

钠-钾-氯协同转运蛋白 1 相关神经系统疾病研究进展

付旭阳 孙健淇 吕军 石瑞丽

【摘要】 钠-钾-氯协同转运蛋白 1(NKCC1)是阳离子-氯化物协同转运蛋白之一,为介导钠、钾、氯离子转运的膜蛋白,对保持氯离子动态平衡至关重要。病理状态下 NKCC1 表达或活性发生变化,进而调节氯离子细胞内浓度和神经元兴奋性。本文拟对 NKCC1 表达及活性调节方式,以及 NKCC1 在多种神经系统疾病发病机制、治疗中的作用进行综述,以为后续相关研究提供理论线索。

【关键词】 钠钾氯化物协同转运子; DNA 甲基化; γ 氨基丁酸; 神经系统疾病; 综述

Research progress on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter 1 and its relationship to nervous system diseases

FU Xu-yang¹, SUN Jian-qi², LÜ Jun³, SHI Rui-li³

¹Grade 2018 of College of Basic Medicine and Forensic Medicine, ²Department of Physiology, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, Inner Mongolia, China

³Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014030, Inner Mongolia, China

Corresponding author: SHI Rui-li (Email: ruilishi@sina.com)

【Abstract】 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter 1 (NKCC1) which plays an important role in the dynamic balance of Cl^- ions, is one of the cation-chloride cotransporter. It is a membrane protein that transferred the mediates Na^+ , K^+ and Cl^- . The expression quantity or activity of NKCC1 changes with the changes in physiological and pathological conditions, thereby regulating the intracellular concentration of Cl^- and the excitability of neurons. This article reviews the NKCC1's expression and regulation mode of activity as well as the effects of NKCC1 in the pathogenesis of various neurological diseases and the effects in the treatment, aiming at providing theoretical clues for the relevant future studies.

【Key words】 Sodium - potassium - chlorine symporters; DNA methylation; gamma - aminobutyric acid; Nervous system diseases; Review

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81960734), Inner Mongolia Autonomous Region Natural Science Foundation (No. 2017MS0808), and Inner Mongolia Autonomous Region Higher Education Scientific Research Project (No. NJZC17244).

Conflicts of interest: none declared

钠-钾-氯协同转运蛋白 1(NKCC1)作为人体内的主要离子转运体,主要介导钠、钾、氯等离子由细胞外向细胞内转运,对氯离子稳态的调控发挥重要作用。NKCC1 存在多个磷酸化位点和启动子甲基

化位点,与其表达与活性调控密切相关,在多种神经系统疾病的发病过程中均能观察到 NKCC1 的异常变化^[1]。布美他尼作为 NKCC1 特异性抑制剂,可用于多种神经系统疾病的治疗,如低剂量布美他尼用于治疗小儿孤独症,可改善社交、互动和兴趣受限行为^[2];针对动物缺血-再灌注脑损伤模型的研究显示,布美他尼还可通过抑制 NKCC1 活性而发挥脑保护作用^[3]。基于此,本文拟综述 NKCC1 的最新研究进展并分析将 NKCC1 作为治疗靶点治疗神经系统疾病的可能性,为疾病防治提供新的研究思路。

一、NKCC1 的结构与功能

1. NKCC1 结构 钠-钾-氯协同转运蛋白

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2021.03.016

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:81960734);内蒙古自治区自然科学基金资助项目(项目编号:2017MS0808);内蒙古自治区高等学校科学研究项目(项目编号:NJZC17244)

作者单位:014040 包头,内蒙古科技大学基础与法医学院 2018 级(付旭阳),生理学教研室(吕军、石瑞丽);014030 包头,内蒙古科技大学第二附属医院药剂科(孙健淇)

通讯作者:石瑞丽,Email:ruilishi@sina.com

(NKCCs)属于 *Slc12a* 家族,该家族包含数个基因,如编码 NKCC2 的 *Slc12a1* 基因、编码 NKCC1 的 *Slc12a2* 基因、编码钠-氯协同转运蛋白(NCC)的 *Slc12a3* 基因、编码钾-氯协同转运蛋白(KCC)1~4 的 *Slc12a4-7* 基因等^[4]。人类 NKCC1 共包含 1212 个氨基酸残基,转录本为 7.4 kb,相对分子质量 131.4×10^3 ,其编码基因位于第 5 号染色体^[5]。NKCC1 拥有较大的氨基端(N端)和羧基端(C端),N端大部分无序,包含调控区域,其中的氨基酸磷酸化状态决定了 NKCC1 的生物活性,不同物种的 NKCC1 蛋白 N 端具有序列多样性^[6]。人类细胞试验显示,NKCC1 蛋白的 N 端具有糖基化修饰,约 25% 的 NKCC1 蛋白 N 端为复杂型 N-糖基化,其余 75% 的 NKCC1 蛋白 N 端为高甘露糖糖基化和混合糖基化^[7]。NKCC1 蛋白经翻译修饰后,约 10% 到达质膜,且大部分为高甘露糖型,其余 90% 的 NKCC1 蛋白分布在细胞内,其 N 端糖基化在 NKCC1 的协同转运功能中发挥重要作用,但尚无证据表明糖基化与蛋白质在细胞内的定位有关^[7]。NKCC1 蛋白 C 端高度保守且与阳离子-氯化物协同转运蛋白家族呈高度同源,其作用目前尚不明确,期待未来进行深入研究探讨。

