论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201506014

mTORC2介导的信号通路影响肺泡上皮钠通道对急性肺损伤肺组织的保护作用

钟 曦,赵 燕,王导新 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸与危重症医学科)

[摘要] **目的** 通过调控肺泡上皮细胞α钠离子通道(epithelial sodium channel α,ENaC-α)上游信号通路,探讨mTORC2/SGK1途径在急性肺损伤(acute lung injury,ALI)情况下对肺水清除方面的作用机制。**方法** 将50只BALB/c雄性小鼠按随机数表法分成对照组、模型组、胰岛素组、雷帕霉素组及PP242抑制剂组,每组10只。滴鼻给予5 mg/kg LPS构建ALI动物模型。建模2 h后,分别腹腔注射0.8 U/kg胰岛素、4 mg/kg雷帕霉素、60 mg/kg PP242干预,8 h后处死小鼠。A549细胞分别以培养基、10 mmol/mL胰岛素、5 mmol/mL雷帕霉素、5 mmol/mL PP242处理。采用ELISA检测各组肺泡灌洗液(BALF)中IL-6及TNF-α浓度,并测量各组右上肺组织的湿/干质量比(W/D)评估肺水清除(alveolar fluid clearance,AFC),HE染色观察各组肺组织病理改变。采用Real-time PCR、Western blot、免疫荧光法检测A549细胞rictor、糖皮质激素调节蛋白激酶1(serum and glucocorticoid-regulated protein kinase1,SGK1)、磷酸泛素化连接酶(E3 ubiquitin protein ligase,Nedd4-2)及ENaC-α的表达。**结果** 体内实验发现,与模型组比较,胰岛素组小鼠BALF中IL-6[(77.48±6.04) *vs* (49.17±8.49) pg/mL]和TNF-α[(116.2±13.5) *vs* (92.4±8.37) pg/mL]水平显著降低,并伴有湿/干质量比减低,病检示肺损伤程度减轻($P<0.05$)。PP242抑制剂组BALF中IL-6[(77.48±6.04) *vs* (100.6±14.69) pg/mL]和TNF-α[(116.2±13.5) *vs* (192.5±16.01) pg/mL]水平上升,湿/干质量比显著升高,肺组织损伤明显,程度较模型组更重($P<0.05$)。而雷帕霉素组与模型组中各项指标及病理学改变差异无统计学意义($P>0.05$)。体外实验中,A549细胞中rictor、SGK1、Nedd4-2及ENaC-α mRNA和蛋白表达在胰岛素组明显增高,在PP242抑制剂组中明显降低($P<0.05$),而在雷帕霉素组中无明显改变($P>0.05$)。**结论** 调控mTORC2/SGK1信号通路可影响ENaC-α的表达,从而发挥其在ALI情况下对肺组织的保护作用。

[关键词] 肺泡上皮钠通道;mTORC2/SGK1;急性肺损伤;肺水清除率

[中图法分类号] R322.35;R363;R563 [文献标志码] A

mTORC2-mediated signaling pathway affects protective role of alveolar epithelial sodium channel in mice of acute lung injury

Zhong Xi, Zhao Yan, Wang Daoxin (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and mechanism of mTORC2/SGK1 signaling pathway in alveolar fluid clearance (AFC) of acute lung injury (ALI) by regulating alveolar epithelial alpha sodium channel (ENaC-α) upstream signaling pathway. **Methods** Fifty male BALB/c mice were randomly divided into blank group, lipopolysaccharide (LPS) group, insulin group, LPS + rapamycin (mTORC1 inhibitor) group, and LPS + PP242 (mTORC1 and mTORC2 double inhibitor) group ($n=10$). ALI animal models were constructed by intranasal administration of 5 mg/kg LPS. After 2 h, the models were treated by intraperitoneal

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270141)

