

·综述·

钠钾氯同向转运蛋白 -1 与脑水肿

黄林强 曾红科

【关键词】 脑水肿; 钠钾氯同向转运蛋白 -1; 布美他尼; 神经元; 星形胶质细胞; 血管内皮细胞

脑水肿即水在大脑细胞内外病理性蓄积。脑水存在于脑室系统、蛛网膜下腔、细胞间隙、脑细胞 4 个相互影响的区域当中, 大脑内环境轻微的变化就会使脑水重新分布或血脑屏障通透性发生变化而引起脑水肿。脑水肿在临床上非常常见, 它作为继发于缺血缺氧性脑病、颅脑创伤等疾病最常见的并发症之一, 是致残及导致死亡的重要原因。脑水肿是一个复杂渐进的过程, 可分为细胞毒性水肿、离子性水肿及血管源性水肿^[1]。许多离子通道、交换蛋白及转运蛋白都参与了脑水肿的形成, 其中, 钠钾氯同向转运蛋白 -1 (NKCC1) 就参与了这个过程, 它广泛表达于调节血脑屏障通透性的星形胶质细胞、神经元及血管内皮细胞上^[2-3], 在调节脑细胞体积及细胞内外离子平衡方面起着重要作用^[4]。各种体内外实验研究表明, 抑制 NKCC1 以及各种可能调节 NKCC1 的机制可迅速且明显减轻脑水肿及减少神经元损伤。预示着非渗透性脱水机制对传统的渗透性脱水机制的挑战, 为脑水肿的个体化、特异靶向治疗提供理论依据。

1 NKCC1 在脑水肿形成机制及各种常见脑水肿中的作用

1.1 NKCC1 与脑水肿形成机制: 大脑主要由神经胶质细胞及神经元组成, 大脑在缺血缺氧、创伤或者肝衰竭时, 小胶质细胞被激活并释放细胞因子、活性氮及氧自由基等炎症介质, 从而激活了星形胶质细胞、血管内皮细胞和神经元内的

氧化应激反应激酶 (OSR1)、脯氨酸 - 丙氨酸丰富激酶 (SPAK)、丝裂素活化蛋白激酶 (MAPKs), 这些激酶诱导 NKCC1 的表达和磷酸化, 磷酸化的 NKCC1 发生细胞膜移位, 从胞膜内移至胞质, 同时将钠离子 (Na^+)、钾离子 (K^+)、氯离子 (Cl^-) 和水转运至星形胶质细胞、血管内皮细胞和神经元内, 导致这些细胞水肿^[5]。

传统上脑水肿的进程分为细胞毒性水肿及血管源性水肿, 而最新观点认为脑水肿的形成过程是一个复杂的阶段式过程, 由细胞毒性水肿进展到离子性水肿, 最后形成血管源性水肿^[1]。

细胞毒性水肿的形成主要是因为 Na^+ 和其他分子进入细胞内并蓄积。在生理状态下, 由于细胞膜对离子的选择通透性以及钠泵 ($\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶) 的活性, 使得细胞外 Na^+ 浓度远高于细胞内, 但缺血缺氧继发性代谢改变激活了星形胶质细胞和神经元上的一些离子通道及转运蛋白, 其中 NKCC1 就是参与钠转运的主要转运蛋白之一, 它促使 Na^+ 内流, 为维持细胞内外的电解质及渗透压的平衡, 导致 Cl^- 及水分别通过 Cl^- 通道蛋白和水通道蛋白 (AQP) 进入到胞内。此时血脑屏障通透性尚未改变, 只是将大脑水分进行了再分配, 大脑体积并不改变。

随着细胞外 Na^+ 、 Cl^- 及水分进入细胞内, 细胞外的离子及水消耗殆尽, 于是在血管与细胞之间建立了新的电化学梯度, 成为了驱动血管内溶质与水跨血管内皮细胞进入细胞间隙的动力, 导致了血脑屏障通透性的改变。此时, 在血管内皮上的 NKCC1 起到了重要作用。另外, 磺酰尿受体 1 调节的非选择性阳离子通道 (SUR1/TRPM4) 在缺血缺氧后期起到转运 Na^+ 的作用: 在能量供应正常的情况下, 它是静止的, 但在细胞的三磷酸腺苷 (ATP) 消耗殆尽时, 则由它将 Na^+ 转移进入脑细胞间隙, 将血管内的 Na^+ 转运至血管内皮细胞, 再由 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$

