

# 无赖氨酸激酶4在小鼠气管上皮细胞液体转运中的作用

刘宏飞 侯亚鹏 周祉好 张红蕾 丁炎 聂宏光\*

(中国医科大学基础医学院干细胞与再生医学研究室, 沈阳 110122)

**摘要** 该研究探讨了无赖氨酸激酶4(with no lysine kinase 4, WNK4)对于小鼠气管上皮细胞液体转运中的调节作用。在原代培养的小鼠气管上皮细胞中,应用siRNA特异性沉默*WNK4*基因,半定量PCR和Western blot实验验证沉默效率;随后应用尤斯灌流装置和Western blot实验记录该激酶的低表达对小鼠气管上皮细胞的短路电流及钠离子通道 $\alpha$ -亚基蛋白表达水平的影响。半定量PCR和Western blot结果显示,该研究选用的siRNA序列可以沉默*WNK4*的表达。尤斯灌流和Western blot结果显示,沉默该激酶后,小鼠气管上皮细胞的阿米洛利敏感性电流和钠离子通道 $\alpha$ -亚基蛋白表达明显增加。该研究表明,降低*WNK4*基因表达能增加小鼠气管上皮细胞的上皮钠离子通道 $\alpha$ -亚基蛋白表达,促进钠离子转运,此过程可能参与相关水肿性肺疾患的修复。

**关键词** 无赖氨酸激酶4;小鼠气管上皮细胞;上皮钠离子通道;短路电流

## Role of with No Lysine Kinase 4 in Liquid Transport of Mouse Tracheal Epithelial Cells

Liu Hongfei, Hou Yapeng, Zhou Zhiyu, Zhang Honglei, Ding Yan, Nie Hongguang\*

(Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, China Medical University, Shenyang 110122, China)

**Abstract** The aim of this work was to investigate the regulation of with no lysine kinase 4 (WNK4) on the fluid transport of mouse tracheal epithelial cells. The siRNA-specific silencing of *WNK4* gene was used in primary cultured mouse tracheal epithelial cells, and its silencing efficiency was verified by semi-quantitative PCR and Western blot. Subsequently, the effect of low expression of the kinase on short-circuit current and Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit protein expression in mouse tracheal epithelial cells was recorded by using chamber apparatus and Western blot. Semi-quantitative PCR and Western blot results showed that the siRNA sequence used in this study could silence the expression of *WNK4*. Using chamber apparatus and Western blot showed that the expression of amiloride-sensitive current and Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit protein in mouse tracheal epithelial cells were significantly increased after silencing the kinase. In conclusion, decreasing the expression of *WNK4* gene could increase the expression of epithelial Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunit protein in mouse tracheal epithelial cells and promote Na<sup>+</sup> transport, which might be involved in the repair of related edematous lung diseases.

**Keywords** with no lysine kinase 4; mouse tracheal epithelial cells; epithelial sodium ion channel; short-circuit current

收稿日期: 2018-10-17 接受日期: 2018-12-03

国家自然科学基金(批准号: 81670010)和辽宁省高等学校基本科研项目(批准号: LQNK201745)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 024-23256666-6028, E-mail: hgnie@cmu.edu.cn

Received: October 17, 2018 Accepted: December 3, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81670010) and Fundamental Scientific Research of High Education Institutions in Liaoning Province (Grant No.LQNK201745)

\*Corresponding author. Tel: +86-24-23256666-6028, E-mail: hgnie@cmu.edu.cn

网络出版时间: 2018-12-28 17:32:43

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181228.1732.026.html>

无赖氨酸激酶(with no lysine kinase, WNK)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 因其缺乏与ATP结合的赖氨酸而得名, 目前发现其四种亚型, 即WNK1-4。WNK4由Wilson等<sup>[1]</sup>在对II型假性低醛固酮血症患病家系进行连锁分析时发现, 其基因的错义突变与II型假性低醛固酮血症有关。WNK4在肾脏中高表达, 目前发现其对肾脏中Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>共转运体、肾脏外髓K<sup>+</sup>通道、上皮Na<sup>+</sup>通道(epithelial sodium channel, ENaC)均有调节作用<sup>[2]</sup>。WNK4在肺、结肠、心脏等部位都有表达<sup>[3]</sup>, 但其在呼吸道中的作用及相关机制目前少有研究。

