

·基础研究·

常压氧对大鼠脑缺血再灌注损伤 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共转运蛋白1型的影响*

焦佳伟¹ 王 鹏^{1,5} 张留超² 何雄文³ 牛美兰² 李萌萌¹ 李 玲⁴ 张振香¹

摘要

目的:研究常压氧(NBO)对大鼠脑缺血再灌注损伤 $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共转运蛋白1型(NKCC1)的影响。

方法:采用线栓法构建大鼠大脑中动脉缺血模型(MCAO),术后2h进行神经功能评分,将其评分与假手术组进行比较。MCAO模型构建成功者进行再灌注,随机分为NBO组和模型组,NBO组于再灌注后采用体积分数60%NBO进行治疗。各组大鼠分别在0、2、4、6、12和24h处死,取脑组织进行HE染色及Western Blot检测。

结果:与假手术组相比,MCAO组神经功能评分显著增高,差异有显著性意义($P<0.05$)。HE染色结果显示模型组和NBO组大鼠缺血2h时脑组织均无明显病理结构改变,随着再灌注时间的延长,模型组大鼠脑组织病理改变逐渐增加,而与模型组相比,NBO组大鼠的脑组织病理改变明显减轻。Western Blot检测结果显示模型组和NBO组在起始2h内,脑组织NKCC1蛋白和缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)蛋白表达水平与正常脑组织相比没有明显变化($P>0.05$),随着再灌注时间的延长,模型组NKCC1蛋白和HIF-1 α 蛋白表达水平明显增加,NBO组NKCC1蛋白和HIF-1 α 蛋白表达水平虽有增加但其表达水平仍明显低于模型组($P<0.05$)。

结论:NBO疗法可以下调脑缺血再灌注后脑组织NKCC1蛋白和HIF-1 α 蛋白的表达,减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,促进大鼠神经功能恢复,具有脑损伤保护作用。

关键词 常压氧; $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共转运蛋白1型;缺血性脑卒中

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2020)-08-0932-06

Effects of normal baric oxygen on $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ cotransporter1 in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury/JIAO Jiawei, WANG Peng, ZHANG Liuchao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2020, 35(8): 932—937

Abstract

Objective:To study the effects of normal baric oxygen (NBO) on $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter1 (NKCC1) in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury.

Method:A rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established by thread embolization. The neurological function was scored 2 hours after operation and compared with the sham operation group. Successful MCAO models were randomly divided into NBO group and model group. The NBO group was treated with 60% normobaric oxygen after reperfusion. Rats in each group were sacrificed at 0, 2, 4, 6, 12 and 24h respectively. Brain tissues were taken for HE staining and Western blot.

Result:Compared with sham operation group, the neurological function score of MCAO group was significantly higher. HE staining showed that there were no obvious pathological changes in brain tissue in model group and NBO group after 2 hours of ischemia. The pathological changes of brain tissue of model group increased

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2020.08.009

*基金项目:河南省科技厅项目(162102310234,192102310351);河南省教育厅创新人才项目(20HASTIT047)

1 郑州大学护理与健康学院基础教研室,河南省郑州市,450001; 2 黄河科技学院药理教研室; 3 河南省中医药研究院附属医院;

4 郑州市第九人民医院姑息治疗暨安宁疗护病区; 5 通讯作者

第一作者简介:焦佳伟,女,硕士研究生; 收稿日期:2019-04-25

gradually with the prolongation of reperfusion. Compared with the model group, the pathological changes of brain tissue in NBO group were significantly alleviated. Western Blot results showed that the expression levels of NKCC1 protein and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein in brain tissues of model group and NBO group did not change significantly compared with normal brain tissues within 2 hours after the onset of reperfusion($P>0.05$). With the prolongation of reperfusion time, the expression levels of NKCC1 protein in model group increased significantly($P>0.05$), and the expression levels of NKCC1 protein and HIF-1 α protein in NBO group increased lesser than those in model group($P<0.05$).

Conclusion: NBO therapy can down-regulate the expression of NKCC1 and HIF-1 α in brain tissue after cerebral ischemia-reperfusion, alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, promote the recovery of neurological function, and has protective effect on brain injury.

Author's address Nursing and Health School of Zhengzhou University, Zhengzhou, 450001

Key word normobaric oxygen; Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter 1; ischemic stroke

脑卒中是最常见的急性脑血管疾病,发病率高,死亡率高^[1]。尽管目前对脑卒中的机制和治疗方法进行了广泛的调查,但有效的治疗方案仍然非常有限。脑是人体对缺氧最为敏感的器官,它虽然只占体重的2%,但其耗氧量占整个机体耗氧量的20%^[2-3]。缺血半暗带神经细胞由于缺氧导致的线粒体代谢障碍和白质及灰质损伤是神经细胞凋亡的关键因素,同时也会导致局部脑组织及其功能的损害,其损害程度与缺血缺氧时间长短及残存血流量多少有关,改善缺血半暗带氧供,治疗急性缺血性卒中(acute ischemic stroke,AIS)是近年来的研究热点。近年来常压氧(normobaric oxygen, NBO)治疗方法在卒中研究领域逐渐被关注。作为最简单、直接、有效的供氧方式^[4],NBO能够直接改善缺血脑组织氧合状态,提高缺血脑组织能量代谢,增加大脑血流量和氧输送,在恢复脑组织氧分压方面有显著功效,对脑缺血再灌注损伤涉及的一系列复杂病理过程予以干预保护^[5],目前国内外学者对常压氧疗研究报道逐渐增多^[6]。