2. NKCC1 功能 NKCC1 表达广泛,除外分泌上皮细胞,其在心脏、骨骼肌神经元等非分泌上皮细胞中也有分布。既往研究证明,NKCC1 表达于中枢神经系统的全脑神经元、神经胶质细胞、脉络丛上皮细胞、血管内皮细胞和周围神经系统的背根神经节感觉神经元^[4];而近期有研究发现,脑卒中、胶质细胞瘤等中枢神经系统疾病亦可导致 NKCC1 表达异常^[1,8],同时 NKCC1 还参与不同组织细胞的离子稳态调节、细胞体积和质量调节,以及神经元信号转导等正常生理功能^[9]。正常情况下, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶提供能量并将钠离子和钾离子转运至细胞外,而 NKCC1 以继发主动转运的方式消耗能量进行离子跨膜转运,介导钠、钾、氯离子向细胞内转运,调节离子稳态^[9]。研究显示,NKCC1 通过离子转运方式改变细胞渗透压,调节细胞体积,在高渗环境下,细胞失水皱缩需触发适当的调节机制以增大细胞体积,此时 NKCC1 被激活,介导离子向细胞内泵入,完成细胞体积的调节;当细胞处于低渗状态时,细胞吸水膨胀,NKCC1 呈低活性状态,相反,KCC2 被激活,介导钾离子和氯离子外流,渗透压降低,水分子随之流出细胞,恢复细胞体积^[10]。哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 1(mTOR1)受上游的生长因子和必需氨基

酸调控,调节细胞生长^[11],近期研究发现^[12]NKCC1 对 L 型氨基酸转运载体 1(LAT1)和细胞表面抗原 4F2 重链(4F2hc)所形成的 LAT1-4F2hc 复合体发挥负调控作用,其在调控 LAT1 的同时降低 mTOR1 活性,通过此途径参与细胞的生长调节。 γ -氨基丁酸(GABA)是重要的抑制性中枢神经递质,其受体为离子门控通道,当该通道被激活时,氯离子可由此流出或流入细胞。在正常生理状态下,成人中枢神经系统 KCC2 呈高表达、NKCC1 呈低表达^[4],当氯离子细胞内浓度低于细胞外时,GABA 受体被激活,氯离子内流,细胞超极化;而在病理状态下,NKCC1 表达升高,氯离子转运至细胞内,细胞内氯离子浓度升高,此时若 GABA 受体被激活,反使氯离子内流减少、胞膜超极化水平降低,甚至发生氯离子外流、细胞去极化^[13]。上述研究提示,NKCC1 可通过调控细胞内氯离子浓度,改变中枢神经系统 GABA 的生物学效应。不同神经元中 NKCC1 的作用有所不同,例如在视交叉上核中,大部分神经元可产生 GABA 作为神经元之间的转导信号,GABA 亦可使大部分神经元产生抑制性电位^[14],但有研究显示,视交叉上核背侧和腹侧的 GABA 可以产生兴奋性电位,并且这种兴奋性作用可被 NKCC1 抑制剂布美他尼所阻断^[15]。总结上述两项研究可以发现,GABA 兴奋和抑制电位的产生系由 NKCC1 功能状态所决定的,NKCC1 活跃时,氯离子浓度升高、产生兴奋性电位,反之,则产生抑制性电位,提示这两种不同的电位与 NKCC1 所介导的不同的细胞内氯离子浓度变化有关。晚近研究显示,NKCC1 表达受视交叉上核内环境光照调控^[16],NKCC1 mRNA 在视网膜色素上皮细胞亦存在节律性表达,NKCC1 表达量的改变可导致 GABA 产生不同的生物学效应,进而参与调节昼夜节律^[17]。