酶转移至细胞间隙内, 同时水通过 AQP 进入细胞间隙, 此时, 血脑屏障的通透性虽已改变, 但其解剖结构还是完整的^[6]。

随着越来越多的 Na^+ 及水在内皮细胞及脑细胞间隙蓄积, 血管内皮水肿, 肌动蛋白收缩, 血管内皮细胞间紧密连接开放, 细胞间支架完整性被破坏, 最终发生血管源性水肿。使本来在血脑屏障完整情况下不通透的大分子物质如白蛋白、免疫球蛋白等得以跨过血脑屏障, 进入大脑组织。

1.2 NKCC1 与各种原因引起的脑水肿

1.2.1 与缺血性脑水肿的关系: Yan 等^[7]

观察到在大脑缺血后, 小鼠大脑皮质神经元的 NKCC1 明显上调, 应用布美他尼 (NKCC1 特异抑制剂) 后能减轻脑水肿。Chen 等^[8]通过建立大脑中动脉闭塞 (MCAO) 后再灌注模型, 在缺血 2 h 后, 发现突变型杂合子小鼠 (NKCC1+/-)、突变型纯合子小鼠 (NKCC1-/-) 与野生型小鼠 (NKCC1+/+) 相比, 脑肿胀及脑梗死面积均明显减小, 且脑细胞损伤也明显减少。在缺血 10 h 再灌注后利用 NKCC1 特异抑制剂布美他尼进行干预, 得到的结果基本相同。

Liu 等^[9]也得出了相似结论, 他们用 C57BL6 小鼠建立 MCAO 模型, 发现不管是在缺血 2 h 时或是在再灌注时, 都能观察到血管内皮细胞的 NKCC1 表达增加, 大脑水肿明显; 在应用布美他尼进行干预后, NKCC1 表达减少, 肿胀减轻。但是, 梗死面积在对照组及布美他尼组间没有差异, 他们认为可能是鼠的种属差异造成的。

有研究表明脑缺血之后血管内皮细胞 NKCC1 被激活, 且与星形胶质细胞肿胀相关, 布美他尼可抑制这个过程的发生^[10]。而星形胶质细胞又可以激活血管内皮细胞的 NKCC1^[11], 说明在缺血条件下, 星形胶质细胞与血管内皮细胞之间的相互作用可能是形成脑水肿机制的一

DOI: 10.3760/cma. j. issn.1003-0603. 2012. 05.021

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (S2011010002576)

作者单位: 510055 广东广州, 南方医科大学 (黄林强); 510080 广州, 广东省人民医院危重症医学部 (曾红科)

通信作者: 曾红科, Email: zenghongke@vip. 163.com

部分,其中 NKCC1 在它们的相互作用中起着重要的媒介作用。

1.2.2 与创伤性脑水肿的关系: NKCC1 在继发于创伤的脑水肿中也起重要作用。使用落重法复制创伤性脑损伤(TBI)模型,发现 NKCC1 与神经元损伤及大脑水肿明显相关;利用布美他尼可以减轻脑水肿,并认为 NKCC1 就是通过激活 MAPKs 级联反应参与了创伤性脑水肿的形成^[12]。

Jayakumar 等^[13]也证实了采用布美他尼阻滞 NKCC1 的活性,可以减轻星形胶质细胞肿胀,使用基因沉默技术下调 NKCC1 的表达后也可达到相同的目标。最近他们利用体外流体冲击伤模型来观察 NKCC1 在创伤所致的星形胶质细胞肿胀中的作用,发现创伤显著增加了 NKCC1 的活性及磷酸化,但是 NKCC1 蛋白总量不增加;同时他们还证实了 MAPKs 信号通路中的分支 p38 及 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路参与了 NKCC1 的磷酸化,而细胞外调节蛋白激酶(ERK)信号通路只是参与了细胞水肿的形成,认为可能是创伤通过 ERK 信号通路激活了其他的离子通道蛋白^[14]。

