 其引起高血压的机制起初让人困惑。后发现 L-WNK1 的 1 号内含子的片段缺失导致患者外周血白细胞 L-WNK1 的 mRNA 表达增加到 5 倍<sup>[10]</sup>。由于 L-WNK1 能抑制 WNK4 对 NCC 的作用, L-WNK1 的高表达可导致 WNK4 对抑制作用减弱, 亦导致 NCC 活性增加而致病。

### 3 WNK 激酶与离子转运

自从发现 WNK 激酶是 Gordon 综合征的致病基因后, WNK 激酶对肾脏离子转运蛋白、离子通道影响的研究成为热点。现在发现, WNK4 对多种离子通道或转运蛋白都有作用。它可抑制 NCC、肾外髓钾通道(renal outer medullar potassium channel, ROMK)活性, 增加细胞间氯离子流。WNK4 还可使细胞膜上 Na-K-2Cl 共转运子-1(Na-K-2Clcotransporter-1, NKCC1)表达下降抑制 NKCC1 功能, 并减少 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交换; L-WNK1 对 NCC 没有直接影响, 仅在 WNK4 存在的情况下, 能完全阻断 WNK4 对 NCC 的作用。L-WNK1 促进 ENaC 和 NCC 介导的 Na<sup>+</sup> 转运, 前者通过 SGK1, 后者通过阻断 WNK4; 由于 WNK1 和 WNK4 都能抑制 ROMK 活性, 所以它们在抑制钾分泌上有协同作用。KS-WNK1 则能抑制 L-WNK1, 使 WNK4 活化<sup>[18]</sup>; 近来有报道 WNK3 可激活 NKCC2 和 NCC, 而无激酶活性的 WNK3 则对 NKCC2 和 NCC 起抑制作用<sup>[19]</sup>。

### 4 WNK4 与原发性和高血压

有人证实, 野生型 WNK4 基因剔除的转基因动物的血压降低, 血钾也降低, 而致 Gordon 综合征的 WNK4 突变基因剔除的转基因动物的血压和血钾都升高, 有力证明了 WNK 激酶是调节血压和电解质的关键蛋白质<sup>[20]</sup>。原发性高血压作为一种多基因缺陷, WNK 激酶特别是 WNK4 可能是缺陷基因之一。有证据表明第 17 对染色体的特定区域包含能影响血压的基因。有研究发现, 自发性高血压大鼠的一个数量性状遗传位点位于大鼠第 10 对染色体, 对应于人第 17 对染色体, 与高血压有关。人类高血压家系的基因组扫描也发现第 17 对染色体的数量性状遗传位点。Erhlich 等<sup>[21]</sup>在美国黑人高血压患者中发现 8 个 WNK4 的单链核苷酸多态性(SNP), 在美国白人高血压患者中发现 1 个 WNK4 的 SNP (位于 10 号内含子, G → A)。956 例日本高血压或肾衰竭患者的基因扫描发现 3 个新的非同义 SNP, 分别位于 WNK4 的第 7 和 17 号外显子, M546V 和 P556T 位于第 7 号外显子, P1173T 位于第 17 号外显子。然而这些突变位于致 PHA2B 的错义突变的高度保守序列之外, 有这些突变的患者也没有类似于 Gordon 综合征的症状, 所以这些突变的意义还不清楚<sup>[22]</sup>。

由于先天性中风倾向的自发性高血压大鼠 (SHRSP, 有高血压) 和它的前身 Wistar-Kyoto 大鼠 (WKY, 无高血压) 在 WNK4 的编码序列上并无区别, 所以 WNK4 的基因突变并非 SHR 大鼠高血压的原因。这两种大鼠肾内表达 WNK4 的水平也没有差别<sup>[23]</sup>。所以, 目前的研究并不支持 WNK4 是原发性高血压患者普遍存在的致病基因。

