

网络出版时间: 2023-01-20 16:39:58 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20230119.1743.028.html>

# WNK-SPAK/OSR1-CCCs 信号通路与缺血性脑卒中关系的研究进展

张建云<sup>1</sup> 李婧雯<sup>1</sup> 梅紧紧<sup>1</sup> 王艺莹<sup>1</sup> 段昭远<sup>1</sup> 高静<sup>2</sup> 苏凯奇<sup>1</sup> 综述 郭健<sup>2</sup> 李瑞青<sup>1,2</sup> 审校

**摘要** WNK-SPAK/OSR1-CCCs 信号通路与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(WNK)和下游Ste20相关的富含脯氨酸-丙氨酸激酶(SPAK)或SPAK同源物氧化应激反应激酶1(OSR1)以及阳离子-氯离子共转运体(CCCs)有关。大量证据表明WNK-SPAK/OSR1-CCCs信号通路是缺血性脑卒中期间细胞水肿、氯离子稳态失衡和缺血性脑卒中后痉挛发生发展的重要病理生理因素,遂提出WNK-SPAK/OSR1-CCCs信号通路可能与缺血性脑卒中的发病机制有关这一理念。该文将以CCCs家族中的钠钾氯共转运体亚型1(NKCC1)、钾氯共转运体亚型2(KCC2)、钾氯共转运体亚型3(KCC3)为切入点综述WNK-SPAK/OSR1-CCCs信号通路与缺血性脑卒中的关系,为明确WNK-SPAK/OSR1-CCCs信号通路在缺血性脑卒中治疗过程中的具体机制以及临床治疗脑卒中提供理论依据。

**关键词** 缺血性脑卒中; 阳离子-氯离子共转运体;  $\gamma$ -氨基丁酸; 氯离子稳态; WNK-SPAK/OSR1-CCCs 信号通路

2022-12-29 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81503630); 河南省高等学校重点科研项目(编号: 21A360023); 河南省中医药科学研究专项课题(编号: 2019ZY2129)

作者单位: <sup>1</sup> 河南中医药大学 郑州 450046

<sup>2</sup> 河南中医药大学第一附属医院 郑州 450000

作者简介: 张建云,女,硕士研究生;

李瑞青,女,硕士,主治医师,责任作者,E-mail: lrq0424@163.com

中图分类号 R 743.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0331-07  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.028

脑卒中是由急性脑血管损伤引起的局部脑功能障碍<sup>[1]</sup>,临床以高发病率、高致残率、高死亡率为主要特征<sup>[2]</sup>。据统计,我国脑卒中现患人数高居世界首位,已成为导致成年居民死亡和残疾的首位病因<sup>[3]</sup>。目前对于缺血性脑卒中的研究多以宏观角度为主,具体发病机制尚不十分明确。有研究表明,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(with-no-lysine kinases, WNK)-Ste20相关的富含脯氨酸-丙氨酸激酶(Ste20-related proline-alanine-rich kinase, SPAK)/SPAK同源物氧化应激反应激酶1(oxidative stress-responsive kinase 1, OSR1)-阳离子-氯离子共转运体(cation-chloride cotransporters, CCCs)信号通路与缺血性脑卒中联系密切<sup>[4]</sup>。而抑制NKCC1的表达,增强KCC2和KCC3的表达,维持细胞内较低的Cl<sup>-</sup>浓度,是CCCs正常表达的关键<sup>[5-6]</sup>。现通过梳理WNK-SPAK/OSR1-CCCs信号通路在神经细胞中的表达来探讨其对缺血性脑卒中的作用机制,为其临床治疗缺血性脑卒中的研究提供新的思路和药物靶点。

Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 665226.

[39] Vera I M, Kessler A, Ting L, et al. Plasma cell-free DNA predicts pediatric cerebral malaria severity [J]. JCI Insight, 2020, 5(12): e136279.

[40] Zhao Y, Gongsang Q, Ji J, et al. Characterizing dynamic changes of plasma cell-free Echinococcus granulosus DNA before and after cystic echinococcosis treatment initiation [J]. Genomics, 2021, 113(2): 576-82.

[41] Kato-Hayashi N, Leonardo L R, Arevalo N L, et al. Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of Schistosoma japonicum in highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines [J]. Acta Trop, 2015, 141(Pt B): 178-83.

[42] Munjal T, Vukkadala N, Hazard F K, et al. Next-generation sequencing as an auxiliary tool in pediatric laryngeal lymphoma diagnosis [J]. Pediatrics, 2021, 148(5): e2020047662.

[43] Chatfield-Reed K, Roche V P, Pan Q. cfDNA detection for HPV + squamous cell carcinomas [J]. Oral Oncol, 2021, 115(4): 104958.

[44] Andargie T E, Tsuji N, Seifuddin F, et al. Cell-free DNA maps COVID-19 tissue injury and risk of death and can cause tissue injury [J]. JCI Insight, 2021, 6(7): e147610.

[45] Centeno F H, Lasco T, Ahmed A A, et al. Characteristics of Rickettsia typhi infections detected with next-generation sequencing of microbial cell-free deoxyribonucleic acid in a tertiary care hospital [J]. Open Forum Infect Dis, 2021, 8(7): ofab147.

[46] Branda J A, Lemieux J E, Blair L, et al. Detection of Borrelia burgdorferi cell-free DNA in human plasma samples for improved diagnosis of early Lyme borreliosis [J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(7): e2355-61.

