

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.001

重组慢病毒沉默 rictor 基因对 mTORC2/SGK1 信号通路及肺泡上皮钠离子通道的调控作用*

钟 曦, 秦 克, 王导新[△]

(重庆医科大学附属第二医院呼吸内科 400010)

[摘要] **目的** 构建针对 mTORC2 特异组成蛋白中 rictor 基因的重组慢病毒沉默载体, 研究其对 mTORC2/SGK1 信号通路的调控机制及其对肺泡上皮细胞钠离子通道的影响, 并探讨其在急性呼吸窘迫综合征及急性肺损伤中的作用。**方法** 构建目的基因的 rictor 干扰质粒及空载质粒并与慢病毒包装体系共转染 293T 细胞, 收集病毒上清液, 经离心、浓缩及纯化获取重组慢病毒。测定病毒滴度, 感染 A549 细胞并筛选细胞稳定株, RT-PCR 验证目的基因 rictor 沉默情况。采用 PCR 和 western blot 检测该通路中各信号指标表达情况。**结果** 成功构建沉默 rictor 基因的重组慢病毒并感染 A549 细胞并获得细胞稳定株。与空白组及对对照组相比, shRNA-rictor 组中 rictor 和下游 SGK1、 α -ENaC、 β -ENaC、 γ -ENaC mRNA 水平均有明显下降 ($P < 0.05$)。同时, shRNA-rictor 组中 rictor 和下游 SGK1、P-SGK、 α -ENaC、 β -ENaC、 γ -ENaC 的蛋白水平较前两组均有明显下降 ($P < 0.05$)。**结论** 沉默 rictor 基因对 mTORC2/SGK1 信号通路有明显的调控作用, 同时从基因和蛋白水平影响肺泡上皮细胞 α -ENaC、 β -ENaC、 γ -ENaC 的表达。mTORC2/SGK1 可能是调控肺泡上皮细胞对肺泡液的清除能力, 同时影响肺水肿形成的重要信号通路。

[关键词] 呼吸窘迫综合征, 成人; rictor 基因; 慢病毒属**[中图分类号]** R563.8**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)26-3601-04

Regulating effect of recombinant lentivirus silencing rictor gene on mTORC2/SGK1 signal pathway and pulmonary alveolar epithelial sodium ion channel*

Zhong Xi, Qin Ke, Wang Daoxin[△]

(Department of Respiratory Medicine, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] **Objective** To construct recombinant lentivirus silence vector aiming at rictor gene in mTORC2 specific protein, and to investigate its regulation on mTORC2/SGK1 signal pathway and the effect on pulmonary alveolar epithelial sodium ion channel, as well as the role in acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury. **Methods** The interfering vector plasmid and empty vector plasmid of target gene rictor were constructed, which and the lentivirus packaging system were co-transfected to 293T cells. The viral supernatant was collected, centrifuged, concentrated and purified for obtaining recombinant lentivirus. The virus titer was detected and the virus was infected to A549 cells. Stable cell lines were screened. RT-PCR was used to confirm the silencing situation of target gene rictor. The expression situation of various signal indexes in this pathway was detected by PCR and Western blot. **Results** The recombinant lentivirus of silence gene rictor was successfully constructed and transfected to A549 cell for obtaining stable cell lines. Compared with blank and control groups, the mRNA levels of rictor, downstream SGK1 and α -, β - and γ -ENaC in the shRNA-rictor group were significantly decreased ($P < 0.05$). Meanwhile, the protein levels of rictor, downstream SGK1, P-SGK and α -, β - and γ -ENaC in the shRNA-rictor group were significantly decreased compared with the other two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Silence rictor gene has the obvious regulation effect on mTORC2/SGK1 signal pathway, meanwhile affects the expression of pulmonary alveolar epithelial cellular α -, β - and γ -ENaC at gene and protein level. It is speculated that mTORC2/SGK1 may be an important signal pathway for regulating the clearance capacity of pulmonary alveolar epithelial cells on pulmonary alveolar fluid and simultaneously affecting the pulmonary edema formation.