[通信作者] 王导新,E-mail:wangdaoxin1@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151118.1513.032.html(2015-11-18)

injection of 0.8 U/kg insulin, 4 mg/kg rapamycin, and 60 mg/kg PP242, respectively, and the mice were put to death after 8 h. A549 cells were divided into control group, insulin group, rapamycin group and PP242 group, which were treated with culture medium, 10 mmol/L insulin, 5 mmol/L rapamycin, and 5 mmol/L PP242, respectively. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) IL-6 and TNF-α were measured by ELISA, and wet/dry (W/D) weight ratio was determined to evaluate AFC. HE staining was adopted to observe the lung tissue pathological changes. Real-time PCR, Western blotting and immunofluorescence assay were used to detect the expressions of rictor, SGK1, Nedd4-2 and ENaC-α in A549 cells. **Results** *In vivo* experiment showed that, compared with the LPS group, BALF IL-6 (77.48 ± 6.04 *vs* 49.17 ± 8.49), TNF-α (116.2 ± 13.5 *vs* 92.4 ± 8.37) and W/D weight ratio were significantly decreased, AFC was increased, and lung injury was alleviated in the insulin group (all $P<0.05$). Compared with the LPS group, BALF IL-6 (77.48 ± 6.04 *vs* 100.6 ± 14.69), TNF-α (116.2 ± 13.5 *vs* 192.5 ± 16.01) and W/D weight ratio were significantly increased, AFC was decreased, and lung injury was significantly worse in the LPS + PP242 group (all $P<0.05$). The inflammation indexes and pathological change had no significantly statistical differences between the LPS group and LPS + rapamycin group (all $P<0.05$). *In vitro* experiment showed that, compared with the control group, the expression of rictor, SGK1, Nedd4-2 and ENaC-α in A549 cells were obviously increased in the insulin group, and obviously decreased in the PP242 group, but no obvious changes were found between the rapamycin group and LPS group (all $P<0.05$). **Conclusion** Activated mTORC2/SGK1 pathway signaling can increase the expression of ENaC-α, and improve the AFC, thereby playing a protective role in lung tissue.

[**Key words**] alveolar epithelial sodium channel; mTORC2/SGK1; acute lung injury; alveolar fluid clearance

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270141). Corresponding author: Wang Daoxin, E-mail: wangdaoxin1@163.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由多种因素导致的肺泡细胞及毛细血管内皮细胞损伤。富含蛋白质的肺泡水肿液因重吸收困难而过多地聚集在肺泡腔内,是导致ALI患者发展成严重低氧性呼吸功能不全的重要原因,也是治疗难点[1-2]。肺泡上皮钠离子通道(alveolar epithelial sodium channel, ENaC)属于阿米洛利-敏感钠离子通道,它广泛分布于肺泡Ⅱ型上皮细胞中,由α、β、γ3种亚基构成。α亚基承担了最主要的生物学功能,如肺泡内水肿液重吸收和调节细胞内环境。本课题组前期研究表明,胰岛素对肺组织产生一定的保护作用,并进一步发现胰岛素是通过激活雷帕霉素蛋白复合体Ⅱ(mammalian target of rapamycin complex 2, mTORC2)上游的PI3K受体靶点而调控mTORC2/SGK1信号通路,同时使ENaC的表达上调,但具体作用机制待进一步阐释。本研究拟选用胰岛素、mTORC1选择性抑制剂雷帕霉素和mTORC1与mTORC2的双效抑制剂PP242对小鼠ALI模型和A549细胞进行干预,探讨mTORC2/SGK1信号通路、磷酸泛素化连接酶(E3 ubiquitin protein ligase, Nedd4-2)及ENaC-α之间的作用机制,并进一步阐明mTORC2/SGK1途径对肺水清除(alveolar fluid clearance, AFC)方面的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

6~8周龄雄性BALB/c小鼠50只,清洁级,体质量18~22 g,购自重庆医科大学实验动物中心。A549细胞购自中国科学院典型培养细胞库。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。ELISA试剂盒购自欣博盛生物有限公司。RPMI1640培养基和小牛血清购自Gibco公司。rictor单克隆抗体、糖皮质激素调节蛋白激酶1(serum and glucocorticoid-regulated protein kinase1, SGK1)及P-SGK单克隆抗体购自美国Immunoway公司;nedd4-2、ENaC-α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,HRP标记山羊抗兔(抗