小鼠气管上皮细胞(mouse tracheal epithelial cells, MTECs)主要由顶端带有刷状纤毛的极化柱状细胞构成。呼吸道上皮细胞ENaC控制Na<sup>+</sup>重吸收, 在维持呼吸道水盐转运平衡和调节呼吸道黏液层厚度等方面至关重要<sup>[4]</sup>。本实验旨在研究WNK4在呼吸道上皮细胞的表达及其对 $\alpha$ -ENaC的影响, 从而为肺部水肿性疾病的治疗提供新的方向。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

siRNA以及转染试剂siRNA-mate购自吉玛基因公司。逆转录和PCR试剂盒购自TaKaRa公司。WNK4抗体购自Cell Signaling Technology公司。ENaC抗体购自ThermoFisher公司。细胞培养所用的牛垂体提取物来自ScienCell公司。胰岛素转铁蛋白购自Gibco公司。霍乱毒素购自中科迈晨(北京)科技有限公司。其余试剂均购自美国Sigma公司。

### 1.2 MTECs的分离和培养

C57小鼠由中国医科大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(辽)20150001, 鼠龄7~8周, 体重18~22 g。本实验严格遵循中国医科大学伦理委员会制定的相关规定(伦理审批号: 14026M)。MTECs的分离培养方法在之前的研究中已有报道<sup>[5]</sup>。简言之, 从麻醉的小鼠体内取出气管, 纵向剖开后用0.1%蛋白酶和0.01%脱氧核糖核酸酶消化, 消化下来的气管上皮细胞接种在鼠尾胶原I包被的Transwell小室中。将3T3条件培养基(DMEM+10% FBS+1% P/S)和F-12培养基以1:1混合, 分别加入10  $\mu$ g/mL胰岛素、1  $\mu$ mol/L氢化可的松、250 nmol/L地塞米松、3.75  $\mu$ g/mL内皮细胞生长添加剂、25 ng/mL表皮生长因子、10 ng/mL霍乱毒素、30 nmol/L甲状腺激素、

5  $\mu$ g/mL胰岛素转铁蛋白和30  $\mu$ g/mL牛垂体提取物, 作为MTECs的完全培养基, MTECs在37  $^{\circ}$ C、含有5% CO<sub>2</sub>和95% O<sub>2</sub>的条件下培养, 隔天换液。

### 1.3 转染

当MTECs培养10天后开始转染实验。WNK4-siRNA序列: 5'-GCC CAC CUU CAA GCU CUA ATT-3'(上游), 5'-UUA GAG CUU GAA GGU GGG CTT-3'(下游); 阴性对照序列: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3'(上游), 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'(下游)。1  $\mu$ L 20  $\mu$ mol/L的siRNA加入4  $\mu$ L siRNA-mate转染试剂, 再加入含有MTECs培养因子的DMEM/F12 100  $\mu$ L, 混匀后静置10 min。细胞用PBS洗1次后, 加入转染复合物, 6 h后吸出转染液体并用PBS洗3次, 放回细胞培养箱继续培养。

### 1.4 半定量PCR

转染48 h后, 用Trizol提取总RNA, 按照ThermoFisher试剂盒说明书中的方法进行PCR操作。WNK4引物序列: 5'-TGA TGC TAG ACT GGC ACC TAT ATC TGA-3'(上游), 5'-TCC TTC TTC TGT AGT GTC TGT AGT GC-3'(下游); GAPDH引物序列: 5'-AGA AGG CTG GGG CTC ATT TG-3'(上游), 5'-AGG GGC CAT CCA CAG TCTTC-3'(下游)。PCR采用Taq酶法, PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶110 V电压下电泳30 min, 在紫外灯下观察PCR条带, 用ImageJ软件对条带进行分析。