二、NKCC1 表达与活性的调控

NKCC1 在人类胎儿期呈高表达,KCC2 呈低表达,随着年龄的增长,NKCC1 表达逐渐降低,KCC2 表达逐渐升高,使 GABA 介导的神经元离子电化学反应由超极化向去极化转变^[18]。研究显示,在胎儿成长过程中其体内的 NKCC1 活性随着母体循环中催产素水平的增加而逐渐降低,使 GABA 能信号产生抑制性电位,后者在分娩过程中产生的镇痛和神经保护作用可帮助胎儿适应分娩时的不良刺激,此为胎儿抗神经损伤的一种生理学机制^[19]。而在病理或特定环境下,NKCC1 的表达会因蛋白质磷酸

化、DNA 甲基化或炎性细胞因子刺激等因素的影响而发生改变^[20-22]。

1. NKCC1 的表达调节 研究显示,转录因子信号转导及转录激活蛋白 2(STAT2)的可结合位点位于 NKCC1 转录起始点上游的 30 和 500 bp 处^[23],但有关 STAT2 对 NKCC1 表达变化的影响至今尚不十分清楚。DNA 甲基化是表观遗传学机制之一,由 DNA 甲基转移酶(DNMT)催化完成。DNA 高甲基化与基因转录阻遏相关,DNA 低甲基化可促进基因转录。在正常情况下,大鼠 *Slc12a* 启动子甲基化水平随其月龄的增加而逐渐升高,随着 DNA 甲基转移酶活性的增强,可使 NKCC1 的表达维持在低水平状态;而自发性高血压模型大鼠体内的 DNA 甲基转移酶活性则随其月龄的增加而呈逐渐衰减趋势,*Slc12a* 基因启动子呈低甲基化水平,这可能是 NKCC1 在自发性高血压人群中呈高表达的重要病理生理学机制^[24]。Unal 等^[25]发现,与健康对照组相比,颞叶癫痫患者病灶组织中 NKCC1 甲基化水平表达异常,提示 NKCC1 可能通过甲基化改变其表达量,从而参与难治性颞叶癫痫的发病过程。Lee 等^[1]采用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-azadC 处理正常大鼠皮质组织切片,发现 5-azadC 可显著提高 NKCC1 的表达;对大脑中动脉闭塞(MCAO)缺血大鼠模型的观察亦发现脑缺血损伤大鼠皮质 NKCC1 相关 mRNA 和蛋白质表达水平均升高,且患侧大脑皮质 *Slc12a* 外显子 1 区 DNA 甲基化程度明显低于健侧,推测与 NKCC1 mRNA 及其蛋白质重新表达有关。该研究结果提示,DNA 甲基化参与对 NKCC1 表达的调控。除此之外,一些炎性因子亦与 NKCC1 的表达变化存在一定关联性。Weidenfeld 和 Kuebler^[26]发现,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎性因子可上调急性肺损伤模型小鼠 NKCC1 的表达水平,TNF- α 缺陷模型小鼠小脑及大脑皮质 NKCC1 表达均降低,注射 TNF- α 后其 NKCC1 表达显著升高^[27],提示 TNF- α 具有促进 NKCC1 表达的作用。原代星形胶质细胞实验显示,TNF- α 或白细胞介素- 1β (IL- 1β)可显著增加 NKCC1 相关 mRNA 和蛋白质的表达,并可随其体内浓度的降低而下调^[28]。但上述研究仍不能明确炎性因子激活 NKCC1 表达的作用是否具有特异性,其他细胞因子是否也参与炎性损伤时对 NKCC1 表达的调节。

2. NKCC1 的活性调节 1992 年, Lytle 和 Forbush^[29]首次报告 NKCC1 磷酸化对其功能的影

响: NKCC1 抑制剂布美他尼注射于经高渗溶液皱缩的鲨鱼直肠腺细胞内即可见细胞内钾离子浓度迅速升高,该作者认为细胞内钾离子浓度的变化与 NKCC1 蛋白中丝氨酸和苏氨酸残基发生磷酸化有关。后续研究发现, NKCCs 家族的生物活性与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(WNK)、STE20/SPS-1 相关性脯氨酸-丙氨酸激酶(Spak)和氧化应激反应激酶(OSR1)磷酸化有关。与正常小鼠相比, *Spak* 基因敲除小鼠感觉神经元 NKCC1 活性下降 2 倍,表明 Spak 参与了 NKCC1 的活化过程^[30]。WNK3 激活 NKCC1 的信号转导通路需 Spak/OSR1 的参与, Spak/OSR1 与 WNK3 在其 Thr233 和 Thr185 两个氨基酸位点结合,通过已磷酸化的 WNK3 T 环激活 Spak/OSR1,活化的 Spak/OSR1 磷酸化 NKCC1 氨基末端多个苏氨酸(Thr203/Thr207/Thr212),从而激活 NKCC1^[31]。根据 Gagnon 和 Delpire^[32]在 2010 年的研究报告,蛋白磷酸酶参与 NKCC1 蛋白的去磷酸化,并进一步证实 NKCC1 的去磷酸化机制。晚近研究表明,与 Spak 结合的钙结合蛋白 39(Cab39)能够激活 NKCC1,注射编码 Cab39 的 cDNA 可使 Spak 分子形成二聚体,从而激活 NKCC1^[33]。其他通过磷酸化调节 NKCC1 活性的因素包括环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、钙离子等第二信使^[19],但在不同物种、组织中其影响有所不同^[5],第二信使通过与细胞内信号级联的组织特异性中间体相互作用,而并非与离子本身相互作用而影响 NKCC1 的活性表达。