[Key words] respiratory distress syndrome, adult; rictor gene; lentivirus

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由各种直接和间接致病因素导致的肺泡细胞及毛细血管内皮细胞损伤, 而肺泡周围大量炎症因子浸润造成弥漫性肺间质及肺泡水肿, 导致严重的低氧性呼吸功能不全^[1]。以往在针对急性肺损伤及呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 的治疗中主要是运用抗感染、抗炎等方法, 降低因肺内大量炎性渗出所导致的毛细血管内皮-肺泡上皮屏障功能障碍。部分文献报道, 增加肺泡上皮细胞对肺内多余液体的清除能力, 也是控制急性肺损伤的恶化及减少难治性低氧血症发生率的有效途径^[2]。肺泡 II 型上皮细胞与肺水清除 (alveolar fluid clear-

ance, AFC) 有密切关系^[3], 有研究表明, 阿米洛利敏感钠离子通道广泛分布于肺泡 II 型上皮细胞中, 也是调节肺水交换的重要效应机制^[4]。SGK1 作为重要的 AGC 激酶 (protein kinase A, G, C) 可有效调控下游钠离子通道的活化及表达^[5], 在肺水清除中起到重要作用。本实验研究通过构建重组慢病毒载体沉默 mTORC2 蛋白复合体中特异性基因 rictor, 从靶基因干扰方向深入研究 rictor-mTORC2 复合体, mTORC2/SGK1 信号通路对肺上皮钠离子通道 (epithelial sodium channel, ENaC) 的调控机制。

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81270141) 作者简介: 钟曦 (1984-), 硕士, 主治医师, 主要从事呼吸危重症临床及基础研究。

[△] 通讯作者, E-mail: weanger2008@163.com。

表 1 引物序列

基因名称	上游引物	下游引物
Rictor	5'-CTGAGGTTTCCCATTGCTGTC-3'	5'-GGTTGCTTTGGTGGTGTTC-3'
SGK1	5'-CAACAGCACAAACATCCACCTTC-3'	5'-TACAAGACAGCTCCCAGGCAC-3'
α -ENaC	5'-CAATGACACCCAGTATAAGATGACC-3'	5'-CAATGAGGCACAGCACCGA-3'
β -ENaC	5'-CAATGACACCCAGTATAAGATGACC-3'	5'-CAATGACACCCGACAGCACCGA-3'
γ -ENaC	5'-CAATGAGAACGAGAAGGGAAAG-3'	5'-AAGAAGCAGGTCACCAGCAGT-3'
β -actin	5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3'	5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'

1 材料与与方法

1.1 材料 A549 细胞购自中国科学院典型培养细胞库。shRNA-rictor, nonsilencing shRNA 及慢病毒载体由上海吉凯基因化学公司提供。Trizol RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、PCR 引物及 DNA marker 均由日本 TaKaRa 公司提供;western blot 配胶试剂盒购自西安碧云天生物技术公司。RPMI1640 培养基、小牛血清、0.25% 胰蛋白酶均购自 Gibco 公司。rictor 单克隆抗体, SGK1 及 P-SGK 单克隆抗体购自美国 Immunoway 公司; ENa Sodium channel 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。 β -actin 多克隆抗体购自美国 Proteintech 公司。HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Abbkine 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 A549 细胞用含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养, 并放于 37 °C, 5% CO₂ 孵育箱中培养。待细胞融合度达 90% 以上, 成对数生长期时, 可进行后续实验。