鼠)荧光二抗均购自 Abbkine 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 将50只雄性小鼠按随机数表法分成5组,10只/组。分为对照组(Blank 组)、模型组(LPS 组)、胰岛素组(LPS + Insulin 组)、雷帕霉素组(LPS + Rapamycin 组)、PP242 抑制剂组(PP242 组)。按 4 μL/g 的比例腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉,滴鼻给予 5 mg/kg LPS 构建 ALI 小鼠模型。造模 2 h 后,分别腹腔注射生理盐水、0.8 U/kg 胰岛素、4 mg/kg 雷帕霉素、60 mg/kg PP242 分别干预动物模型,并监测血糖。于 8 h 后处死小鼠,收取标本。

1.2.2 细胞分组及处理 将 A549 细胞用含有 10% 小牛血清的 RPMI1640 的培养基培养,待细胞融合度达 90% 以上,将细胞平均接种于 6 孔板中。分别以培养基(对照组)、10 mmol/mL 胰岛素(胰岛素组)、5 mmol/mL 雷帕霉素(雷帕霉素组)、5 mmol/mL PP242(PP242 组)处理 A549 细胞,24 h 后收集细胞。

1.2.3 测定肺湿干质量比(W/D)和肺泡灌洗液(BALF)中 IL-6、TNF-α 水平 处死小鼠,全肺灌洗 3 次,收集肺泡液,离心保存。取出右上肺组织,称湿质量。放于 60 ℃烤箱烘干 24 h 后,称干质量。计算湿干质量比 W/D。按 ELISA 试剂盒说明测定肺泡灌洗液中 IL-6 及 TNF-α 水平。

1.2.4 肺组织病理切片及肺损伤评分 全肺灌洗后取左肺,用 10% 甲醛固定,石蜡包埋、切片,行 HE 染色。光镜下观察各组肺组织病理形态改变。肺损伤评分标准:①肺泡充血;②出血;③肺泡或血管腔内中性粒细胞浸润或聚集;④肺泡壁增厚和/或透明膜形成。依据病变轻重程度评 0 ~ 4 分(0 分:无病变或非常轻微;1 分:轻度病变;2 分:中度病变;3 分:重度病变;4 分:极重度病变)。ALI 总评分为各项评定分数相加总和。

1.2.5 Real-time PCR 检测 SGK1、Nedd4-2 及 ENaC-α 的 mRNA 表达 提取各组 A549 细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,按照 TaKaRa 扩增试剂盒说明书建立 20 μL 反应体系,PCR 扩增目的和内参基因。引物序列见表 1。经预变性、变性、退火、延伸及再循环等过程,用 Bio-Rad 1.6 软件系统分析 SGK1、Nedd4-2、ENaC-α 与 β-actin 相对比值表示 mRNA 转录水平。

1.2.6 Western blot 检测各组细胞 rictor、SGK1、SGK-ser422、Nedd4-2 及 ENaC-α 的蛋白表达 提取总蛋白,经上样、电泳、转膜、封闭后,分别按比例稀释 rictor、SGK1, SGK-ser422、Nedd4-2 及 α-ENaC 的抗体于抗体孵育盒,4 ℃孵育过夜;PBST(或 TBST)洗膜 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记的二抗,37 ℃孵育 1 h;PBST 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 的比值表示各指标的蛋白表达水平。

表 1 引物名称、序列及产物大小

基因	上游引物	下游引物	产物大小(bp)
SGK1	5′-CAACAGCACAACATCCACCTTC-3′	5′-TACAAGACAGCTCCCAGGCAC-3′	114
Nedd4-2	5′-GAGAAACGAGGCTCGAACAC-3	5′-AAAAGTACAGAGTTGACAGCAAAA-3′	289
α-ENaC	5′-CAATGACACCCAGTATAAGATGACC-3′	5′-CAATGAGGCACAGCACCGA-3′	271
β-Actin	5′-AGCGAGCATCCCCCAAAGTT-3′	5′-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3′	285