三、NKCC1 与神经系统疾病

研究表明,在组织器官损伤过程中均有 NKCC1 的异常表达,且参与多种疾病的病理生理学机制,例如急性肺损伤^[16]、肝性脑病^[17]、铅中毒^[23]等,尤其是脑卒中、癫痫、胶质细胞瘤或精神分裂症等中枢神经系统疾病与其关系密切相关。

1. NKCC1 与脑卒中 离子稳态失衡是脑缺血诱导细胞损伤的重要机制,而阳离子-氯化物协同转运蛋白不仅在神经元氯离子稳态调节中发挥作用,而且对维持血-脑屏障通透性、星形胶质细胞和神经元细胞内正常离子浓度,以及细胞容积同样至关重要^[34]。缺血性脑损伤发生后,细胞外钾离子浓度升高,大量谷氨酸自细胞内释放,胞内钙、钠、氯离子浓度超负荷;此时,虽然脑组织缺血-缺氧引起的能量代谢障碍可使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶分泌受抑制,但 NKCC1 仍可通过表达增加和活性增强进一步介导钠离子内流,使细胞内渗透压增高,由于细胞外水

分向细胞内转移导致细胞水肿^[35],而且血-脑屏障上的NKCC1过表达使脑组织进一步摄取水分,脑水肿加剧,患者可因颅内高压而诱发脑疝并危及生命。付学军等^[36]通过对大脑中动脉闭塞大鼠模型观察发现,缺血-缺氧中心区星形胶质细胞的死亡方式主要以破碎为主,所见肿胀、核溶解等表现与胀亡的形态学变化相吻合,提示NKCC1导致的细胞水肿与缺血-缺氧中心区星形胶质细胞胀亡密切相关,而神经胶质细胞及血管内皮细胞肿胀可导致细胞间紧密连接破坏,进而破坏血-脑屏障,加重脑水肿^[37]。此外,NKCC1导致的细胞内钠离子聚积可迅速激活 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白的反向转运,使钙离子大量进入细胞内,细胞内钙离子超载,继而引起细胞损伤^[38]。此外,脑卒中后的炎症反应也可促进NKCC1的表达^[27],加剧细胞损伤。晚近研究表明,新型NKCC1抑制剂STS666对缩小脑梗死体积、保护神经元具有明显疗效^[22],因此NKCC1可能成为治疗急性缺血性卒中的重要靶点。Zeniya等^[39]认为,血管紧张素II(Ang II)具有促进Spak和NKCC1磷酸化的作用,这可能是NKCC1在缺血性卒中合并高血压患者脑组织中呈高表达的原因之一,因此对于缺血性卒中合并高血压的患者,以NKCC1为靶点可能疗效更佳。有研究显示,NKCC1亦可作为缺血性卒中后抑郁的治疗靶点,呈高表达的白细胞介素-18(IL-18)可通过IL-18受体/NKCC1信号转导通路引起卒中后抑郁,若以IL-18及其下游的NKCC1作为靶点,可能是预防和治疗缺血性卒中后抑郁颇具前景的策略^[40],但相关机制尚待深入研究。

2. NKCC1与癫痫发作 癫痫发作是颅脑创伤最常见的并发症之一,发病机制迄今尚未阐明,可能与炎症、水肿、出血等因素有关,抗癫痫药物(AEDs)是主要治疗手段,药物治疗欠佳或无效者可行外科手术;然而,无论是药物治疗还是外科手术目前均未达到完全治愈的效果。GABA作为神经系统的重要抑制性递质,通过转运氯离子而完成其功能,如上所述,NKCC1对氯离子的表达量决定其在调节GABA能信号中的作用,故采用NKCC1作为治疗癫痫的靶点,具有一定的理论基础^[41]。研究显示,颅脑创伤后NKCC1表达上调、KCC2表达下调,可导致GABA受体介导的抑制作用减弱,使癫痫发作风险增加^[42]。动物实验表明,与NKCC1基因敲除小鼠相比,未敲除NKCC1基因小鼠癫痫发生率高达70%,而NKCC1基因敲除小鼠则无癫痫发作^[42]。而