## 1 NKCC1 结构功能及其与缺血性脑卒中的关系

**1.1 NKCC1 结构与功能** NKCC1 属于 SLC12A 家族,由 SLC12A2 基因编码<sup>[7]</sup>,该基因位于第 5 号染色体<sup>[8]</sup>。人类 SLC12A2 基因至少编码三种剪接变体,编号分别为 NM 001046 ( SLC12A2 v1, NKCC1a)、NM 001256461 ( SLC12A2 v2, NKCC1b) 和 NR 046207 ( SLC12A3 v3 )<sup>[9]</sup>。NKCC1a 和 NKCC1b 转录本编码蛋白质 130 ku,具有预测的 12 个跨膜结构域和两个大的细胞内 N 端和 C 端<sup>[10]</sup>。资料显示,糖基化分布于 NKCC1 的 N 端,其中,复杂型 N-糖基化约含有 25%,核心/高甘露糖型和混合型 N-糖基化约含有 75%<sup>[11]</sup>。此外,NKCC1 翻译后约 10% 到达质膜,以核心/高甘露糖型 N-糖基化为主,其余 90% 的 NKCC1 存在于细胞中,复杂型 N-糖基化是转运体发挥作用的必要条件。但 NKCC1 的 N-聚糖性质和复杂 N-聚糖对其质膜插入的影响尚不清楚,还有待进一步研究。此外,NKCC1 主要在外周神经系统、背根神经节以及三叉神经节表达,在中枢神经系统也有大量表达,但不同的发育时期 NKCC1 的表达不同,NKCC1 在哺乳动物发育早期表达相对较高,并且伴随发育不断成熟而逐渐降低<sup>[12]</sup>。其在正常情况下通过继发性主动转运的形式介导  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  内流,可以调节抑制性突触传递、维持细胞体积<sup>[13]</sup>。

**1.2 NKCC1 与缺血性脑卒中的关系** NKCC1 广泛存在于大脑的神经细胞中,在调节神经细胞功能方面起着关键作用,主要参与  $\text{Cl}^-$  平衡的维持和神经元的兴奋功能<sup>[14]</sup>,并通过 GABA 能信号发挥调节和修复神经损伤的功能<sup>[15]</sup>。然而,缺血性脑卒中后 NKCC1 的表达将会发生改变<sup>[16]</sup>。研究<sup>[17-18]</sup>表明,缺血性脑卒中后,神经元中 NKCC1 的表达增加,这种表型类似于不成熟的神经元。Mu et al<sup>[19]</sup>通过建立内皮素-1 ( endothelin 1, ET-1) 脑卒中模型来诱导局灶性缺血性脑卒中的大鼠,发现在皮层周围其 NKCC1 的活性明显增加,而 NKCC1 活性增加可进一步诱导  $\text{Na}^+$  内流,使神经细胞内渗透压升高,脑组织摄取水分增多,从而引发脑水肿。此外,缺血性脑卒中后,NKCC1 mRNA 基因表达增加,NKCC1 蛋白的激活在缺血性脑卒中病程中也起重要作用。Chen et al<sup>[20]</sup>通过建立小鼠短暂性大脑中动脉闭塞模型 ( MCAO) 发现,NKCC1 或其上游调节器 WNK3 的基因缺失后,NKCC1 活性下降, $\text{Na}^+$  内流减少,神经细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度降低,渗透压降低,脑组织摄取水

分减少,可使脑梗死、脑水肿和白质损伤的程度明显降低。同理,通过抑制 NKCC1 活性可减少细胞内  $\text{Na}^+$  浓度并减轻水肿,恢复神经元内  $\text{Cl}^-$  平衡。Xu et al<sup>[21]</sup>通过动物实验发现,与健康对照组相比,在大鼠局灶性脑缺血后给予 NKCC1 抑制剂布美他尼 ( Bumetanide) 治疗,其神经细胞内  $\text{Na}^+$  内流减少,渗透压降低,这是因为布美他尼通过与 NKCC1 跨膜区的结合点对接发挥作用,可抑制 NKCC1 的活性,刺激 KCC3 的表达,从而减少神经元中的  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  浓度,增加神经细胞的存活,减轻脑水肿,促进缺血性脑卒中后神经发生和行为恢复。由此可见,NKCC1 表达的增加可引起细胞内  $\text{Cl}^-$  稳态失衡,不利于脑功能的恢复,而加入影响其表达的抑制剂可起到改善脑功能的效果。

## 2 KCC2 结构功能及其与缺血性脑卒中的关系

**2.1 KCC2 结构与功能** KCC2 是一种约 140 ku 的糖蛋白,是 SLC12A 家族中的一员,由 24 个外显子的 SLC12A5 基因编码,该基因分配给人类染色体带 20q12→q13.1,以及小鼠染色体带波段 5G2→G3<sup>[22]</sup>。有研究<sup>[23]</sup>显示,KCC2 基因编码有两个亚型,并分别命名为 KCC2a 和 KCC2b,两者在氨基酸末端 ( N 端) 的结构不同。这两种 KCC2 异构体在新生儿大脑中有类似的表达模式,但 KCC2b 在成年大脑中成为主要的异构体<sup>[24-25]</sup>,主要参与  $\gamma$ -氨基丁酸 (  $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA) 能神经元由去极化状态转变为超极化状态这一过程,维持氯离子稳态,调节 GABA 能神经元的发育。此外,KCC2 蛋白具有 12 个跨膜段的膜拓扑结构,两侧是亲水的 N 端和 C 端结构域,在跨膜段 5 和 6 之间有一个大的糖基化胞外环<sup>[22]</sup>。KCC2 有一个 15 个残基的 C 端等渗结构域,被称为 ISO 结构域,该结构域是等渗条件下的钾氯共转运的必要条件<sup>[26]</sup>。但尚未有证据证明 KCC2 表达的分子机制受何种因素调控,这些因素包括同家族的其他成员调节、自身调节、受到神经递质的调节等,仍需进一步探讨。