1.2.7 A549 细胞的免疫荧光染色 细胞计数法将 8×10^4 个细胞均匀接种于放有灭菌载玻片的 24 孔板内,设对照组、胰岛素组、雷帕霉素组及 PP242 组,细胞生长稳定后分别给予药物处理。24 h 后,经 PBS 洗涤和多聚甲醛固定,取出载玻片将其放于湿盒上用山羊血清封闭 30 min,4 ℃孵育一抗过夜。PBS 洗涤3 次后,37 ℃避光孵育二抗 1 h 并封片、成像。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,多样本间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组小鼠肺 W/D 比值

与模型组比较,胰岛素组 W/D 比值明显降低($P<0.05$),PP242 组明显增高($P<0.05$),雷帕霉素组稍微升高,但差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

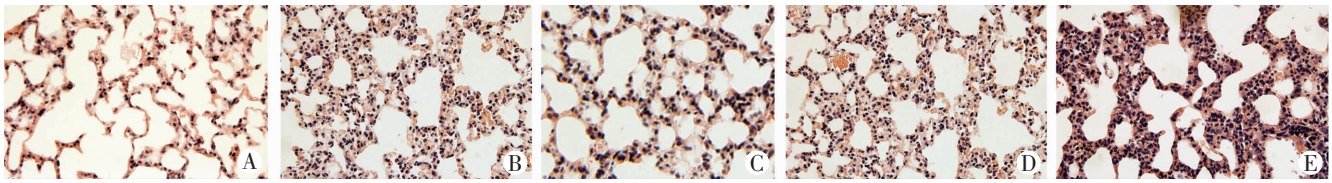
2.2 小鼠肺泡灌洗液(BALF)IL-6 及 TNF-α 的比较

与模型组比较,胰岛素组中 IL-6、TNF-α 值显著降低($P<0.05$);PP242 组中 IL-6、TNF-α 值显著增高($P<0.05$);雷帕霉素组中 IL-6、TNF-α 值略微降低,但差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 2 各组小鼠肺组织 W/D、BALF 中 IL-6 及 TNF-α 水平($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	W/D	IL-6(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)
对照组	5.07 ± 0.38	3.21 ± 0.74	10.03 ± 3.09
模型组	6.19 ± 0.38[a]	77.48 ± 6.04[a]	116.20 ± 13.5[a]
胰岛素组	5.40 ± 0.17[ab]	49.17 ± 8.49[ab]	92.40 ± 8.37[ab]
雷帕霉素组	6.30 ± 0.16	73.79 ± 9.99	111.00 ± 21.36
PP242 组	6.96 ± 0.13[ab]	100.60 ± 14.69[ab]	192.50 ± 16.01[ab]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较



A:对照组;B:模型组;C:胰岛素组;D:雷帕霉素组;E:PP242 组

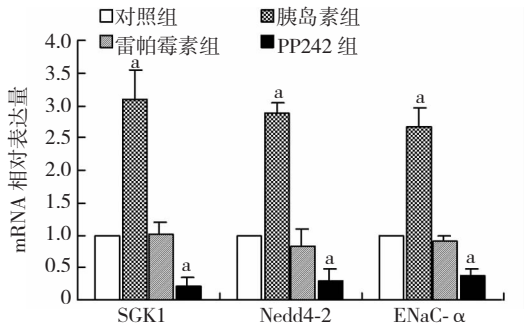
图 1　光镜观察各组小鼠肺组织病理学改变　(HE ×200)