1.2.2 shRNA-rictor 慢病毒感染质粒的设计及构建 根据 Genbank 数据库中 A549 细胞 rictor 基因 mRNA 序列, 经过评估及 BLAST 系统排除同源 cDNA, 设计 shRNA 干扰靶序列 5'-AAACTTGTGAAGAATCGTATC-3'; 合成 shRNA 对应的 DNA Oligo, 退火后形成双链 DNA。将其与经过 Age I 和 EcoR I 两位点酶切后的 GV115 载体链接, 将链接体转化 DH5 α 感受态细胞, 用 PCR 法对阳性克隆进行鉴定。PCR 引物为上游: CCATGATTCCTTCATATTTGC; 下游: GTAAT-ACGGTTATCCACGCG。

1.2.3 慢病毒的包装和病毒滴度的测定 病毒包装前 24 h, 将 293T 细胞以 1×10^5 /mL 的密度接种于培养皿中。按 Lipofectamine 2000 试剂盒说明书提示, 将慢病毒质粒包装体系 (Lenti-Easy Packaging Mix、GFP shRNA Plasmid 及 Opti-MEM) 与 Lipofectamine 2000 转染试剂盒按比例稀释混匀并移至 293T 细胞培养皿中, 8 h 后弃转染液, 用 DMEM 继续培养 72 h 后收集病毒上清液, 经过滤、离心、浓缩及纯化, 保存于 -80 °C 冰箱。本实验采用荧光计数法进行病毒滴度测定, 将 293T 细胞以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板, 贴壁后, 将待测病毒以 10 倍梯度稀释, 分别加入 96 孔板中, 96 h 后在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况并统计。

1.2.4 重组慢病毒感染 A549 细胞和筛选细胞稳定株 以密度 8×10^4 /孔接种 A549 细胞于 6 孔板中, 待融合率达 30% 时, 用重组慢病毒感染 A549 细胞。设空白组、阴性对照组、shRNA-rictor 组, 每组设计 3 个复孔。预实验设计感染复数 MOI = 20、50、100, 将终浓度为 5 μ g/ μ L 的 Polybrene 和 Enhanced infection solution 与相应体积的重组慢病毒悬液混匀加入 6 孔板。3~4 d 后荧光显微镜下观察细胞感染率。继续培养感染成功的目的细胞, 用嘌呤霉素筛选细胞稳定株。

1.2.5 RT-PCR 检测 rictor 基因及 SGK1、ENaC 3 个亚基的

mRNA 表达水平 提取各组 A549 细胞总 RNA, 依据 DRR047A 逆转录试剂盒说明书, 逆转录合成 cDNA。按照 RR901A 扩增试剂盒说明书建立反应体系, PCR 扩增目的和内参基因, 引物序列见表 1。

1.2.6 western blot 检测各组细胞 rictor、SGK1、P-SGK 及 ENaC 的蛋白表达水平 提取总蛋白, 用 BCA 检测法进行蛋白定量。各组蛋白样品经凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 用湿转法将蛋白转移至硝酸纤维素滤膜 (PVDF 膜)。用 PBST 配制 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入抗体 rictor (1 : 800)、SGK1 (1 : 1 000)、P-SGK1 (1 : 500)、 α -ENaC (1 : 500)、 β -ENaC (1 : 500)、 γ -ENaC (1 : 500) 于抗体孵育盒, 4 °C 孵育过夜; PBST (或 TBST) 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入 HRP 标记的二抗 (1 : 5 000), 37 °C 孵育 1 h; PBST (或 TBST) 洗膜 3 次, 每次 15 min。ECL 试剂盒显色, 凝胶系统成像, 并用 Quantity One 软件系统分别分析目的条带与 β -actin 的比值表示 rictor、SGK1、P-SGK1、ENaC 的 α 、 β 、 γ 3 个亚基蛋白表达水平。

1.3 统计学处理 用 SPSS20.0 进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组慢病毒阳性克隆的验证、滴度检测并感染目的细胞建立细胞稳定株

2.1.1 阳性克隆的 PCR 鉴定 将阳性克隆的寡核苷酸序列, 经退火、酶切、链接等过程, 用 PCR 法鉴定。重组慢病毒的 PCR 产物在 139 bp, 测序结果表明合成的 rictor shRNA 寡核苷酸序列插入正确, 命名为 shRNA-rictor。