### 1.5 Western blot

转染72 h后, 加入细胞裂解液提取总蛋白, 进行SDS-PAGE后, 将蛋白转至PVDF膜上, 5%牛奶封闭1 h, 加入WNK4抗体或 $\alpha$ -ENaC抗体, 4  $^{\circ}$ C摇晃孵育过夜, TBST洗膜后加入二抗孵育1 h, 再次洗膜后, ECL发光液发光。

### 1.6 短路电流的测定

将MTECs置于尤斯灌流装置中, 于左右小室灌注含相同Na<sup>+</sup>浓度的生理盐溶液(两侧溶液均含120 mmol/L NaCl、25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>、3.3 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.83 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>、1.2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>和10 mmol/L HEPES; 顶膜侧溶液另含10 mmol/L甘露醇; 基底膜侧另含10 mmol/L葡萄糖), 测定生理状态下的短路电流, 其渗透压在290~300 mOsm, 37  $^{\circ}$ C恒温循环水浴维持两小室溶液温度恒定, 并充以95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>混合气体。用含

4%琼脂糖盐桥和3 mol/L KCl的Ag-AgCl电极测定跨上皮短路电流(short-circuit currents, I<sub>sc</sub>)。将初始小鼠气管组织或单层气管上皮细胞短路调至0 mV, 并每10 s给予持续1 s的10 mV脉冲刺激1次, 监测跨上皮电阻和短路电流。

### 1.7 统计学处理

电生理技术数据采用Acquire and Analyse软件进行分析(Version 2.3, Physiologic Instruments)。半定量PCR和Western blot实验均采用ImageJ软件处理。实验结果采用均值±标准误表示, 应用Origin 8.0软件对数据进行分析,  $P < 0.05$ 为结果具有统计学意义。

## 2 结果

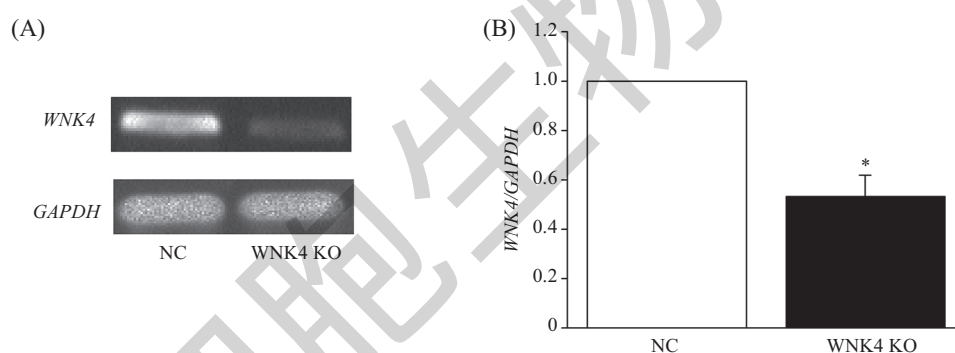
### 2.1 半定量PCR验证WNK4沉默

WNK4在肾脏疾病中研究较为广泛<sup>[2]</sup>, 但是在呼吸系统当中的研究较为罕见。为检验siRNA对WNK4基因的沉默效果, 我们首先应用了半定量PCR实验

从mRNA水平验证其沉默效果。如图1A所示, WNK4基因在MTECs表达, 应用siRNA后可以沉默WNK4在MTECs中的表达, 以阴性对照组WNK4的mRNA水平为对照, 在转染48 h后, 该激酶的mRNA水平降低至 $0.53 \pm 0.09 (n=3)$ , 与阴性对照组相比差异具有统计学意义(图1B,  $P < 0.05$ )。上述结果表明, 我们所选用的siRNA序列可以很好地降低WNK4的mRNA水平。