**2.2 KCC2 与缺血性脑卒中的关系** KCC2 是成熟神经元中  $\text{Cl}^-$  外流的主要转运体,其功能和表达受神经元活动的调节<sup>[27]</sup>。在某些情况下,神经元的激活可能会上调 KCC2 以加强突触抑制的平衡。然而,在缺血性脑卒中后痉挛发生时,KCC2 的表达便会受到抑制,从而改变运动神经元兴奋和抑制的平衡,进而导致兴奋性毒性或异常活动<sup>[28]</sup>。GABA 是中枢神经系统内重要的抑制性神经递质,在 KCC2

表达上调、NKCC1 表达下调时,细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度降低,使 GABA 能神经元发挥抑制作用,可以有效防止痉挛的发生。而缺血性脑卒中后,KCC2 表达下调、NKCC1 表达上调,细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度增加, $\text{Cl}^-$  稳态失衡,GABA 抑制作用减弱,从而引发痉挛,WNK-SPAK/OSR1 在此过程中发挥重要的调控作用。Toda et al<sup>[29]</sup> 发现,在局灶性脑损伤后,KCC2 表达下调,引起细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度增加,导致  $\text{Cl}^-$  稳态失衡,GABA 抑制作用减弱,且 KCC2 也影响缺血性脑卒中后运动神经元质膜上的 Ser940 去磷酸化,这两种效应使运动神经元的兴奋性增强,从而导致卒中后痉挛的发生。此外,翻译后修饰机制也参与调节 KCC2 的功能<sup>[30-32]</sup>。Wu et al<sup>[33]</sup> 发现,KCC2 的调节功能可以通过改变共识位点的磷酸化状态来实现。具有激酶活性的 WNK3 通过增强 KCC2 的磷酸化而抑制其活性,从而增加细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度,促进对 GABA 能运动神经元的兴奋性反应。相反,无激酶活性的 WNK3 介导的 KCC2 的激活降低了细胞内  $\text{Cl}^-$  浓度,促进了抑制性 GABA 信号的传递,使 GABA 能神经元发挥抑制作用,从而防止痉挛的发生。此外,通过药物干预增加 KCC2 活性,可恢复由于痉挛发生时减弱的 GABA 能运动神经元的突触后抑制作用,起到缓解痉挛的效果<sup>[34]</sup>。Ma et al<sup>[35]</sup> 通过观察新生大鼠缺血缺氧的脑部发现,缺血性脑卒中早期应用地西洋治疗,可减轻神经细胞损伤,并有效改善长期的学习和记忆能力。这表明地西洋可以防止 KCC2 的下调,保持细胞内低氯状态,从而使 GABA 能运动神经元发挥抑制作用,进而改善神经功能。这也从侧面说明了 KCC2 的表达增强对神经功能的恢复以及痉挛的缓解起重要作用。具体机制见图 1。

### 3 KCC3 结构功能及其与缺血性脑卒中的关系

**3.1 KCC3 结构与功能** KCC3 是 SLC12A 家族的成员,由 SLC12A6 基因编码<sup>[36]</sup>。SLC12A6 基因在 5cM(5q13-15) 区间内映射到人类染色体 15q1.4<sup>[37]</sup>。SLC12A 协同转运蛋白的细胞内末端包含重要的磷酸化位点,参与转运激活或失活。KCC3 有两个主要的磷酸化位点,分别为 T1048 和 T991,它们位于羧基末端<sup>[38]</sup>。研究<sup>[39]</sup> 显示,KCC3 与其他 KCC 家族高度同源,在氨基酸序列上有约 73% 的一致性,与  $\text{Na}^+$ -耦合的 NKCC1 有中等程度的同源,与其他转运体有约 29% 的一致性。当在比对研究中排除 N 端时,两者的相同性分别增加到 76% 和

32%。研究表明,KCC3 在多种中枢神经系统(central nervous system, CNS) 和周围神经系统(peripheral nervous system, PNS) 细胞类型中表达<sup>[40]</sup>。在成年期,KCC3 在 CNS 中广泛表达<sup>[41]</sup>,以杏仁核和下丘脑中 KCC3 表达最高。在海马体中,KCC3 位于中间神经元内<sup>[42]</sup>。对于成人 PNS,KCC3 在坐骨神经和背根神经节(dorsal root ganglion, DRG) 中的表达量极低<sup>[43]</sup>。与 NKCC1 功能相反,KCC3 通过继发性主动转运的形式介导  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  外流,二者相互拮抗,共同参与神经细胞抑制性突触传递以及细胞体积的调节。然而,KCC3 转运所需的离子转运位点的数量仍未可知,需继续研究证实。