同类研究并未观察到NKCC1在质膜上的表达增加,故认为NKCC1的高表达可能并非促进神经元过度兴奋的主要因素^[43]。由此可见,目前尚无法确定NKCC1异常表达与癫痫发作之间存在关联性,但已有临床试验将布美他尼应用于治疗新生儿癫痫,因其可通过降低神经元内氯离子浓度而增强GABA的抑制作用,从而降低癫痫发作风险^[44],提示NKCC1可能成为临床治疗癫痫的新方向^[45],丰富了癫痫治疗的选择性。

3. NKCC1与胶质细胞瘤 胶质母细胞瘤(GBM)是中枢神经系统最为常见亦是最具侵袭性的原发性肿瘤,其对脑组织具有极强的侵袭性和浸润性。研究证实,在胶质母细胞瘤细胞的迁移过程中,为了便于在脑组织中“穿行”可通过离子转运而不断调节其体积大小,NKCC1则可通过氯离子转运快速调节肿瘤细胞的这种体积变化^[28]。NKCC1在胶质母细胞瘤中呈高表达,NKCC1抑制剂可降低肿瘤细胞的扩散能力^[8]。上皮间质转化(EMT)可使上皮细胞的细胞极性和细胞黏附功能消失,使上皮细胞获得迁移能力,提示上皮间质转化是肿瘤转移的关键步骤^[46]。晚近研究发现,ras相关蛋白Rac1和转化蛋白RhoA通路在上皮间质转化进程中发挥关键作用,NKCC1通过Rac1和RhoA信号转导通路调控胶质母细胞瘤上皮间质转化过程^[47],从而促进肿瘤细胞的迁移。抗肿瘤药物实验发现,替莫唑胺可降低肿瘤细胞中钾离子和氯离子浓度,使肿瘤细胞体积缩小并诱导其凋亡,同时可激活WNK-NKCC1通路;NKCC1特异性抑制剂布美他尼可使细胞内钾离子和氯离子丢失加剧,促进肿瘤细胞凋亡^[48]。总之,NKCC1可通过调节细胞体积,以及Rac1和RhoA信号转导通路参与胶质母细胞瘤的侵袭过程,抑制NKCC1表达,促进肿瘤细胞凋亡^[49-50],因此针对胶质母细胞瘤侵袭能力的治疗,以NKCC1作为靶点具有可行性。

4. NKCC1与精神分裂症 精神分裂症是一类重型精神病,其发病机制尚不十分清楚,通常认为与神经递质代谢紊乱有关,尤其是前额叶皮质GABA代谢异常可能与精神分裂症的神经功能障碍有关^[51]。有研究显示,精神分裂症患者海马KCC2 mRNA表达下调、NKCC1/KCC2比值增加,从而影响GABA的分泌与代谢,引起神经功能障碍^[52]。Spak是NKCC1发生磷酸化并被激活的“催化剂”,Spak基因敲除增强了精神分裂症模型小鼠的探索能力,而

且大脑 KCC2 表达水平显著升高,提示改变 NKCC1/KCC2 比值可能改善小鼠精神分裂症相关症状^[53]。研究发现,精神分裂症患者脑组织中的 NKCC1 随着 WNK3 和 OSR1 mRNA 表达的上调而升高,使 GABA 介导的细胞电位改变,参与精神分裂症的发生与发展^[54]。推测 NKCC1 和 KCC2 可能是调节 GABA 能信号的关键环节,但是否参与神经分裂症的发病,有待进一步深入研究。