### 5. WNK 激酶和信号通路

MAPK 级联反应是多种信号通路如细胞周期、凋亡和细胞增殖的关键步骤。这个途径首先由 MAPK 激酶(MAP3K 或 MEKK)作用于 MAPK 激酶(MAP2K 或 MEK), 后者再磷酸化 MAPK。有人将 WNK1 的 1~555 片段(包含激酶结构域和自抑制结构域)转入 HEK293 细胞, 对 MAPK 途径的活化没有影响。用不包含自抑制结构域的 WNK1 激酶结构域 1~491 片段研究发现它能激活表皮生长因子受体激酶 5 (ERK5)<sup>[24]</sup>。WNK1 1~491 片段与 MEKK2 和 MEKK3 相互作用, 通过特异的 PB1 结构域导致 ERK5 磷酸化和激活, 最终激活 MEK5 激酶<sup>[25]</sup>。用 RNA 干扰下调 WNK1 表达也能抑制 EGF 引起的 ERK5 活化。

可见WNK激酶参与与细胞生长存活有关的信号转导通路, WNK1能与MEKK2和MEKK3相互作用, 是ERK-5 MAP通路的上游激活蛋白。此外还发现WNK家族另一成员WNK2可抑制MEK1/ERK1/2通路, 抑制细胞增殖<sup>[26]</sup>。WNK激酶还可能参与其他的信号通路。有研究发现<sup>[27]</sup>WNK1激酶结构域是蛋白激酶B磷酸化的靶点, WNK1依靠氨基端的SH3结构域与蛋白激酶B相互作用。脯氨酸丙氨酸丰富激酶(SPAK)是另一种丝氨酸苏氨酸激酶, 结构与WNK激酶相似, 在转运上皮广泛表达。这种激酶与数种阳离子/氯离子转运蛋白结合, 被认为是MAPK信号途径的一个支架蛋白。WNK4和WNK1都包含推测的SPAK结合结构域R/K-F-x-V/I, 酵母双杂交实验显示WNK4与SPAK的羧基端相结合。最近有报道, WNK1能激活SPAK/应力反应性激酶(OSR1 kinase), 继之磷酸化NCC, 导致高血压<sup>[28,29]</sup>。这个发现可能有助于最终阐明WNK激酶调控离子转运的机制。

## 6 其他

在远侧肾单位上皮细胞间的紧密连接处, WNK4与紧密连接蛋白ZO-1共定位, 后者是关键的支架蛋白。WNK4和ZO-1相互作用可能需要其他辅助蛋白的参与, 有人推测正是一种或多种的辅助蛋白的变异导致了PHA2A或第四种PHA2。

WNK1基因对正常胚胎发育十分重要, WNK1剔除的纯合子小鼠会宫内死亡。杂合子可以生存, WNK1的RNA表达量会减少50%。值得注意的是这些杂合子的血压会比野生型的低12 mmHg。尽管WNK1表达下降也应可引起伴随NCC表达下降的电介质改变, 但对这些动物的血尿化验却未见异常<sup>[30]</sup>。

## 7 展望

NCC早已作为药物治疗高血压的靶点。噻嗪类利尿剂可能作用于NCC的第4个跨膜结构域的某些氨基酸残基<sup>[31]</sup>, 抑制氯结合导致NCC抑制, 是美国高血压预防、诊断、评价与治疗联合委员会的第七版指南(JNC VII)推荐的治疗高血压的一线药物<sup>[32]</sup>。然而噻嗪类利尿剂的应用可激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性, 导致ENaC的激活而引起继发性钠重吸收增加<sup>[33]</sup>; 而且噻嗪类利尿剂有代谢方面的副作用, 特别是对于糖代谢, 限制了它的长期临床使用<sup>[34]</sup>。以WNK激酶作为靶点, 通过调节NCC表达来直接调

节NCC功能来治疗高血压是一个值得尝试的方向, 然而WNK激酶的功能现在发现越来越广泛, 可能会限制针对WNK的药物的临床使用, 因此WNK激酶是否能作为靶点应用于高血压的治疗还有待进一步研究。