**3.2 KCC3 与缺血性脑卒中的关系** 在神经元功能调节中,KCC3 的激活与 NKCC1 的抑制具有类似的生理作用。神经元中 KCC3 的表达需要依赖 NKCC1 的发挥,以完成对中枢神经系统的细胞平衡进行生理性调节<sup>[38,44]</sup>。中枢神经系统中神经元抑制主要由 GABA 介导,而甘氨酸在较小程度上介导。GABA 与  $\text{Cl}^-$  可渗透的 GABA<sub>A</sub> 受体(GABA<sub>A</sub>R) 结合后,受体离子通道打开,引起  $\text{Cl}^-$  的流动<sup>[45]</sup>。Lucas et al<sup>[46]</sup> 在一项小鼠模型中发现,同时抑制 NKCC1 表达和刺激 KCC3 表达,可促进成年小鼠感觉神经细胞内的  $\text{Cl}^-$  浓度下降,维持神经细胞  $\text{Cl}^-$  稳态,这表明它们参与 GABA 能/甘氨酸转换效能,引发 GABA 介导的超极化反应,从而介导抑制性 GABA 能神经传递效应,避免神经细胞过度兴奋,进而缓解痉挛的发生。此外,KCC3 可能在调节细胞体积方面具有重要作用<sup>[39]</sup>,其机制是在细胞肿胀的低渗条件下,细胞会激活调节性体积减少反应(regulatory volume decrease, RVD),此时,WNK-SPAK/OSR1 激酶保持不活跃状态,引起 NKCC1 和 KCC3 去磷酸化,从而刺激 KCC3 表达和抑制 KCC1 表达,进而引起水和  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  流出细胞,细胞体积减少。Byun et al<sup>[47]</sup> 发现,刺激 KCC3 可参与神经系统的细胞体积调节,证明 KCC3 具有保护神经的作用,随后其研究进一步确定,通过敲除 KCC3 来抑制小鼠神经细胞中 KCC3 的表达,可引起细胞肿胀,最终导致神经变性。除上述在 1.2 项中所提到的布美他尼能够刺激 KCC3 表达外,Adragna et al<sup>[48]</sup> 在细胞培养实验中发现,KCC3a 蛋白的羧基末端用丙氨酸取代 Thr 991 和 Thr 1048 残基后,阻止了取代位点的抑制性磷酸化,从而引发 KCC3a mRNA 的表达增加,进而促进神经功能的恢复。以上研究表明,KCC3 具有调节细胞体积和  $\text{Cl}^-$  浓度的双重作用,为探讨其

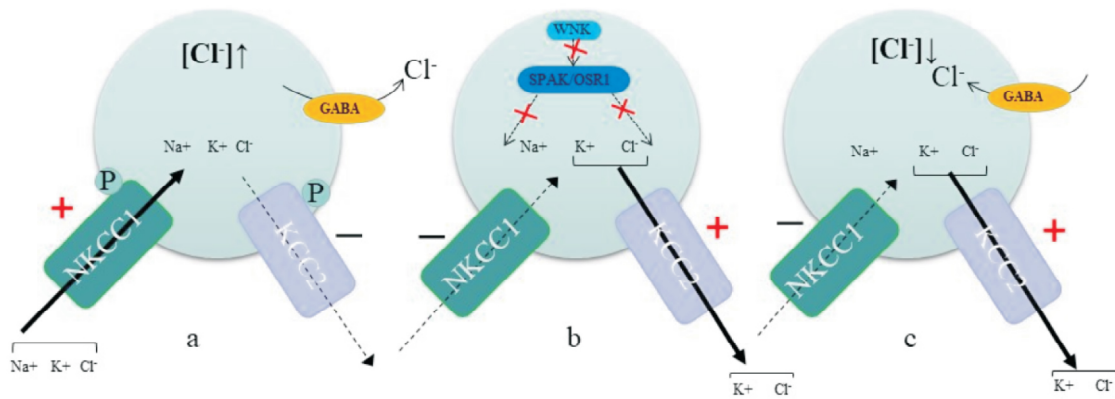


图1 WNK-SPAK/OSR1-CCCs 信号通路在缓解痉挛中的作用

在缺血性脑卒中期间的发病机制提供了可靠证据。

#### 4 WNK-SPAK/OSR1-CCCs 结构功能及其与缺血性脑卒中的关系

##### 4.1 WNK-SPAK/OSR1-CCCs 结构与功能

WNK-SPAK/OSR1-CCCs 信号通路与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (with-no-lysine kinases, WNK) 和下游 Ste20 相关的富含脯氨酸-丙氨酸激酶 (ste20-related proline-alanine-rich kinase, SPAK) 或 SPAK 同源物氧化应激反应激酶 1 (oxidative stress-responsive kinase 1, OSR1) 以及阳离子-氯离子共转运体 (cation-chloride cotransporters, CCCs) 有关。WNK 家族感知细胞内  $Cl^-$  浓度、细胞外渗透压和细胞体积的变化, 并将这些信息转导至 CCCs, 以维持细胞  $Cl^-$  稳态<sup>[49]</sup>。研究<sup>[50]</sup>显示, 缺血性脑卒中后, WNK 通过 SPAK 和 OSR1 激酶途径, 调节 NKCC1、KCC2 和 KCC3 的表达。WNK 是一种  $Na^+$ 、 $K^+$  耦合的  $Cl^-$  导入器和  $K^+$  耦合的  $Cl^-$  导出器<sup>[51]</sup>。其异构体在细胞内低渗透压或  $Cl^-$  水平低时磷酸化 (激活), 并随后使其下游的激酶 SPAK 和 (或) OSR1 磷酸化<sup>[52]</sup>, 激活的 SPAK 和 (或) OSR1 通过蛋白质磷酸化刺激 NKCC1 表达, 并通过相互调节机制抑制 KCC2、KCC3 磷酸化<sup>[53]</sup>。在体积调节过程中, 低渗环境引起细胞吸水膨胀, 在正常条件下可触发调节性容积减少反应 (regulatory volume decrease, RVD), WNK-SPAK/OSR1 激酶保持不活跃状态, NKCC1 和 KCC3 去磷酸化, 导致 KCC3 激活和 NKCC1 抑制,  $K^+$ 、 $Cl^-$  与水外流, 细胞体积减少。相反, 高渗环境引起细胞失水皱缩, 触发调节性容积增加反应 (regulatory volume increase, RVI), 使 WNK-SPAK/OSR1 激酶活化, 引起 CCCs 磷酸化, 导致 NKCC1 激活和 KCC3 抑