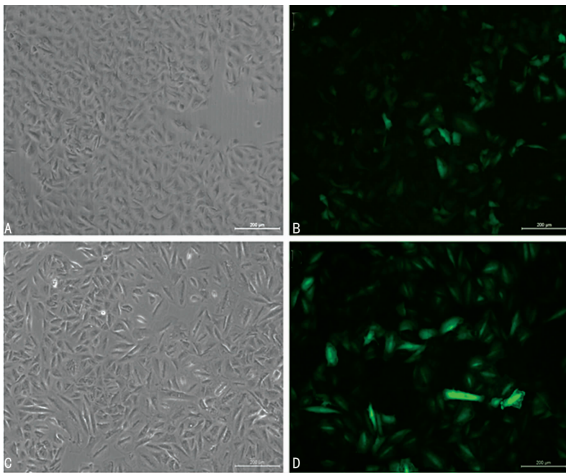
2.1.2 重组慢病毒滴度检测 将包装好的病毒进行梯度稀释, 再感染 A549 细胞, 并利用荧光显微镜检测各孔板中 GFP 的阳性细胞数量, 其 shRNA-rictor 组慢病毒滴度为 1.2×10^8 TU/mL, nonsilencing-shRNA 组慢病毒滴度为 1.0×10^8 TU/mL。

2.1.3 重组慢病毒感染目的细胞 将包装好的慢病毒感染 A549 细胞, 96 h 后荧光显微镜下计数有 GFP 表达的细胞数量及细胞总数, 统计后 shRNA-rictor 组感染效率约 60%, nonsilencing-shRNA 组感染效率 50%, 确定阳性组最佳感染复数 MOI 为 50 TU/mL, 表明感染成功 (图 1)。

2.1.4 嘌呤霉素筛选目的细胞并建立细胞稳定株 将慢病毒感染过的细胞用不同浓度梯度的嘌呤霉素筛选, 经预实验后发现 0.5 μ g/mL 是最佳筛选浓度, 继续培养细胞并获得纯化的目的细胞, 转染效率达 90% 以上 (图 2)。

2.1.5 目的细胞中 rictor 基因 mRNA 水平的验证及检测 提取各组总 RNA, RT-PCR 检测显示, 相比空白组和阴性对照组, shRNA-rictor 组中 rictor mRNA 表达明显低于前两组 ($P = 0.029$)。而空白组与 nonsilencing-shRNA 比较, rictor

mRNA 无明显差异($P>0.05$),见图 3。



A,B:空载组;C,D:shRNA-riCTOR 组。

图 1 shRNA-riCTOR 慢病毒载体及空载组感染 A549 细胞后荧光显微镜下 GFP 表达情况(200×)

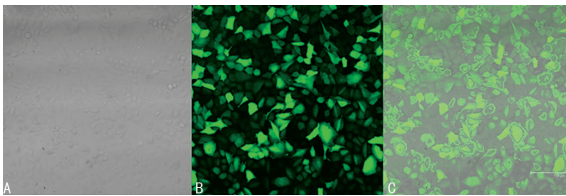
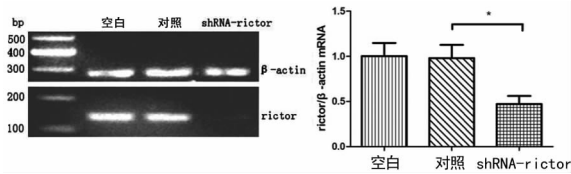


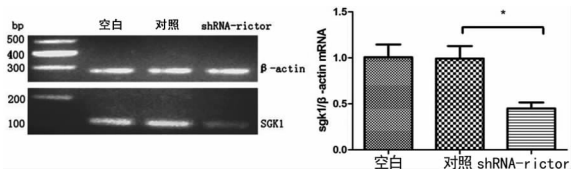
图 2 嘌呤霉素筛选后 shRNA-riCTOR 慢病毒感染组细胞中 GFP 表达情况(150×)