利尿药托拉塞米是一种 NKCC1 非特异抑制剂,其可减轻创伤诱导的脑水肿及细胞肿胀的发生^[4],虽然它可以通过脱水来减轻脑水肿,但它可以不改变血浆渗透压,表明托拉塞米可能是通过抑制 NKCC1 来达到这种效果。

1.2.3 与肝衰竭时血氨过高引起的脑水肿的关系:研究发现,氨可以增加核转录因子 κ B(NF- κ B)的转录,而应用抗氧化剂及一氧化氮合酶(NOS)抑制剂之后转录会显著降低^[15]。同时,应用 NF- κ B 的抑制剂 BAY 11078 或使用基因沉默技术对 NF- κ B 进行沉默后,可以减轻氨诱导的 NKCC1 活性增加及细胞肿胀。还有研究发现,在病理氨浓度下,MAPKs 被激活且 NKCC1 的磷酸化是增加的,应用 MAPKs 的抑制剂之后磷酸化减少,细胞肿胀减轻^[16]。其中值得注意的是,氨诱导的氧化/硝化激活了 MAPKs,它可能是 NF- κ B 激活的原因^[15]。说明氨诱导的 NKCC1 活性增加可能是通过激活 MAPKs 来增加 NKCC1 磷酸化,也可能是通过 NF- κ B 的激活来增加 NKCC1 蛋白表达实现的。

在硫代乙酰胺(TAA)诱发的肝衰竭鼠模型中发现,大脑肿胀明显,大脑皮质 NKCC1 活性、磷酸化及蛋白总量均增加,动物出现不同程度行为改变,且死亡率增高;应用布美他尼能减轻脑肿胀,出现脑病的时间延迟且概率降低,生存率也明显改善^[17]。

2 NKCC1 与脑水肿的年龄依赖性

Liu 等^[9]还发现了脑水肿发生的年龄依赖性,他们观察到年轻鼠的大脑 NKCC1 表达较老年鼠明显增加,在 MCAO 后,年轻鼠的脑水肿概率和肿胀程度均明显高于老年鼠;利用布美他尼抑制 NKCC1 后,年轻鼠脑水肿能明显减轻,与前述的研究结果相似。然而值得注意的是,老年鼠的治疗效果并不明显。这可能是由于老年鼠大脑 Na^+/K^+ -ATP 酶活性降低的关系,因为 NKCC1 的激活与 Na^+/K^+ -ATP 酶的活性密切相关,NKCC1 将 Na^+ 转移至细胞内,再由 Na^+/K^+ -ATP 酶将 Na^+ 转至大脑细胞间隙。有研究表明,在老年鼠大脑中 Na^+/K^+ -ATP 酶的活性是降低的^[18],致使治疗老年鼠大脑缺血后脑水肿的效果不明显。

有学者对临床死亡者进行了研究,得出年轻人在卒中以后会比老年人形成更明显的脑水肿的结果^[19]。这恰好与 Liu 等^[9]的动物实验联系起来了。因此建议对偏侧颅骨切除术患者的年龄限制应该上调^[20]。

这些研究提示,研究者在研究时不应忽略各年龄段间的纵向比较,在临床工作中对不同年龄段患者应采取有区别的治疗措施。

3 NKCC1 的神经保护作用

各种原因引起脑水肿的同时也会损伤脑细胞,造成神经功能评分低下。抑制 NKCC1 同样具有神经保护作用。

Lu 等^[21]发现,在 TBI 后 3 ~ 24 h, Wistar 大鼠的海马中白细胞介素 1β (IL- 1β)及其 mRNA 表达均显著升高,大脑存在严重的水肿及神经元损伤,在应用 NKCC1 特异抑制剂布美他尼后脑水肿减轻,神经元损伤明显减少。培养的神经元在氧-糖剥夺后,杂合子小鼠(NKCC1+/-)、纯合子小鼠(NKCC1-/-)的死亡神经元较野生鼠(NKCC1+/+)明显减少,而在利用布美他尼进行干预后,野生鼠(NKCC1+/+)神经元死亡也明显