### 2.2 Western blot验证WNK4沉默

上述半定量PCR实验初步验证了我们所选用的siRNA序列可以降低WNK4的mRNA水平。接下来我们采用Western blot进一步证实了siRNA沉默对WNK4蛋白水平表达的影响。如图2A所示, 基因沉默后WNK4的蛋白表达明显降低, 以阴性对照组WNK4蛋白水平为对照, 在转染siRNA 72 h后, WNK4蛋白表达降低至 $0.56 \pm 0.12 (n=3)$ , 差异具有统计学意义(图2B,  $P < 0.05$ )。应用siRNA后, WNK4的蛋白和mRNA水平表达均降低。因此, 我们可以利

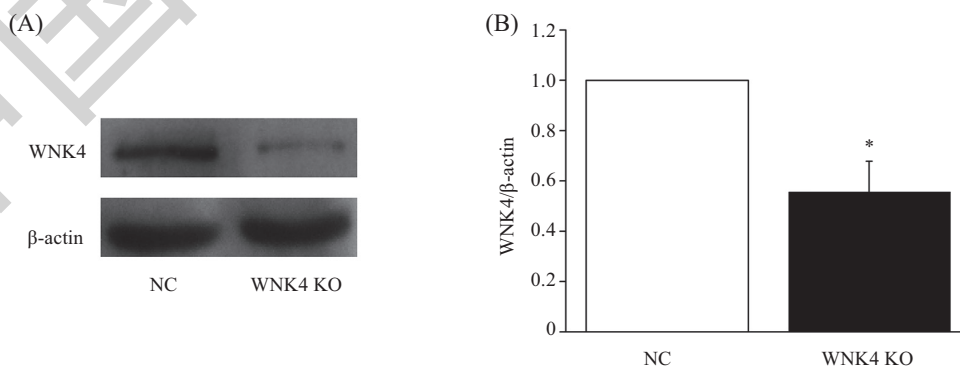


A: 半定量PCR验证siRNA沉默WNK4效率条带图; B: 半定量PCR验证siRNA沉默WNK4效率统计图; \* $P < 0.05$ , 与NC组比较。

A: the band diagram of semi-quantitative PCR to verify the efficiency of siRNA silencing WNK4; B: statistical analysis of semi-quantitative PCR to verify the efficiency of siRNA silencing WNK4; \* $P < 0.05$  compared with NC group.

图1 siRNA沉默WNK4基因的半定量PCR实验

Fig.1 Semi-quantitative PCR experiment of silencing WNK4 gene by siRNA

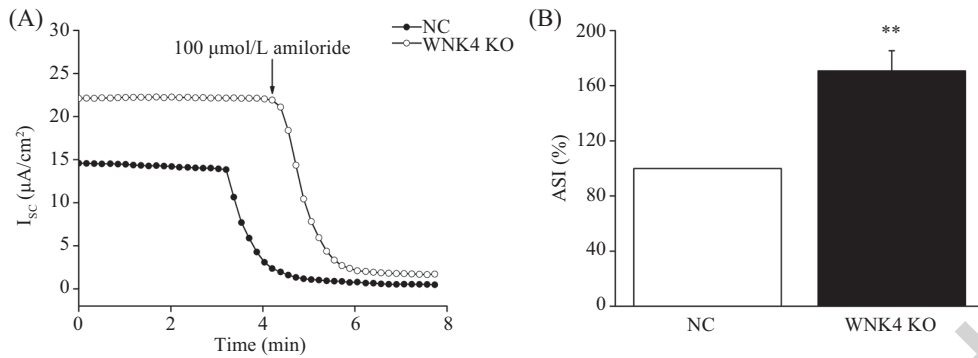


A: Western blot验证siRNA沉默WNK4效率条带图; B: Western blot验证siRNA沉默WNK4效率统计图; \* $P < 0.05$ , 与NC组比较。

A: the band diagram of Western blot to verify the efficiency of siRNA silencing WNK4; B: statistical analysis of Western blot to verify the efficiency of siRNA silencing WNK4; \* $P < 0.05$  compared with NC group.