制  $Na^+$ 、 $K^+$ 、 $Cl^-$  通过 NKCC1 与水一起内流, 从而恢复细胞体积。WNK-SPAK/OSR1 激酶对 CCCs 的调节和两者的相互协调作用, 由 WNK 和 CCCs 中的 RFXV/I 基序与 SPAK 和 OSR1 中保守的羧基末端对接结构域之间的相互作用所触发<sup>[4]</sup>。上述 CCCs 的反向调节由同一激酶-磷酸酶信号通路所驱动, 可协调细胞内  $Cl^-$  的外流和内流, 从而维持细胞内  $Cl^-$  的平衡<sup>[5]</sup>, 避免不必要的 ATP 消耗。

#### 4.2 WNK-SPAK/OSR1-CCCs 与缺血性脑卒中的关系

WNK 和 SPAK/OSR1 激酶在中枢神经系统中大量表达。缺血性脑卒中后, NKCC1、KCC2 和 KCC3 作为 WNK-SPAK/OSR1 激酶的下游靶点, 都通过 WNK-SPAK/OSR1 激酶磷酸化, 从而导致 NKCC1 的激活与 KCC2 和 KCC3 的抑制<sup>[50, 54]</sup>。研究<sup>[55]</sup>表明, 人类有四个 WNK 激酶 (WNK1、WNK2、WNK3 和 WNK4), 其中, WNK3 在大脑中高度表达。Begum et al<sup>[56]</sup>通过建立小鼠 MCAO 模型, 观察其脑内角质层神经细胞和初级少突胶质细胞发现, WNK3 和 SPAK 激酶受到刺激, 并进一步确定脑缺血促进了 WNK3-SPAK/OSR1 催化 T 环和 NKCC1 刺激位点 (Thr203/Thr207/Thr212) 的过度磷酸化, 因此 NKCC1 在脑细胞中的表达增加。这表明 WNK3-SPAK/OSR1-NKCC1 信号通路在缺血性脑卒中期间发挥重要作用, 阻断这一通路可减少 NKCC1 在大脑中的表达, 预防缺血性脑卒中后的神经细胞死亡。此外, 在对低  $Cl^-$  浓度渗透压的反应中, WNK 的异构体通过磷酸化被激活, 激活的 WNK 异构体使相关的下游激酶 SPAK 或 OSR1 磷酸化, SPAK 和 (或) OSR1 即被激活, 激活的 SPAK 和 (或) OSR1 通过蛋白质磷酸化刺激 NKCC1, 抑制 KCC2 和 KCC3 表达。Zhang et al<sup>[57]</sup>在一项实验性缺血性脑卒中研究

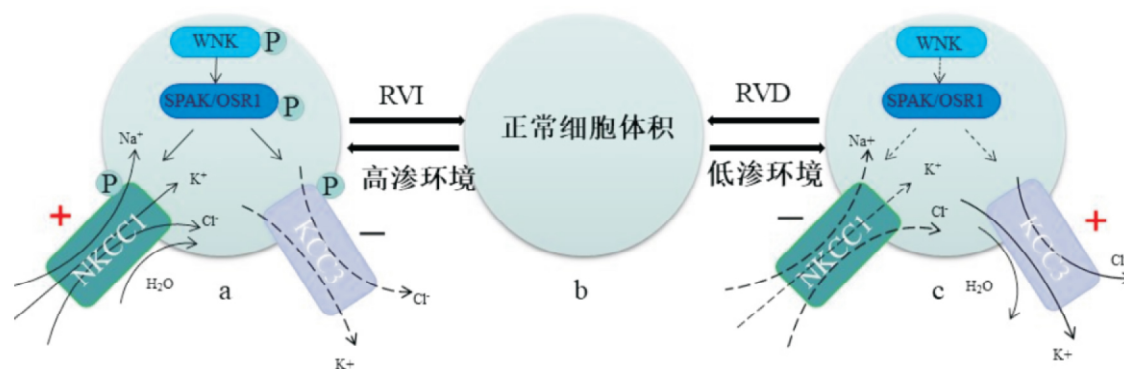


图2 WNK-SPAK/OSR1-CCCs 信号通路与在细胞体积调节中的作用

RVI: 调节性容积增加; RVD: 调节性容积减少

发现,与 WT 小鼠相比,WNK3 基因敲除和 SPAK 基因敲除小鼠在缺血性卒中后的梗死体积和脑水肿有效减少。考虑原因可能是 WNK3 和 SPAK 激酶通过增强 NKCC1 表达对缺血性脑卒中的恢复产生不利影响,而敲除它们便可增强 KCC3 表达,使水分伴随  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  流出神经细胞,细胞体积减少,避免了神经细胞损伤和脑水肿,促进缺血性脑卒中后神经功能的恢复。同理, Josiah et al<sup>[58]</sup> 采用支架杂交策略开发了一种非 ATP 竞争性 SPAK 抑制剂 ZT-1a,发现 ZT-1a 可通过减少脑内 SPAK 依赖性磷酸化来抑制 NKCC1 和刺激 KCC3,进而特异性抑制这一信号通路<sup>[59]</sup>,改善缺血后 CCCs 的磷酸化,减轻脑水肿,进而改善神经功能。以上研究表明,WNK-SPAK-NKCC1 基因敲除及其抑制剂对脑水肿和缺血性脑卒中的治疗具有潜力,可显著改善脑功能。见图 2。