M=marker; * : $P<0.05$,与对照组比较。

图 3 RT-PCR 检测各组 rictor 基因的 mRNA 表达水平

2.2 RT-PCR 法检测检测 SGK1, α -ENaC, β -ENaC, γ -ENaC mRNA 表达水平 shRNA-riCTOR 组中 SGK1 mRNA 的表达水平也明显低于空白组及阴性对照组($P=0.026, 0.003, 0.000, 0.003, P<0.05$)。以上结论成功证实运用重组慢病毒载体感染 A549 细胞系进行对目的基因 rictor 的调控有效,并同时调控下游信号因子 SGK1、 α -ENaC、 β -ENaC、 γ -ENaC mRNA 表达水平(图 4、图 5)。



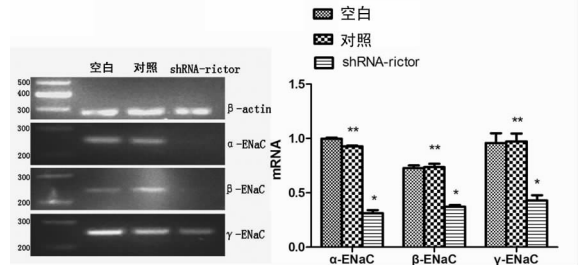
M=DNA Marker; * : $P<0.05$,与对照组比较。

图 4 RT-PCR 检测各组 A549 细胞 SGK1 的 mRNA 表达水平

2.3 western blot 法检测各组细胞中 rictor, SGK1, P-SGK 的蛋白表达水平 shRNA-riCTOR 组中 rictor, SGK1, P-SGK 的蛋白表达水平明显低于空白组及阴性对照组($P=0.002, 0.000, 0.012; P<0.05$)。而空白组与阴性对照组之间各目的蛋白表达水平无明显差异($P>0.05$),见图 6。

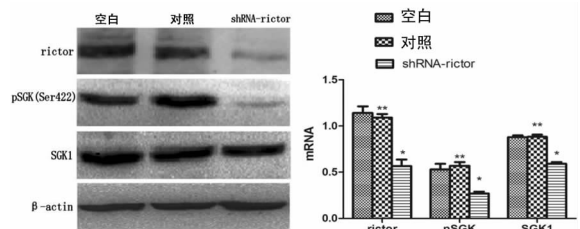
2.4 western blot 法检测各组细胞中钠离子通道 3 个亚基 α -ENaC, β -ENaC 及 γ -ENaC 的蛋白表达水平 shRNA-riCTOR 组

中的 α -ENaC, β -ENaC 及 γ -ENaC 蛋白表达水平明显低于空白组及阴性对照组($P=0.002, 0.000, 0.001, P<0.05$)。而空白组与阴性对照组之间各目的蛋白表达水平无明显差异($P>0.05$),见图 7。



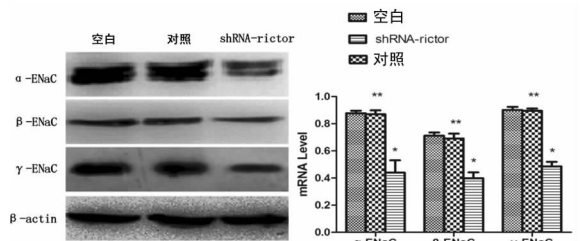
M=DNA Marker; * : $P<0.05$ 与对照组比较; * * : $P>0.05$ 与空白组比较。