图2 siRNA沉默WNK4基因的Western blot实验

Fig.2 Western blot analysis of siRNA silencing WNK4 gene

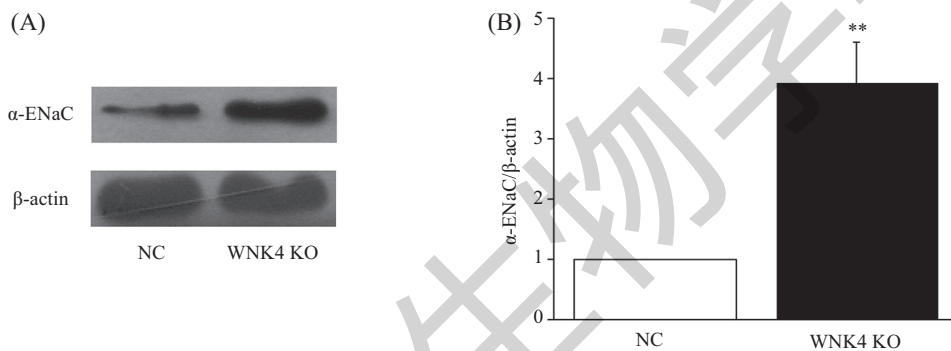


A: 尤斯灌流实验检测沉默 *WNK4* 对 MTECs 短路电流的影响; B: 沉默 *WNK4* 对 MTECs 短路电流影响的统计图; \*\* $P < 0.01$ , 与 NC 组比较。

A: Using chamber apparatus to detect the effect of silencing *WNK4* on short-circuit current of MTECs; B: statistical diagram of the effect of silencing *WNK4* on short-circuit current of MTECs; \*\* $P < 0.01$  compared with NC group.

图3 *WNK4* 沉默对 MTECs 短路电流的影响

Fig.3 Effect of *WNK4* silencing on short-circuit current of MTECs



A: Western blot 检测沉默 *WNK4* 对  $\alpha$ -ENaC 蛋白表达影响的条带图; B: Western blot 检测沉默 *WNK4* 对  $\alpha$ -ENaC 蛋白表达影响的统计图; \*\* $P < 0.01$ , 与 NC 组比较。

A: the band diagram of Western blot to verify the effects of silencing *WNK4* on the expression of  $\alpha$ -ENaC protein; B: statistical analysis of Western blot to verify the effects of silencing *WNK4* on the expression of  $\alpha$ -ENaC protein; \*\* $P < 0.01$  compared with NC group.

图4 *WNK4* 沉默对  $\alpha$ -ENaC 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of *WNK4* silencing on  $\alpha$ -ENaC protein expression

用此 siRNA 沉默 *WNK4*。

### 2.3 *WNK4* 对 MTECs 短路电流的影响

本实验将 MTECs 置于 6 通道的尤斯灌流系统进行短路电流的研究。如图 3A 所示, 待电流平稳后, 加入 ENaC 特异性抑制剂阿米洛利, 再次平稳后的电流值与初次平稳的电流值差值即为阿米洛利敏感电流, 并将用药前的阿米洛利敏感性初始电流作为 100% 对照。 *WNK4* 沉默组 MTECs 的阿米洛利敏感电流明显高于对照组; 设对照组为 100%, *WNK4* 沉默组 MTECs 的阿米洛利敏感电流值升高至  $(170.79 \pm 14.61)\% (n=3)$ , 差异具有明显的统计学意义 (图 3B,  $P < 0.01$ )。上述结果表明, 沉默 *WNK4* 能增加 MTECs 的 ENaC 活性。

### 2.4 *WNK4* 对 MTECs 中 $\alpha$ -ENaC 蛋白表达的影响

沉默 *WNK4* 增加阿米洛利敏感电流, 但是其机

制并不清楚, 我们进一步测定了  $\alpha$ -ENaC 的蛋白表达情况。如图 4A 所示, 沉默 *WNK4* 可以增加 MTECs 的  $\alpha$ -ENaC 蛋白表达, 以阴性对照组  $\alpha$ -ENaC 蛋白水平为对照, *WNK4* 沉默组  $\alpha$ -ENaC 蛋白表达升高至  $3.93 \pm 0.68 (n=4)$ , 差异具有明显的统计学意义 (图 4B,  $P < 0.01$ )。上述结果表明, 沉默 *WNK4* 能增加 MTECs 中  $\alpha$ -ENaC 蛋白的表达。