## 5 总结与展望

阳离子-氯离子共转运体在减少细胞水肿、降低神经元内  $\text{Cl}^-$  浓度和缓解痉挛方面发挥重要作用。CCCs 的表达受其上游调节器 WNK-SPAK/OSR1 激酶的调节,与缺血性脑卒中的发生和发展有关。无论是在缺血性脑卒中发作期间还是在缺血性脑卒中后, NKCC1 和 KCC3 的激活受 WNK-SPAK/OSR1 激酶的调控,导致 NKCC1 表达的增加和 KCC3 表达的抑制,这一过程在维持细胞体积方面发挥重要作用。而 KCC2 在维持神经细胞内  $\text{Cl}^-$  平衡方面起着重要作用,缺血性脑卒中后 KCC2 表达的降低导致细胞内  $\text{Cl}^-$  从低浓度到高浓度转变,神经细胞内  $\text{Cl}^-$  稳态失衡,从而使 GABA 能运动神经元从抑制状态转为兴奋状态,进而导致痉挛的发生。因此,通过抑制 WNK-SPAK/OSR1 激酶磷酸化,进而抑制神经细胞内 NKCC1 的表达,提高

KCC2 和 KCC3 的表达是预防缺血性脑卒中后细胞水肿和痉挛的一个有效途径。本文探讨的 CCCs 抑制剂和激活剂对缺血性脑卒中的治疗具有潜在的疗效,故以阳离子-氯离子共转运体为治疗靶点可能为脑卒中的临床治疗提供治疗方向<sup>[60-61]</sup>。

## 参考文献

- [1] Paul S, Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and pre-clinical studies [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113518.
- [2] 李志洁, 孙中武, 刘斌. 多时相 CTA 评估急性缺血性脑卒中患者侧支循环的应用价值 [J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(10): 1606-10.
- [3] 王亚楠, 吴思缈, 刘鸣. 中国脑卒中 15 年变化趋势和特点 [J]. *华西医学*, 2021, 36(6): 803-7.
- [4] Alessi D R, Zhang J, Khanna A, et al. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters [J]. *Sci Signal*, 2014, 7(334): re3.
- [5] Murillo-de-Ozores A R, Chávez-Canales M, de Los Heros P, et al. Physiological processes modulated by the chloride-sensitive WNK-SPAK/OSR1 kinase signaling pathway and the cation-coupled chloride cotransporters [J]. *Front Physiol* 2020, 11: 585907.
- [6] Bhuiyan M I H, Young C B, Jahan I, et al. NF- $\kappa$ B signaling-mediated activation of WNK-SPAK-NKCC1 cascade in worsened stroke outcomes of Ang II-hypertensive mice [J]. *Stroke*, 2022, 53(5): 1720-34.
- [7] Virtanen M A, Uvarov P, Hübner C A, et al. NKCC1, an elusive molecular target in brain development: Making sense of the existing data [J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2607.
- [8] Macnamara E F, Koehler A E, D Souza P, et al. Kilquist syndrome: A novel syndromic hearing loss disorder caused by homozygous deletion of SLC12A2 [J]. *Hum Mutat*, 2019, 40(5): 532-8.
- [9] Flores B, Schornak C C, Delpire E. A role for KCC3 in maintaining cell volume of peripheral nerve fibers [J]. *Neurochem Int*, 2019, 123: 114-24.