2.3　各组小鼠肺组织病理改变

与模型组肺损伤评分[(3.4 ±0.3)分]比较,PP242 组[(4.5 ±0.1)分]中肺组织炎症、充血水肿等情况明显增多($P<0.05$);胰岛素组[(2.4 ±0.5)分]中肺组织炎症、充血水肿等情况有明显改善($P<0.05$);而雷帕霉素组[(3.6 ±0.6)分]与模型组比较则改变不明显($P>0.05$,图 1)。

2.4　各组 A549 细胞中 SGK1、Nedd4-2 及 ENaC-α 的 mRNA 表达

与对照组比较,胰岛素组中 SGK1 mRNA 表达显著增高($P<0.05$),PP242 组中 SGK1 mRNA 表达显著降低($P<0.05$)。而雷帕霉素组较对照组各指标无明显差异。而各组中下游 Nedd4-2、ENaC-α mRNA 的表达基本与上游 SGK1 变化趋势相同($P<0.05$,图 2)。

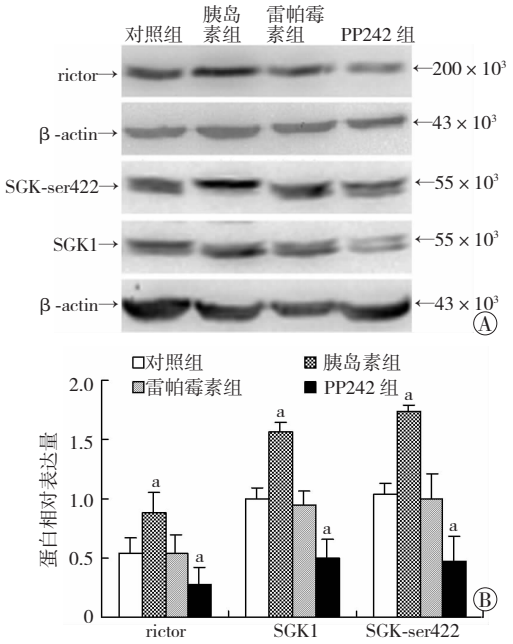


a:$P<0.05$,与对照组比较

图 2　Real-time PCR 检测各组 A549 细胞中 SGK1、Nedd4-2 及 ENaC-α 的 mRNA 表达

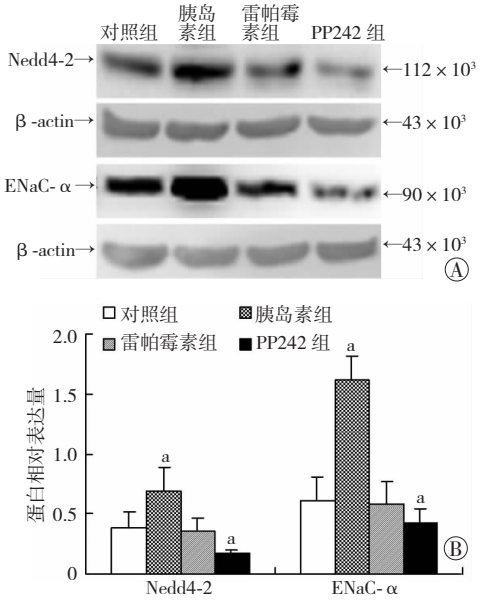
2.5　Western blot 检测各组 A549 细胞中 rictor、SGK-ser422、SGK1、Nedd4-2 及 ENaC-α 蛋白表达

与对照组比较,胰岛素组中 rictor 蛋白表达明显增高($P<0.05$);PP242 组中 rictor 蛋白表达明显减低($P<0.05$),而雷帕霉素组中 rictor 表达较对照组则无明显改变。各组中 SGK-ser422、SGK1、Nedd4-2、ENaC-α 蛋白表达变化趋势与上游 rictor 基本一致(P 值均 <0.05,图 3、4)。



A: Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 3　Western blot 检测各组 A549 细胞中 rictor SGK-ser422、SGK1 的蛋白表达