综上所述,作为重要的离子转运体,NKCC1 表达变化受 DNA 甲基化和蛋白质磷酸化等多种因素的调节,通过对 NKCC1 的研究增进了对氯离子稳态调节的理解。NKCC1 通过调节 GABA 能信号传导和细胞体积参与多种生理活动和神经系统疾病过程,因此以 NKCC1 为治疗靶点具有重要研究意义及应用价值。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Lee HA, Hong SH, Kim JW, Jang IS. Possible involvement of DNA methylation in NKCC1 gene expression during postnatal development and in response to ischemia [J]. *J Neurochem*, 2010, 114:520-529.
- [2] James BJ, Gales MA, Gales BJ. Bumetanide for autism spectrum disorder in children: a review of randomized controlled trials[J]. *Ann Pharmacother*, 2019, 53:537-544.
- [3] Yu Y, Fu P, Yu Z, Xie M, Wang W, Luo X. NKCC1 inhibition attenuates chronic cerebral hypoperfusion-induced white matter lesions by enhancing progenitor cells of oligodendrocyte proliferation[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64:449-458.
- [4] Virtanen MA, Uvarov P, Hübner CA, Kaila K. NKCC1, an elusive molecular target in brain development: making sense of the existing data[J]. *Cells*, 2020, 9:2607.
- [5] Markadieu N, Delpire E. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters[J]. *Pflugers Arch*, 2014, 466:91-105.
- [6] Delpire E, Austin TM. Kinase regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransport in primary afferent neurons[J]. *J Physiol*, 2010, 588 (Pt 18):3365-3373.
- [7] Singh R, Almutairi MM, Pacheco-Andrade R, Almiahuob MY, Di Fulvio M. Impact of hybrid and complex N-Glycans on cell surface targeting of the endogenous chloride cotransporter Slc12a2[J]. *Int J Cell Biol*, 2015:ID505294.
- [8] Sun H, Long S, Wu B, Liu J, Li G. NKCC1 involvement in the epithelial-to-mesenchymal transition is a prognostic biomarker in gliomas[J]. *PeerJ*, 2020, 8:e8787.
- [9] Olde Engberink AHO, Meijer JH, Michel S. Chloride cotransporter KCC2 is essential for GABAergic inhibition in the SCN[J]. *Neuropharmacology*, 2018, 138:80-86.
- [10] Chew TA, Orlando BJ, Zhang J, Latorraca NR, Wang A, Hollingsworth SA, Chen DH, Dror RO, Liao M, Feng L. Structure and mechanism of the cation-chloride cotransporter NKCC1[J]. *Nature*, 2019, 572:488-492.
- [11] Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24:400-406.
- [12] Demian WL, Persaud A, Jiang C, Coyaud É, Liu S, Kapus A, Kafri R, Raught B, Rotin D. The ion transporter NKCC1 links cell volume to cell mass regulation by suppressing mTORC1 [J]. *Cell Rep*, 2019, 27:1886-1896.
- [13] Wilke BU, Kummer KK, Leitner MG, Kress M. Chloride - the underrated ion in nociceptors[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14:287.
- [14] Albers HE, Walton JC, Gamble KL, McNeill JT, Hummer DL. The dynamics of GABA signaling: revelations from the circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2017, 44:35-82.
- [15] Choi HJ, Lee CJ, Schroeder A, Kim YS, Jung SH, Kim JS, Kim DY, Son EJ, Han HC, Hong SK, Colwell CS, Kim YI. Excitatory actions of GABA in the suprachiasmatic nucleus [J]. *J Neurosci*, 2008, 28:5450-5459.
- [16] McNeill JT 4th, Walton JC, Ryu V, Albers HE. The excitatory effects of GABA within the suprachiasmatic nucleus: regulation of Na-K-2Cl cotransporters (NKCCs) by environmental lighting conditions[J]. *J Biol Rhythms*, 2020, 35:275-286.
- [17] Miličević N, Duursma A, Ten Asbroek ALMA, Felder-Schmittbuhl MP, Bergen AA. Does the circadian clock make RPE-mediated ion transport "tick" via SLC12A2 (NKCC1)[J]? *Chronobiol Int*, 2019, 36:1592-1598.
- [18] Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3:728-739.
- [19] Kumar V, Naik RS, Hillert M, Klein J. Effects of chloride flux modulators in an in vitro model of brain edema formation [J]. *Brain Res*, 2006, 1122:222-229.
- [20] Shen CH, Lin JY, Chang YL, Wu SY, Peng CK, Wu CP, Huang KL. Inhibition of NKCC1 modulates alveolar fluid clearance and inflammation in ischemia-reperfusion lung injury via TRAF6-mediated pathways[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2049.
- [21] Genç F, Kara M, Ünal Y, Uygur Küçükseymen E, Biçer Gömceli Y, Kaynar T, Tosun K, Kutlu G. Methylation of cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2 in patients with juvenile myoclonic epilepsy [J]. *Neurol Sci*, 2019, 40:1007-1013.
- [22] Huang H, Bhuiyan MIH, Jiang T, Song S, Shankar S, Taheri T, Li E, Schreppel P, Hintersteiner M, Yang SS, Lin SH, Molyneaux BJ, Zhang Z, Erker T, Sun D. A novel Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 1 inhibitor STS66* reduces brain damage in mice after ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2019, 50:1021-1025.
- [23] Randall J, Thorne T, Delpire E. Partial cloning and characterization of Slc12a2: the gene encoding the secretory Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273:C1267-1277.
- [24] Cho HM, Lee HA, Kim HY, Han HS, Kim IK. Expression of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1 is epigenetically regulated during postnatal development of hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2011, 24:1286-1293.
- [25] Unal Y, Kara M, Genç F, Aslan Oztruk D, Biçer Gomceli Y, Kaynar T, Tosun K, Kutlu G. The methylation status of NKCC1 and KCC2 in the patients with refractory temporal lobe epilepsy [J]. *Ideggyogy Sz*, 2019, 72:181-186.
- [26] Weidenfeld S, Kuebler WM. Cytokine-regulation of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter 1 and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-potential role in pulmonary inflammation and edema formation[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:393.
- [27] Pozdeev VI, Lang E, Görg B, Bidmon HJ, Shinde PV, Kircheis G, Herebian D, Pfeffer K, Lang F, Häussinger D, Lang KS, Lang PA. TNF α induced up-regulation of Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ cotransporter NKCC1 in hepatic ammonia clearance and cerebral ammonia toxicity[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:7938.
- [28] Huang LQ, Zhu GF, Deng YY, Jiang WQ, Fang M, Chen CB, Cao W, Wen MY, Han YL, Zeng HK. Hypertonic saline alleviates cerebral edema by inhibiting microglia-derived TNF- α and IL-1 β -induced Na-K-Cl cotransporter up-regulation[J]. *J*