## 3 讨论

MTEs 是研究肺脏离子转运功能的常见原代细胞系<sup>[6]</sup>。与在培养板上培养的 MTECs 相比, 本实验应用的 Transwell 小室中以气液交界面培养的 MTECs 更接近生理状态, 基本符合体内呼吸道的形态学和生理学特征<sup>[7]</sup>。该模型可应用于呼吸道感染等疾病中, 对研究呼吸道生理功能、病理机制及相关疾病

诊疗具有重要意义。

目前关于WNK4的研究多集中在肾脏中<sup>[2]</sup>。WNK4能降低Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>共转运体、肾脏外髓K<sup>+</sup>通道活性。II型假性低醛固酮血症中WNK4的错义突变会降低WNK4对远端肾单位Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>共转运体的抑制作用<sup>[8]</sup>, 但会增强其对肾脏外髓K<sup>+</sup>通道的抑制作用, 这与该病高血压和高血钾的症状相关。WNK4也可以调控ENaC。ENaC在人的气道、肺脏、肾脏中均有表达。人体内的ENaC至少由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 四种亚基构成; 1个完整的功能性ENaC通常由1~2个 $\alpha$ 亚基、1个 $\beta$ 亚基和1个 $\gamma$ 亚基构成, 其中 $\alpha$ 亚基构成ENaC的成孔通道, 是维持正常肺上皮Na<sup>+</sup>转运所必需的。有文献报道, 敲除 $\alpha$ -ENaC的小鼠由于不能清除肺泡内的液体, 会在出生后40 h内死亡<sup>[9]</sup>。在肺中, Na<sup>+</sup>的转运依赖ENaC通道, Na<sup>+</sup>通过上皮细胞顶膜侧ENaC进入细胞, 随后由钠钾泵泵出细胞, 这个过程产生渗透梯度, 驱动水从肺泡上皮顶端向基底外侧被动转运, 其中ENaC是Na<sup>+</sup>重吸收的限速步骤。因此, ENaC在维持肺泡液体平衡方面发挥重要作用<sup>[10]</sup>。泛素连接酶Nedd4-2能结合 $\alpha$ -ENaC的羧基末端, 促使ENaC内化和降解<sup>[11]</sup>。血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶1可以使泛素连接酶Nedd4-2磷酸化, 减轻其对ENaC的内化作用<sup>[12]</sup>。Heise等<sup>[13]</sup>发现, WNK4可以通过激活血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶1信号来增加HEK293细胞的ENaC活性。但Ring等<sup>[14]</sup>通过体外非洲爪蟾卵母细胞的研究发现, WNK4能以激酶非依赖性方式抑制ENaC活性, 而此过程同样需要Nedd4-2的参与。WNK4和ENaC在MTECs均有表达, 类似于肾脏; 我们推测, 呼吸道的WNK4对ENaC也有调控作用, 但这种机制尚未明确。本实验用siRNA沉默了WNK4, 首先从RNA和蛋白水平证明MTECs表达WNK4, 同时验证了我们选用的siRNA可以沉默WNK4。随后的尤斯灌注结果显示, 沉默WNK4后, MTECs的阿米洛利敏感电流增加。最后通过Western blot结果进一步表明, 沉默WNK4使 $\alpha$ -ENaC蛋白表达增多, 我们推测, 在MTECs中, WNK4对 $\alpha$ -ENaC的调控作用可能同样需要Nedd4-2的参与。

在急性肺损伤等肺水肿性疾病中, 患者多伴随有肺泡表面ENaC数量减少或结构的破坏, 修复ENaC功能则可减缓此类疾病的发生和进展<sup>[15]</sup>。本实验研究结果表明, 沉默WNK4能增加MTECs的 $\alpha$ -ENaC活性, 因此, 应用降低WNK4表达的药物可能为此类疾