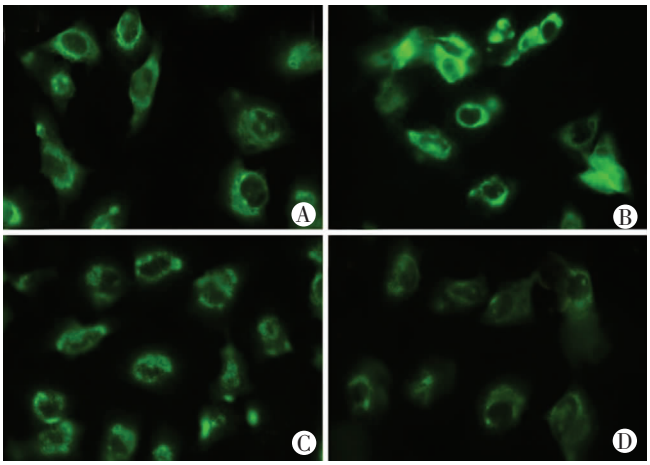


A: Western blot 检测;B:半定量分析　a:$P<0.05$,与对照组比较

图 4　Western blot 检测各组 A549 细胞中的 Nedd4-2、ENaC-α 的蛋白表达

2.6 各组A549细胞中ENaC-α的表达

细胞免疫荧光结果提示:与对照组相比较,胰岛素组中ENaC-α膜蛋白平均荧光强度增高,ENaC-α表达增强,PP242组中ENaC-α表达强度减弱,表达量减弱。而雷帕霉素组中ENaC-α表达与对照组比较无明显差异(图5)。



A:对照组;B:胰岛素组;C:雷帕霉素组;D:PP242组

图5 免疫荧光观察各组A549细胞中膜蛋白ENaC-α荧光强度 (×200)

3 讨论

目前,对于急性肺损伤/呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)的研究主要集中在肺泡间炎症介质和肺水清除两大方面[3]。而在肺水转运方面主要是通过ENaC,Na^+-K^+-ATPase,水通道蛋白(AQP)等方式实现[4]。因此,采用有效的途径增加肺泡上皮细胞中ENaC对肺泡液的清除能力是控制急性肺损伤的恶化和改善难治性低氧血症及发挥其对肺组织保护作用的新方向[5]。mTOR是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶组成的复合物,以mTORC1及mTORC2两种形式存在于生物体中[6-7]。mTORC2复合体中rictor大分子与culin-1链接组成E3泛素连接酶形成rictor/culin-1 E3复合体参与下游SGK1信号蛋白的调控[8-9]。也有研究证明:mTORC2下游的重要节点SGK1属于AGC激酶家族,它选择性地与mTORC2的特异性大分子rictor和Sin1结合发挥生物学效应[10]。

本研究动物实验部分,我们采用胰岛素、雷帕霉素及PP242对ALI小鼠干预并检测各组肺W/D比值、BALF中炎症介质IL-6、TNF-α及病理形态学的变化,发现胰岛素对急性肺损伤具有一定的保护作用,抑制炎症产生的同时也提高了肺水清除能力。相反,PP242(mTORC1与mTORC2的双效抑制剂)干预小鼠ALI模型后加速急性肺损伤的形成和阻碍肺水清除能力。由于尚未发现mTORC2的特异性抑制剂,我们运用雷帕霉素(mTORC1特异性抑制剂)干预小鼠ALI模型,结果显示无明显改变。因此,我们推测ALI小鼠肺组织病理变化、炎症因子改变、肺水清除与mTORC2信号通路和ENaC有密切关系。据部分国外文献报道,ALI/ARDS时,炎症细胞产生IL-6、TNF-α炎症因子呈剂量依赖性下调ENaC-α的表达,影响ENaC的正常功能[11],这与本研究结果相一致。为了进一步探索调控ENaC-α的上游途径,我们在后期的体外实验中发现各组ENaC-α表达水平与SGK1、Nedd4-2成正相关。同时发现当mTORC2抑制时,rictor大分子表达下降,伴随下游SGK1-Ser422磷酸化位点效应的阻断,这与我们前期的部分实验结果一致[12-13]。由此可推论mTORC2-rictor复合大分子对SGK1-Ser422的磷酸化作用是整个SGK1激活过程的限速步骤[14]。活化的SGK1可通过磷酸化泛素连接酶Nedd4-2,促使其下游的Nedd4-2与伴侣蛋白14-3-3结合,而失去结合和泛素化连接ENaC的能力,进而减少ENaC的进一步泛素化降解而使之保留在细胞膜上,使ENaC的生物效应增加[15-16]。当肺泡内水肿液重吸收时,Na^+从肺泡上皮细胞顶膜的ENaC进入到细胞内,在基底侧的Na^+-K^+-ATP酶的协同作用下泵出细胞外,细胞内外渗透压变化的过程驱动了肺泡内水肿液的重吸收。因此,找到有效途径清除肺泡腔内过多的水肿液,对维持良好的肺组织内环境稳态和气体交换功能具有十分重要的意义,一定程度上决定了ALI/ARDS的预后。