- Neuroinflammation, 2014, 11:102.
- [29] Lytle C, Forbush B 3rd. The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. regulation by direct phosphorylation[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267:25438-25443.
- [30] Wang H, Yan Y, Kintner DB, Lytle C, Sun D. GABA-mediated trophic effect on oligodendrocytes requires Na-K-2Cl cotransport activity[J]. *J Neurophysiol*, 2003, 90:1257-1265.
- [31] Wu D, Lai N, Deng R, Liang T, Pan P, Yuan G, Li X, Li H, Shen H, Wang Z, Chen G. Activated WNK3 induced by intracerebral hemorrhage deteriorates brain injury maybe via WNK3/SPAK/NKCC1 pathway [J]. *Exp Neurol*, 2020, 332: 113386.
- [32] Gagnon KB, Delpire E. Multiple pathways for protein phosphatase 1 (PP1) regulation of Na - K - 2Cl cotransporter (NKCC1) function: the N - terminal tail of the Na - K - 2Cl cotransporter serves as a regulatory scaffold for Ste20-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) AND PP1[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285:14115-14121.
- [33] Ponce-Coria J, Gagnon KB, Delpire E. Calcium-binding protein 39 facilitates molecular interaction between Ste20p proline alanine-rich kinase and oxidative stress response 1 monomers [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 303:C1198-1205.
- [34] Zagrean AM, Grigoras IF, Iesanu MI, Ionescu RB, Chitimus DM, Haret RM, Ianos B, Ceanga M, Zagrean L. Neuronal transmembrane chloride transport has a time - dependent influence on survival of hippocampal cultures to oxygen-glucose deprivation[J]. *Brain Sci*, 2019, 9:360.
- [35] Khanna A, Kahle KT, Walcott BP, Gerzanich V, Simard JM. Disruption of ion homeostasis in the neuroglial unit underlies the pathogenesis of ischemic cerebral edema [J]. *Transl Stroke Res*, 2014, 5:3-16.
- [36] Fu XJ, Chu XF, Qi CJ. Oncosis-death mode of astrocytes under permanent focal cerebral ischemia[J]. *Zhonghua Shen Jing Yi Xue Za Zhi*, 2005, 4:979-982.[付学军, 褚晓凡, 齐传洁. 永久性局灶性缺血性星形胶质细胞的死亡方式[J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4:979-982.]
- [37] Luo WD, Min JW, Huang WX, Wang X, Peng YY, Han S, Yin J, Liu WH, He XH, Peng BW. Vitexin reduces epilepsy after hypoxic ischemia in the neonatal brain via inhibition of NKCC1 [J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15:186.
- [38] Kintner DB, Luo J, Gerds J, Ballard AJ, Shull GE, Sun D. Role of Na⁺ - K⁺ - Cl⁻ cotransport and Na⁺/Ca²⁺ exchange in mitochondrial dysfunction in astrocytes following in vitro ischemia[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292:C1113-1122.
- [39] Zeniya M, Sohara E, Kita S, Iwamoto T, Susa K, Mori T, Oi K, Chiga M, Takahashi D, Yang SS, Lin SH, Rai T, Sasaki S, Uchida S. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II [J]. *Hypertension*, 2013, 62:872-878.
- [40] Wu D, Zhang G, Zhao C, Yang Y, Miao Z, Xu X. Interleukin-18 from neurons and microglia mediates depressive behaviors in mice with post - stroke depression [J]. *Brain Behav Immun*, 2020, 88:411-420.
- [41] Zeng X, Hu K, Chen L, Zhou L, Luo W, Li C, Zong W, Chen S, Gao Q, Zeng G, Jiang D, Li X, Zhou H, Ouyang DS. The effects of ginsenoside compound K against epilepsy by enhancing the γ -aminobutyric acid signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1020.
- [42] Wang F, Wang X, Shapiro LA, Cotrina ML, Liu W, Wang EW, Gu S, Wang W, He X, Nedergaard M, Huang JH. NKCC1 up-regulation contributes to early post - traumatic seizures and increased post-traumatic seizure susceptibility[J]. *Brain Struct Funct*, 2017, 222:1543-1556.