总之, WNK激酶发现的数年来, 关于WNK激酶的研究成为一个热点, 它在调节肾小管上皮细胞电解质转运, 以及细胞信号转导中的作用机制正逐渐得到阐明, 它在高血压发病中的地位以及是否能成为药物治疗靶点还有待于将来研究的进一步深入来找到答案。

## 参考文献(References)

- [1] Xu B *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 16795
- [2] Xu BE *et al.* *Cell Res*, 2005, **15**: 6
- [3] Cope G *et al.* *Pharmacol Ther*, 2005, **106**: 221
- [4] Lenertz LY *et al.* *J Biol Chem*, 2005, **280**: 26751
- [5] Verissimo F *et al.* *Oncogene*, 2001, **20**: 5562
- [6] Delaloy C *et al.* *Mol Cell Biol*, 2003, **23**: 9208
- [7] O'Reilly M *et al.* *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14**: 2447
- [8] Choate KA *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 663
- [9] Holden S *et al.* *Gene*, 2004, **335**: 109
- [10] Wilson FH *et al.* *Science*, 2001, **293**: 1107
- [11] Kahle KT *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 2064
- [12] Gerardo G. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, **288**: F245
- [13] Paver W *et al.* *Med J Aust*, 1964, **2**: 305
- [14] Gordon RD *et al.* *J Hypertens Suppl*, 1988, **6**: S323
- [15] Disse-Nicodeme S *et al.* *Am J Hum Genet*, 2000, **67**: 302
- [16] Gamba G. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, **288**: F245
- [17] Kristopher TK *et al.* *Annu Rev Physiol*, 2008, **70**: 329
- [18] Subramanya AR *et al.* *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, **290**: F619
- [19] Rinehart J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 16777
- [20] Yang CL *et al.* *J Clin Invest*, 2007, **117**: 3403
- [21] Erlich PM *et al.* *Hypertension*, 2003, **41**: 1191
- [22] Kamide K *et al.* 2004, **17**: 446
- [23] Monti J *et al.* *Hypertension*, 2003, **41**: 938
- [24] Xu BE *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 7826
- [25] Nakamura K *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 36989
- [26] Moniz S *et al.* *Oncogene*, 2007, **26**: 6071
- [27] Vitari AC *et al.* *Biochem J*, 2004, **378**: 257
- [28] Richardson C *et al.* *J Cell Sci*, 2008, **121**: 675
- [29] Flatman *et al.* *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, **17**: 186
- [30] Zambrowicz BP *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 14109
- [31] Moreno E *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **276**: 16553
- [32] ALLHAT Officers and Coordinators for the ALLHAT Collaborative Research Group. *JAMA*, 2002, **288**: 2981
- [33] Kahle KT *et al.* *Trends Endocrinol Metab*, 2008, **19**: 91
- [34] Sierra C *et al.* *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2003, **4**: 169

## Progress in WNK Kinases

Zhang Chong, Chen Nan\*

(Department of Nephrology, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** The WNK kinases are a small group of serine/threonine kinases found in recent years, without a catalytic lysine residue in subdomain II which is necessary for other kinases to co-ordinate ATP. All 4 members of WNK kinases in mammals contain a amino-terminal domain, a highly conserved serine/threonine kinase domain, and at least 2 coiled-coil domains. Large deletions within the first intron in WNK1 or missense mutations in a highly conserved domain of coil-coiled domain of WNK4 can cause Gordon's syndrome. Further study discovered WNK kinases can regulate multiple transporters and ion channels on the renal tubular epithelial cell to maintain electrolyte balance. WNKs are not only disease-causing gene of the rare monogenic hypertension syndrome of Gordon's syndrome, but also candidate genes for essential hypertension. Furthermore, WNK kinases also affect signal conduction, cell growth and apoptosis and are essential for normal embryonic development.

**Key words** WNK kinases; Gordon's syndrome; hypertension; ion transport

---

Received: August 18, 2008      Accepted: September 11, 2008

This work was supported by the Shanghai Leading Academic Discipline Project (No.T0201) and the Key Discipline of Health Bureau of Shanghai (No.05III001)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-64370045-665233, E-mail: chen-nan@medmail.com.cn