本研究结果表明:调控mTORC2/SGK1信号通路使其下游Nedd4-2泛素化,可直接影响ENaC-α的表达,从而调节肺上皮细胞钠水转运和肺水肿液清除,为治疗ALI/ARDS提供新的理论途径。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] Matthay M A, Zemans R L. The acute respiratory distress

syndrome: pathogenesis and treatment [J]. Ann Rev Pathol, 2011, 6: 147 - 163.

[4] Wu Q, Wang F, Hou Y, *et al*. The effect of allogenetic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation on lung aquaporin-1 and -5 in a rat model of severe acute pancreatitis [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(116): 965 - 976.

[5] 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.

[6] Li J, Ren J, Liu X, *et al*. Rictor/mTORC2 signaling mediates TGFbeta1-induced fibroblast activation and kidney fibrosis [J]. Kidney Int, 2015, 88(3): 515 - 527.

[7] Barquilla A, Crespo J L, Navarro M. Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(38): 14579 - 14584.

[8] Moss S C, Lightell D J Jr, Marx S O, *et al*. Rapamycin regulates endothelial cell migration through regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 [J]. J Biol Chem, 2010, 285(16): 11991 - 11997.

[9] Liu L, Das S, Losert W, *et al*. mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion[J]. Dev Cell, 2010, 19(6): 845 - 857.

[10] Cardenas-Rodriguez M, Irigoin F, Osborn D P, *et al*. The Bardet-Biedl syndrome-related protein CCDC28B modulates mTORC2 function and interacts with SIN1 to control cilia length independently of the mTOR complex[J]. Hum Mol Genet, 2013, 22(20): 4031 - 4042.

[11] Drummond H A, Grifoni S C, Abu-Zaid A, *et al*. Renal inflammation and elevated blood pressure in a mouse model of reduced {beta}-ENaC [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 301(2): F443 - F449.

[12] Qi D, He J, Wang D, *et al*. 17ss-estradiol suppresses lipopolysaccharide-induced acute lung injury through PI3K/Akt/SGK1 mediated up-regulation of epithelial sodium channel (ENaC) *in vivo* and *in vitro* [J]. Respir Res, 2014, 15: 159.

[13] Zhu T, Wang D X, Zhang W, *et al*. Andrographolide protects against LPS-induced acute lung injury by inactivation of NF-kappaB [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56407.

[14] He J, Qi D, Wang D X, *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, 331(1): 164 - 175.

[15] Lagnaz D, Arroyo J P, Chavez-Canales M, *et al*. WNK3 abrogates the NEDD4-2-mediated inhibition of the renal Na^+-Cl^- cotransporter [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307(3): F275 - F286.

[16] Deng J, Wang D X, Deng W, *et al*. Regulation of alveolar fluid clearance and ENaC expression in lung by exogenous angiotensin ii [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2012, 181(1): 53 - 61.

(**收稿**:2015-06-04;**修回**:2015-08-24)

(编辑 汪勤俭)