减少^[18]。

4 NKCC1 的调节

在各种病因引起的脑水肿过程中, NKCC1 均起着非常重要的作用,其活性受到许多因素的调节,如增加或减少 NKCC1 蛋白的表达,给予或中止氧化/硝化应激,激活或抑制 MAPKs 信号通路调节的 NKCC1 磷酸化;另外,阻滞或沉默 NF- κ B 也可抑制 NKCC1 的活性。在脑水肿形成过程中, NKCC1 也与许多离子通道如 Na^+/K^+ -ATP 酶、SUR1/TRPM4 及一些交换体如钠钙交换体、钠氢交换体有相互影响的关系^[1]。同时,大脑细胞间的相互关系也可能与 NKCC1 有着密切的联系。

5 以 NKCC1 为治疗靶点有应用前景的药物

脑水肿常用脱水方法治疗,比如用利尿剂呋塞米等利尿^[22];输注白蛋白提高血浆胶体渗透压来脱水^[22];羟乙淀粉也有增加血浆胶体渗透压的效果,但尚未证实有脱水减轻脑水肿的作用,仍需要进一步研究^[23];利用渗透脱水剂甘露醇以及近几年逐渐得到重视的高渗盐水来减轻脑水肿^[22]。在我国中医临床上也有一些行之有效的方法,比如利用具有活血利水法、益气活血法等功效的中药方剂,或是用某些中药制剂的成药如血栓通、丹参及清开灵注射液等^[22,24]。这里结合题目着重讨论与 NKCC1 有关或可能有关且有应用前景的药物布美他尼及高渗盐水。布美他尼作为一种利尿剂已在临床使用有 30 年,当小剂量(2 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$)应用时能特异性抑制 NKCC1 且无明显利尿作用,不会引起各生理参数的明显变化;目前未见有小剂量应用布美他尼在中枢蓄积的报道,说明它是比较安全的。现在国外已经开始将布美他尼联合苯巴比妥应用于新生儿癫痫和难治性颞叶癫痫的治疗研究^[6],预示着我们z可以利用布美他尼对 NKCC1 特异的抑制作用来进行脑水肿的治疗。

高渗盐水作为一种渗透性脱水剂,老药新用并引起广泛关注,有研究显示其起效较传统药物甘露醇快,作用持久,并且在应用高渗盐水后电解质和渗透压未出现明显变化^[25-26];而令人注意的是,它的利尿作用并不明显^[25];它还可以抑制炎症反应和调节一些 AQP 的表达,有

研究报道,10%高渗盐水可通过下调星形胶质细胞 AQP4 表达减轻脑水肿^[27-28]。综上可以推测,高渗盐水除渗透性脱水机制外,一些与水转运相关的离子通道蛋白可能是高渗盐水作用的靶点,NKCC1 作为参与脑水肿形成的重要成分之一,很有可能是高渗盐水的作用靶点,这有待进一步探讨。

6 展望

NKCC1 在脑水肿形成的各个阶段均起着重要作用,抑制它能明显减轻脑水肿,并且能起到神经保护作用。通过对 NKCC1 参与脑水肿的形成机制及其调节机制的研究,可以为临床提供基于 NKCC1 新治疗方案的理论依据。有不少其他离子通道、转运蛋白及离子交换体与 NKCC1 共同参与了脑水肿的形成,譬如 SUR1,利用它与 NKCC1 在脑水肿形成过程的互补作用,联用 NKCC1 及 SUR1 的抑制剂降颅压效果可能会更好,提示有必要打破“渗透性脱水治疗占统治地位”这一传统观念。结合对脑水形成机制的新认识,进一步探讨非渗透性的脱水机制,为脑水肿的个体化、特异性靶向治疗提供依据。