- [43] González MI. Regulation of the cell surface expression of chloride transporters during epileptogenesis [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 628:213-218.
- [44] Pressler RM, Boylan GB, Marlow N, Blennox M, Chiron C, Cross JH, de Vries LS, Hallberg B, Hellström-Westas L, Jullien V, Livingstone V, Mangum B, Murphy B, Murray D, Pons G, Rennie J, Swarte R, Toet MC, Vanhatalo S, Zohar S; NEonatal seizure treatment with Medication Off - patent (NEMO) consortium. Bumetanide for the treatment of seizures in newborn babies with hypoxic ischaemic encephalopathy (NEMO): an open-label, dose finding, and feasibility phase 1/2 trial[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14:469-477.
- [45] Gharaylou Z, Tafakhori A, Agah E, Aghamollai V, Kebriaeezadeh A, Hadjighassem M. A preliminary study evaluating the safety and efficacy of bumetanide, an NKCC1 inhibitor, in patients with drug - resistant epilepsy [J]. *CNS Drugs*, 2019, 33:283-291.
- [46] Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities[J]. *Front Med*, 2018, 12: 361-373.
- [47] Ma H, Li T, Tao Z, Hai L, Tong L, Yi L, Abeysekera IR, Liu P, Xie Y, Li J, Yuan F, Zhang C, Yang Y, Ming H, Yu S, Yang X. NKCC1 promotes EMT - like process in GBM via RhoA and Rac1 signaling pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234:1630-1642.
- [48] Luo L, Wang J, Ding D, Hasan MN, Yang SS, Lin SH, Schreppel P, Sun B, Yin Y, Erker T, Sun D. Role of NKCC1 activity in glioma K + homeostasis and cell growth: new insights with the bumetanide-derivative STS66[J]. *Front Physiol*, 2020, 11:911.
- [49] Ilkhanizadeh S, Sabelström H, Miroshnikova YA, Frantz A, Zhu W, Idilli A, Lakins JN, Schmidt C, Quigley DA, Fenster T, Yuan E, Trzeciak JR, Saxena S, Lindberg OR, Mouw JK, Burdick JA, Magnitsky S, Berger MS, Phillips JJ, Arosio D, Sun D, Weaver VM, Weiss WA, Persson AI. Antisecretory factor-mediated inhibition of cell volume dynamics produces antitumor activity in glioblastoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16:777-790.
- [50] Luo L, Guan X, Begum G, Ding D, Gayden J, Hasan MN, Fiesler VM, Dodelson J, Kohanbash G, Hu B, Amankulor NM, Jia W, Castro MG, Sun B, Sun D. Blockade of cell volume regulatory protein NKCC1 increases TMZ - induced glioma apoptosis and reduces astrogliosis[J]. *Mol Cancer Ther*, 2020, 19:1550-1561.
- [51] Diemel SJ, Lewis DA. Alterations in cortical interneurons and cognitive function in schizophrenia [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 131:104208.
- [52] Hyde TM, Lipska BK, Ali T, Mathew SV, Law AJ, Metitiri OE, Straub RE, Ye T, Colantuoni C, Herman MM, Bigelow LB, Weinberger DR, Kleinman JE. Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia[J]. *J Neurosci*, 2011, 31:11088-11095.
- [53] Yang SS, Huang CL, Chen HE, Tung CS, Shih HP, Liu YP. Effects of SPAK knockout on sensorimotor gating, novelty exploration, and brain area-dependent expressions of NKCC1 and KCC2 in a mouse model of schizophrenia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2015, 61:30-36.
- [54] Arion D, Lewis DA. Altered expression of regulators of the cortical chloride transporters NKCC1 and KCC2 in schizophrenia[J]. *Arch Gen Psychiatry*, 2011, 68:21-31.

(收稿日期:2021-02-26)

(本文编辑:袁云)