- [10] Zhang S , Zhou J , Zhang Y , et al. The structural basis of function and regulation of neuronal cotransporters NKCC1 and KCC2 [J]. *Commun Biol* , 2021 , 4(1) : 226.
- [11] Singh R , Almutairi M M , Pacheco-Andrade R , et al. Impact of hybrid and complex N-glycans on cell surface targeting of the endogenous chloride cotransporter Slc12a2 [J]. *Int J Cell Biol* , 2015 , 2015:505294.
- [12] Szymanski J , Mimichiello L. NKCC1 deficiency in forming hippocampal circuits triggers neurodevelopmental disorder: Role of BDNF-TrkB signalling[J]. *Brain Sci* , 2022 , 12(4) : 502.
- [13] Koumangoye R , Bastarache L , Delpire E. NKCC1: Newly found as a human disease-causing ion transporter[J]. *Function (Oxf)* , 2021 , 2(1) : zqaa028.
- [14] Löscher W , Kaila K. CNS pharmacology of NKCC1 inhibitors [J]. *Neuropharmacology* , 2022 , 205: 108910.
- [15] Lu D C , Hannemann A , Wadud R , et al. The role of WNK in modulation of KCl cotransport activity in red cells from normal individuals and patients with sickle cell anaemia [J]. *Pflugers Arch* , 2019 , 471(11-12) : 1539 - 49.
- [16] Savardi A , Borgogno M , De Vivo M , et al. Pharmacological tools to target NKCC1 in brain disorders [J]. *Trends Pharmacol Sci* , 2021 , 42(12) : 1009 - 34.
- [17] Tóth K , Lénárt N , Berki P , et al. The NKCC1 ion transporter modulates microglial phenotype and inflammatory response to brain injury in a cell-autonomous manner [J]. *PLoS Biol* , 2022 , 20(1) : e3001526.
- [18] Huang H , Bhuiyan M I H , Jiang T , et al. A Novel Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> cotransporter 1 inhibitor STS66\* reduces brain damage in mice after ischemic stroke [J]. *Stroke* , 2019 , 50(4) : 1021 - 5.
- [19] Mu X P , Wang H B , Cheng X , et al. Inhibition of Nkcc1 promotes axonal growth and motor recovery in ischemic rats [J]. *Neuroscience* , 2017 , 365: 83 - 93.
- [20] Chen H , Luo J , Kintner D B , et al. Na<sup>+</sup> -dependent chloride transporter (NKCC1) -null mice exhibit less gray and white matter damage after focal cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2005 , 25(1) : 54 - 66.
- [21] Xu W , Mu X , Wang H , et al. Chloride co-transporter NKCC1 inhibitor bumetanide enhances neurogenesis and behavioral recovery in rats after experimental stroke [J]. *Mol Neurobiol* , 2017 , 54(4) : 2406 - 14.
- [22] Agez M , Schultz P , Medina I , et al. Molecular architecture of potassium chloride co-transporter KCC2 [J]. *Sci Rep* , 2017 , 7(1) : 16452.
- [23] Hartmann A M , Fu L , Ziegler C , et al. Structural changes in the extracellular loop 2 of the murine KCC2 potassium chloride cotransporter modulate ion transport [J]. *J Biol Chem* , 2021 , 296: 100793.
- [24] Uvarov P , Ludwig A , Markkanen M , et al. Coexpression and heteromerization of two neuronal K-Cl cotransporter isoforms in neonatal brain [J]. *J Biol Chem* , 2009 , 284(20) : 13696 - 704.
- [25] Uvarov P , Ludwig A , Markkanen M , et al. A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2 [J]. *J Biol Chem* , 2007 , 282(42) : 30570 - 6.
- [26] Acton B A , Mahadevan V , Mercado A , et al. Hyperpolarizing GABAergic transmission requires the KCC2 C-terminal ISO domain [J]. *J Neurosci* , 2012 , 32(25) : 8746 - 51.
- [27] Virtanen M A , Uvarov P , Mavrovic M , et al. The multifaceted roles of KCC2 in cortical development [J]. *Trends Neurosci* , 2021 , 44(5) : 378 - 92.
- [28] Lee-Hotta S , Uchiyama Y , Kametaka S. Role of the BDNF-TrkB pathway in KCC2 regulation and rehabilitation following neuronal injury: A mini review [J]. *Neurochem Int* , 2019 , 128: 32 - 8.
- [29] Toda T , Ishida K , Kiyama H , et al. Down-regulation of KCC2 expression and phosphorylation in motoneurons , and increases the number of in primary afferent projections to motoneurons in mice with post-stroke spasticity [J]. *PLoS One* , 2014 , 9(12) : e114328.
- [30] Watanabe M , Zhang J , Mansuri M S , et al. Developmentally regulated KCC2 phosphorylation is essential for dynamic GABA-mediated inhibition and survival [J]. *Sci Signal* , 2019 , 12(603) : eaaw9315.
- [31] Pisella L I , Gaiarsa J L , Diabira D , et al. Impaired regulation of KCC2 phosphorylation leads to neuronal network dysfunction and neurodevelopmental pathology [J]. *Sci Signal* , 2019 , 12(603) : eaay0300.
- [32] Côme E , Marques X , Poncer J C , et al. KCC2 membrane diffusion tunes neuronal chloride homeostasis [J]. *Neuropharmacology* , 2020 , 169: 107571.
- [33] Wu H , Che X , Tang J , et al. The K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> Cotransporter KCC2 and chloride homeostasis: Potential therapeutic target in acute central nervous system injury [J]. *Mol Neurobiol* , 2016 , 53(4) : 2141 - 51.
- [34] Cheung D L , Cooke M J , Goulton C S , et al. Global transgenic upregulation of KCC2 confers enhanced diazepam efficacy in treating sustained seizures [J]. *Epilepsia* , 2022 , 63(1) : e15 - 22.
- [35] Ma J Y , Zhang S P , Guo L B , et al. KCC2 expression changes in diazepam-treated neonatal rats with hypoxia-ischaemia brain damage [J]. *Brain Res* , 2014 , 1563: 22 - 30.
- [36] Chi X , Li X , Chen Y , et al. Cryo-EM structures of the full-length human KCC2 and KCC3 cation-chloride cotransporters [J]. *Cell Res* , 2021 , 31(4) : 482 - 4.
- [37] Casaubon L K , Melanson M , Lopes-Cendes I , et al. The gene responsible for a severe form of peripheral neuropathy and agenesis of the corpus callosum maps to chromosome 15q [J]. *Am J Hum Genet* , 1996 , 58(1) : 28 - 34.
- [38] Loureiro C A , Barros P , Matos P , et al. Tyrosine phosphorylation modulates cell surface expression of chloride cotransporters NKCC2 and KCC3 [J]. *Arch Biochem Biophys* , 2019 , 669: 61 - 70.
- [39] Gameau A P , Marcoux A A , Frenette-Cotton R , et al. Molecular insights into the normal operation , regulation , and multisystemic roles of K<sup>+</sup> -Cl<sup>-</sup> cotransporter 3 (KCC3) [J]. *Am J Physiol* (下转第 341 页)