图 5 RT-PCR 检测各组 A549 细胞 α -ENaC, β -ENaC 及 γ -ENaC 的 mRNA 表达水平



* : $P<0.05$,与对照组比较; * * : $P>0.05$,与空白组比较。

图 6 western blot 法检测各组 A549 细胞 rictor, SGK1, P-SGK 的蛋白表达水平



* : $P<0.05$ 与对照组比较; * * : $P>0.05$ 与空白组比较。

图 7 western blot 法检测各组 A549 细胞 α -ENaC, β -ENaC 及 γ -ENaC 的蛋白表达水平

3 讨论

急性肺损伤的严重阶段是急性呼吸窘迫综合征,以肺泡毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤为主要临床表现的综合征,导致严重的肺水肿,肺通气功能障碍,顽固性低氧血症等^[6-7]。慢性阻塞性肺疾病恶化的主要原因是肺内大量中性粒细胞、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症介质的浸润及肺水清除能力障碍。所以临床治疗上,通过抗感染、抗炎、利尿等治疗的同时,采用其他可能的途径提高肺水清除能力,维持毛细血管内皮-肺泡上皮屏障的稳定平衡是改善低氧血症,重度肺源性心脏病,及降低 ALI/ARDS 死亡率的另一种手段。

雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,以 mTORC1 及 mTORC2 两种形式存在于生物体中。mTORC1 由 mTOR、PRAS40、Raptor 和 mLST8/GpL 组成。mTORC2 包括 mTOR、PRR5、mLST8/GpL、rictor 和 mSIN1。不同于其它亚基,rictor 是 mTORC2 中的特异性组成部分。据文献证实,rictor 与 culin-1 链接组成 E3 泛素连接酶,可增加下

游 SGK1 的泛素化,同时 SGK1 可反作用于 rictor 磷酸化位点 T1135^[8-9]。因此,ricTOR-mTORC2 复合体与 SGK1 之间存在紧密的双向调控机制。本实验通过沉默 rictor 基因后,发现 SGK 磷酸化位点 Ser422 明显下调,证明 SGK1 是受 PI3K/mTORC2 通路的调控。这一结果和国际上的观点是保持一致的。

有国内外文献报道,参与调节肺泡内液体转运主要是通过 ENaC,Na⁺-K⁺-ATPase,水通道蛋白(AQP)等方式实现^[10]。其中 ENaC 离子通道是一种跨膜蛋白,其属于阿米洛利敏感性电压门控通道。主要位于肺泡上皮细胞顶侧膜,由 α 、 β 、 γ 3 种亚基构成的多聚体。而 α 亚基发挥了最主要的生物学功能,负责钠离子的重吸收利用,及调节细胞内外环境。在通过敲除 α -ENaC 基因的小鼠实验中发现,多数实验组在 40 h 后死于急性肺水肿引起的呼吸衰竭^[11]。一方面,ENaC 在位于上皮细胞基底膜的 Na⁺-K⁺-ATPase 帮助下参与水跨膜转运和肺水清除^[12]。另一方面,国际上大部分相关研究表明,ENaC 的活性是受到 SGK1 下游 nedd4 信号因子的直接调控。而对于 nedd4 如何调控 ENaC 的内部机制的讨论尚不统一,有部分文献证明,mTORC2/SGK1 信号通路可激活下游 nedd4-2 的 WWP2 磷酸化位点,以降低 nedd4 家族中 E3 泛素连接酶对 ENaC 的负向调控^[13-14]。因此,可推测 SGK1 与 nedd4-2 可能是通过磷酸化和泛素化的协同作用调控 ENaC 活性。本团队也将在以后的研究中对这一机制做更深入的探讨。