参考文献

- [1] Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*, 2007, 6: 258-268.
- [2] Plotkin MD, Kaplan MR, Peterson LN, et al. Expression of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter BSC2 in the nervous system. *Am J Physiol*, 1997, 272: C173-183.
- [3] Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7: 41-53.
- [4] Chen H, Sun D. The role of Na-K-Cl cotransporter in cerebral ischemia. *Neurol Res*, 2005, 27: 280-286.
- [5] Kahle KT, Simard JM, Staley KJ, et al. Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)*, 2009, 24: 257-265.
- [6] Walcott BP, Kahle KT, Simard JM. Novel treatment targets for cerebral edema. *Neurotherapeutics*, 2012, 9: 65-72.
- [7] Yan Y, Dempsey RJ, Sun D. Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter in rat focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21: 711-721.
- [8] Chen H, Luo J, Kintner DB, et al. Na⁺-dependent chloride transporter (NKCC1)-null mice exhibit less gray and white matter damage after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25: 54-66.
- [9] Liu F, Akella P, Benashski SE, et al. Expression of Na-K-Cl cotransporter and edema formation are age dependent after ischemic stroke. *Exp Neurol*, 2010, 224: 356-361.
- [10] O'Donnell ME, Lam TI, Tran LQ, et al. Estradiol reduces activity of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter and decreases edema formation in permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26: 1234-1249.
- [11] Sun D, O'Donnell ME. Astroglial-mediated phosphorylation of the Na-K-Cl cotransporter in brain microvessel endothelial cells. *Am J Physiol*, 1996, 271: C620-627.
- [12] Lu KT, Cheng NC, Wu CY, et al. NKCC1-mediated traumatic brain injury-induced brain edema and neuron death via Raf/MEK/MAPK cascade. *Crit Care Med*, 2008, 36: 917-922.
- [13] Jayakumar AR, Rao KV, Panickar KS, et al. Trauma-induced cell swelling in cultured astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67: 417-427.
- [14] Jayakumar AR, Panickar KS, Curtis KM, et al. Na-K-Cl cotransporter-1 in the mechanism of cell swelling in cultured astrocytes after fluid percussion injury. *J Neurochem*, 2011, 117: 437-448.
- [15] Sinke AP, Jayakumar AR, Panickar KS, et al. NFκB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J Neurochem*, 2008, 106: 2302-2311.
- [16] Jayakumar AR, Panickar KS, Murthy ChR, et al. Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci*, 2006, 26: 4774-4784.
- [17] Jayakumar AR, Valdes V, Norenberg MD. The Na-K-Cl cotransporter in the brain edema of acute liver failure. *J Hepatol*, 2011, 54: 272-278.
- [18] Baquer NZ, Taha A, Kumar P, et al. A metabolic and functional overview of brain aging linked to neurological disorders. *Biogerontology*, 2009, 10: 377-413.
- [19] Jaramillo A, Góngora-Rivera F, Labreuche J, et al. Predictors for malignant middle cerebral artery infarctions: a postmortem analysis. *Neurology*, 2006, 66: 815-820.
- [20] Hofmeijer J, Algra A, Kappelle LJ, et al. Predictors of life-threatening brain edema in middle cerebral artery infarction. *Cerebrovasc Dis*, 2008, 25: 176-184.
- [21] Lu KT, Wu CY, Yen HH, et al. Bumetanide administration attenuated traumatic brain injury through IL-1 overexpression. *Neurol Res*, 2007, 29: 404-409.
- [22] 任金生, 蒋家东. 脑出血后脑水肿的中西医结合治疗进展. *中国中西医结合急救杂志*, 2009, 16: 379-381.
- [23] 蒋鑫, 陈纯波, 方明, 等. 羟乙基淀粉对脑缺血/再灌注大鼠颅内压及血浆胶体渗透压的影响. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 166-168.
- [24] 刘倩, 高利. 脑出血的中西医结合研究进展. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15: 381-384.
- [25] 曾红科, 叶珩, 李辉, 等. 高渗盐水在颅内高压治疗中的应用. *中华急诊医学杂志*, 2004, 13: 264-266.
- [26] Zeng HK, Wang QS, Deng YY, et al. A comparative study on the efficacy of 10% hypertonic saline and equal volume of 20% mannitol in the treatment of experimentally induced cerebral edema in adult rats. *BMC Neurosci*, 2010, 11: 153.
- [27] Zeng HK, Wang QS, Deng YY, et al. Hypertonic saline ameliorates cerebral edema through downregulation of aquaporin-4 expression in the astrocytes. *Neuroscience*, 2010, 166: 878-885.
- [28] 郭富强, 徐玉川, 陈隆益, 等. 脑出血患者血肿周围组织水通道蛋白-4 表达与脑水肿及病理超微结构变化的关系. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 674-677.

(收稿日期: 2012-03-09)

(本文编辑: 李银平)