- [24] Yang J, Hu L. Immunomodulators targeting the PD-1/PD-L1 protein-protein interaction: from antibodies to small molecules [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(1): 265–301.
- [25] Shaabani S, Huizinga H P S, Butera R, et al. A patent review on PD-1/PD-L1 antagonists: small molecules, peptides, and macrocycles (2015–2018) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2018, 28(9): 665–78.
- [26] Chatterjee S, Lesniak W G, Miller M S, et al. Rapid PD-L1 detection in tumors with PET using a highly specific peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 258–63.
- [27] De Silva R A, Kumar D, Lisok A, et al. Peptide-based <sup>68</sup>Ga-PET radiotracer for imaging PD-L1 expression in cancer [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 3946–52.
- [28] Lesniak W G, Mease R C, Chatterjee S, et al. Development of [<sup>18</sup>F]FPy-WL12 as a PD-L1 specific PET imaging peptide [J]. *Mol Imaging*, 2019, 18: 1536012119852189.
- [29] Zhou X, Jiang J Q, Yang X, et al. First-in-human evaluation of a PD-L1-binding peptide radiotracer in non-small cell lung cancer patients with PET [J]. *J Nucl Med*, 2022, 63(4): 536–42.
- [30] Sasikumar P G, Ramachandra M. Small-molecule immune checkpoint inhibitors targeting PD-1/PD-L1 and other emerging checkpoint pathways [J]. *Bio Drugs*, 2018, 32(5): 481–97.
- [31] Guzik K, Zak K M, Grudnik P, et al. Small-molecule inhibitors of the programmed cell death-1/programmed death-ligand 1 (PD-1/PD-L1) interaction *via* transiently induced protein states and dimerization of PD-L1 [J]. *J Med Chem* 2017 60(13): 5857–67.
- [32] Miao Y, Lv G, Chen Y, et al. One-step radiosynthesis and initial evaluation of a small molecule PET tracer for PD-L1 imaging [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(24): 127572.
- [33] Lv G, Miao Y, Chen Y, et al. Promising potential of a <sup>18</sup>F-labelled small-molecular radiotracer to evaluate PD-L1 expression in tumors by PET imaging [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105294.
- (上接第 336 页)
- iol Cell Physiol, 2017, 313(5): C516–32.
- [40] Flores B, Schornak C C, Delpire E. A role for KCC3 in maintaining cell volume of peripheral nerve fibers [J]. *Neurochem Int*, 2019, 123: 114–24.
- [41] Shekarabi M, Salin-Cantegrel A, Laganière J, et al. Cellular expression of the K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC3 in the central nervous system of mouse [J]. *Brain Res*, 2011, 1374: 15–26.
- [42] Delpire E, Kahle K T. The KCC3 cotransporter as a therapeutic target for peripheral neuropathy [J]. *Expert Opin Ther Target*, 2017, 21(2): 113–6.
- [43] Flores B, Delpire E. Osmotic response of dorsal root ganglion neurons expressing wild-type and mutant KCC3 transporters [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2020, 54(4): 577–90.
- [44] Chew T A, Zhang J, Feng L. High-resolution views and transport mechanisms of the NKCC1 and KCC transporters [J]. *J Mol Biol*, 2021, 433(16): 167056.
- [45] Han W, Shepard R D, Lu W. Regulation of GABA(A) Rs by transmembrane accessory proteins [J]. *Trends Neurosci*, 2021, 44(2): 152–65.
- [46] Lucas O, Hilaire C, Delpire E, et al. KCC3-dependent chloride extrusion in adult sensory neurons [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2012, 50(3–4): 211–20.
- [47] Byun N, Delpire E. Axonal and periaxonal swelling precede peripheral neurodegeneration in KCC3 knockout mice [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 28(1): 39–51.
- [48] Adragna N C, Ravilla N B, Lauf P K, et al. Regulated phosphorylation of the K-Cl cotransporter KCC3 is a molecular switch of intracellular potassium content and cell volume homeostasis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 255.
- [49] Mayes-Hopfinger L, Enache A, Xie J, et al. Chloride sensing by WNK1 regulates NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4546.
- [50] Zhang J, Cordshagen A, Medina I, et al. Staurosporine and NEM mainly impair WNK-SPAK/OSR1 mediated phosphorylation of KCC2 and NKCC1 [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0232967.
- [51] Shekarabi M, Zhang J, Khanna A R, et al. WNK kinase signaling in ion homeostasis and human disease [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(2): 285–99.
- [52] Pleinis J M, Norrell L, Akella R, et al. WNKs are potassium-sensitive kinases [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2021, 320(5): C703–21.
- [53] Maruyama J, Kobayashi Y, Umeda T, et al. Osmotic stress induces the phosphorylation of WNK4 Ser575 *via* the p38MAPK-MK pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18710.
- [54] Elvers K T, Lipka-Lloyd M, Trueman R C, et al. Structures of the human SPAK and OSR1 conserved C-terminal (CCT) domains [J]. *Chembiochem*, 2022, 23(1): e202100441.
- [55] Akella R, Humphreys J M, Sekulski K, et al. Osmosensing by WNK kinases [J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32(18): 1614–23.
- [56] Begum G, Yuan H, Kahle K T, et al. Inhibition of WNK3 kinase signaling reduces brain damage and accelerates neurological recovery after stroke [J]. *Stroke*, 2015, 46(7): 1956–65.
- [57] Zhang J, Gao G, Begum G, et al. Functional kinomics establishes a critical node of volume-sensitive cation-Cl<sup>-</sup> cotransporter regulation in the mammalian brain [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35986.
- [58] Josiah S S, Meor Azlan N F, Zhang J. Targeting the WNK-SPAK/OSR1 pathway and cation-chloride cotransporters for the therapy of stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1232.
- [59] Zhang J, Bhuiyan M I H, Zhang T, et al. Modulation of brain cation-Cl<sup>-</sup> cotransport *via* the SPAK kinase inhibitor ZT-1a [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 78.
- [60] Tao D, Liu F, Sun X, et al. Bumetanide: A review of its neuroplasticity and behavioral effects after stroke [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2019, 37(4): 397–407.
- [61] van Tuijl J H, van Raak E P M, van Oostenbrugge R J, et al. Treatment with diazepam in acute stroke prevents poststroke seizures: A substudy of the EGASIS trial [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2021, 50(2): 216–21.