病提供潜在的治疗方法。本课题在呼吸系统信号传导及离子通道转运方面针对WNK4激酶的研究可能为急性肺损伤等疾病的治疗提供新的靶点。

## 参考文献 (References)

- 1 Wilson FH, Disse-Nicodème S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, *et al.* Human hypertension caused by mutations in WNK kinases. *Science* 2001; 293(5532): 1107-12.
- 2 Hoorn EJ, Ellison DH. WNK kinases and the kidney. *Exp Cell Res* 2012; 318(9): 1020-6.
- 3 Kahle KT, Gimenez I, Hassan H, Wilson FH, Wong RD, Forbush B, *et al.* WNK4 regulates apical and basolateral Cl<sup>-</sup> flux in extrarenal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(7): 2064-9.
- 4 Yang L, Jiang BJ, Zhao RZ, Ji HL. Epithelial sodium channels in pulmonary epithelial progenitor and stem cells. *Int J Biol Sci* 2016; 12(9): 1150-4.
- 5 候亚鹏, 周祉好, 昌建钧, 丁炎, 聂宏光. 流感病毒对囊性纤维化跨膜传导调节因子影响的研究. *中华微生物学和免疫学杂志* (Hou Yapeng, Zhou Zhihao, Chang Jianjun, Ding Yan, Nie Hongguang. Influences of influenza virus on cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Chin J Microbiol Immunol*) 2017; 37(11): 805-9.
- 6 Chen Z, Zhao R, Zhao M, Liang X, Bhattarai D, Dhiman R, *et al.* Regulation of epithelial sodium channels in urokinase plasminogen activator deficiency. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307(8): 609-17.
- 7 Davidson DJ, Kilanowski FM, Randell SH, Sheppard DN, Dorin JR. A primary culture model of differentiated murine tracheal epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(4): 766-78.
- 8 Mayan H, Munter G, Shaharabany M, Mouallem M, Puzner R, Holtzman EJ, *et al.* Hypercalciuria in familial hyperkalemia and hypertension accompanies hyperkalemia and precedes hypertension: description of a large family with the Q565E WNK4 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(8): 4025-30.
- 9 Matalon S, Bartoszewski R, Collawn JF. Role of epithelial sodium channels in the regulation of lung fluid homeostasis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 309(11): 1229-38.
- 10 Eaton AF, Yue Q, Eaton DC, Bao HF. ENaC activity and expression is decreased in the lungs of protein kinase C- $\alpha$  knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2014; 307(5): 374-85.
- 11 Sternak M, Bar A, Adamski MG, Mohaissen T, Marczyk B, Kieronka A, *et al.* The deletion of endothelial sodium channel  $\alpha$  ( $\alpha$ ENaC) impairs endothelium-dependent vasodilation and endothelial barrier integrity in endotoxemia *in vivo*. *Front Pharmacol* 2018; 9: 178.
- 12 Debonneville C, Flores SY, Kamynina E, Plant PJ, Tauxe C, Thomas MA, *et al.* Phosphorylation of Nedd4-2 by Sgk1 regulates epithelial Na<sup>+</sup> channel cell surface expression. *EMBO J* 2001; 20(24): 7052-9.
- 13 Heise CJ, Xu BE, Deaton SL, Cha SK, Cheng CJ, Earnest S, *et al.* Serum and glucocorticoid-induced kinase (SGK) 1 and the epithelial sodium channel are regulated by multiple with no lysine (WNK) family members. *J Biol Chem* 2010; 285(33): 25161-7.
- 14 Ring AM, Cheng SX, Leng Q, Kahle KT, Rinehart J, Lalioti MD, *et al.* WNK4 regulates activity of the epithelial Na<sup>+</sup> channel *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(10): 4020-4.
- 15 Schmidt C, Klammt J, Thome UH, Laube M. The interaction of glucocorticoids and progesterone distinctively affects epithelial sodium transport. *Lung* 2014; 192(6): 935-46.