本课题组前期通过大量体内,体外研究已证明,采用 mTORC1 的抑制剂雷帕霉素干预时,检测钠离子通道蛋白表达无明显改变,而采用 mTORC1 及 mTORC2 双效抑制剂 PP242 干预时,钠离子蛋白表达有明显下降。同时,组织学检测提示肺组织水肿情况加重。而利用糖皮质激素、胰岛素、表皮生长因子等药物调控 PI3k/mTOR/SGK1 信号通路,可明显上调钠离子通道对肺泡液的转运能力^[15-16]。以上结果提示,PI3K/mTORC2/SGK1 信号通路是调控 ENaC 的主要途径。而慢病毒是一种以 HIV 病毒为基础发展而来的免疫缺陷性逆转录病毒。相比早期的脂质体,质粒等转染载体,它具有稳定性,高敏感性,易感性等优势^[17-18]。近年重组慢病毒 shRNA 技术被广泛应用于内源性基因分析,信号转导通路研究。本实验通过设计目的基因 rictor 干扰序列,构建 shRNA 质粒及重组慢病毒载体,并成功感染目的细胞建立稳定株,沉默 mTORC2 中特异性基因 rictor,从基因层面准确证明 mTORC2/SGK1 是调控 ENaC 离子通道的高特异性信号通路,同时进一步深入探讨了 rictor-mTORC2 蛋白复合体对钠离子通道的内部调控机制。从分子生物学的角度,有效的证明 mTORC2/SGK1 信号通路是调节钠通道的关键。并推断此信号通路可能是影响肺水清除的有效途径。此实验结论为提高肺水清除能力,纠正急性肺水肿的临床研究提供了部分理论基础,同时也为拓展 ALI 和 ARDS 临床治疗方向提供了一定的理论思路。

参考文献

- Li H, Qiang Y, Wang L, et al. Repair of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by endothelial progenitor cells, alone and in combination with simvastatin [J]. *Chest*, 2013, 144(3): 876-886.
- Wang Q, Lian QQ, Li R, et al. Lipoxin A(4) activates alveolar epithelial sodium channel, Na, K-ATPase, and increases alveolar fluid clearance [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(5): 610-618.
- Planes C, Randrianarison NH, Charles RP, et al. ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1 [J]. *EMBO Mol Med*, 2010, 2(1): 26-37.
- Kellenberger S, Hoffmann-Pochon N, Gautschi I, et al. On the molecular basis of ion permeation in the epithelial Na⁺ channel [J]. *J Gen Physiol*, 1999, 114(1): 13-30.
- Pao AC. SGK regulation of renal sodium transport [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21(5): 534-540.
- Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, et al. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill [J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(9): 1702-1714.
- Rafat N, Dacho C, Kowanetz G, et al. Bone marrow-derived progenitor cells attenuate inflammation in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome [J]. *BMC Res Notes*, 2014(7): 613.
- Dibble CC, Asara JM, Manning BD. Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2009(29): 5657-5670.
- Gao D, Wan L, Inuzuka H, et al. Rictor forms a complex with Cullin-1 to promote SGK1 ubiquitination and destruction [J]. *Mol Cell*, 2010, 39(21): 797-808.
- Sartori C, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights [J]. *Eur Respir J*, 2002, 20(5): 1299-1313.
- Hummler E, Barker P, Gatzky J, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice [J]. *Nat Genet*, 1996, 12(3): 325-328.
- Zecevic M, Heitzmann D, Camargo SM, et al. SGK1 increases Na, K-ATP cell-surface expression and function in *Xenopus laevis* oocytes [J]. *Pflugers Arch*, 2004, 448(1): 29-35.
- Wiemuth D, Lott JS, Ly K, et al. Interaction of serum- and glucocorticoid regulated kinase 1 (SGK1) with the WW-domains of Nedd4-2 is required for epithelial sodium channel regulation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): 12163.
- Snyder PM, Steines JC, Olson DR. Relative contribution of Nedd4 and Nedd4-2 to ENaC regulation in epithelia determined by RNA interference [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 5042-5046.
- Deng J, Wang DX, Deng W, et al. Regulation of alveolar fluid clearance and ENaC expression in lung by exogenous angiotensin III [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 181(1): 52-61.
- He J, Qi D, Wang DX, et al. Insulin upregulates the expression of epithelial sodium channel in vitro and in a mouse model of acute lung injury: Role of mTORC2/SGK1 pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 31(1): 164-175.
- Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, et al. RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2003, 30(1): 96-102.
- Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes; lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference [J]. *J Virol*, 2003, 77(16): 8957-8961.