Na⁺-K⁺-2Cl⁻共转运蛋白(Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter, NKCC)是属于SLC12基因家族的阳离子氯化物协同转运蛋白,具有NKCC1和NKCC2两个亚型^[7]。其中NKCC1在不同动物的不同组织中普遍存在,而NKCC2主要表达于亨利氏攀髓攀升支粗段肾上皮细胞的管腔膜上。研究发现,NKCC1在大脑皮质和小脑神经元、胶质细胞、脑毛细血管内皮细胞和脉络丛上皮细胞中高表达^[8],维持和调节细胞体积和离子浓度,调节细胞的生长和发育^[9-10]。Yan等报道大鼠脑缺血后NKCC1的表达明显上调^[11],抑

制NKCC1能够明显降低缺血引起的脑损伤^[12]。目前对于NBO在脑缺血再灌注中对NKCC1蛋白水平影响的研究鲜有报道,因此本研究通过线栓法构建大鼠大脑中动脉缺血模型(middle cerebral artery occlusion, MCAO),旨在观察NBO对大鼠脑缺血再灌注损伤中NKCC1蛋白和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)蛋白水平的影响,探讨NBO疗法对大鼠缺血性脑损伤的保护机制,以求为临床缺血性脑卒中患者氧疗提供重要的理论依据,设计出更有效的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

10月龄健康雄性SPF级SD大鼠72只,体重450—550g,由河南省实验动物中心提供。投喂清洁的饲料和水,在22—25℃的恒温环境下遵循12h昼/12h夜循环饲养。所有的实验均由郑州大学伦理委员会批准进行。

1.2 主要试剂及仪器

兔抗NKCC1抗体、小鼠抗HIF-1 α 抗体,小鼠抗 β -actin抗体购自Santa Cruz公司,羊抗小鼠IRDye®800和羊抗兔IRDye®680购自英国Abcam公司(用于Western Blot法),其余试剂由德国Sigma-Aldrich公司提供。Odyssey红外荧光成像系统购自美国LICOR公司,IX73型荧光倒置显微镜购自日本OLYMPUS公司。

1.3 MCAO模型的建立

参照MCAO模型的线栓法建模^[13],将直径为0.26mm市售尼龙渔线剪成每段6cm长,消毒备用。

66只大鼠用体积分数10%水合氯醛3.5ml/kg腹腔注射麻醉后仰卧位固定,沿颈正中切开皮肤,钝性分离右侧颈总、颈内、颈外动脉。结扎颈外动脉,夹闭颈总动脉和颈内动脉,于颈总与颈内动脉分岔口上端的颈总动脉上剪口,经颈总动脉分叉处插入备好的尼龙渔线进入颈内动脉到达大脑中动脉,有阻力时停止,栓子插入的深度为20—25mm。固定线栓,缝合,手术后注意保暖,并将大鼠单独放一笼内,造模2h后观察大鼠行为。另设6只大鼠为假手术组作为阴性对照,制作步骤同MCAO组,但血管分离后不插线栓,不结扎血管。

1.4 NBO治疗

缺血2h后进行神经功能评分,与假手术组进行比较。整个造模过程中失败6例,造模成功的60例大鼠拔出线栓^[5],随机分为模型组和NBO组各30例。术后NBO组采用体积分数60%NBO进行治疗,将缺血2h再灌注后造模成功的大鼠置于自制封闭氧舱(50cm×30cm×30cm,侧面有2个1cm×1cm的小孔与外界相通,一侧连接氧气和氮气瓶,另一侧与测氧仪相通)中吸氧,分别调节氧气瓶和氮气瓶阀门,用测氧仪监测氧含量,调节氧气和氮气使盒内氧气含量达到体积分数为60%,持续吸氧0、2、4、6、12和24h后采集标本。模型组封闭氧舱内氧气含量为21%,其余操作同NBO组。

1.5 神经功能评分

根据文献[14]标准进行评分,无神经系统功能缺损症状,活动正常者评为0分;不能完全伸展对侧前爪者评为1分;爬行时出现转圈者评为2分;行走时身体向偏瘫侧倾倒者评为3分;不能自发行走,意识丧失者评为4分。

1.6 标本采集与染色

在造模0、2、4、6、12、24h后,模型组和NBO组分别抽取6只大鼠处死,断头取脑,取各组3只右侧脑组织分装于冻存管中,立即放入液氮冻存,随后放-80℃冰箱保存,以供Western Blot检测。另外3只大鼠右侧脑组织用4%多聚甲醛固定24h后,常规脱水、透明、石蜡包埋,冠状位切片。

HE染色:石蜡切片常规脱蜡至水,苏木素染色4min,自来水冲洗,1%盐酸乙醇分色2s,自来水洗后酸化伊红复染2min,水洗,脱水,透明,封片,显微镜

下观察脑组织形态及结构的变化。

1.7 Western Blot法检测NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平

取少量缺血皮质,提取其总蛋白,对蛋白进行定量,兔抗NKCC1、鼠抗HIF-1 α 和鼠抗 β -Actin(1:1000)4℃过夜孵育,羊抗鼠IRDye® 800和羊抗兔IRDye®680(1:10000)室温孵育2h。Odyssey红外荧光扫描成像系统扫描,Image Studio Lite Ver 4.0软件分析图像结果。 β -Actin为内参计算相对值,每组实验重复3次。

1.8 统计学分析

结果以均数±标准差表示,计量数据分析采用SPSS10.0统计软件正态性检验和方差齐性检验后,神经功能评分数据和同一时间点两组间蛋白水平差异采用两独立样本 t 检验,不同时间点蛋白水平变化进行单因素方差分析后,采用Student-Newman-Keuls t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 神经功能评分结果

MCAO造模成功的大鼠神经功能评分为 3.05 ± 0.42 ,均出现了不同程度的神经功能缺损,与假手术组相比(0.00 ± 0.00),差异有显著性意义($P<0.01$)。

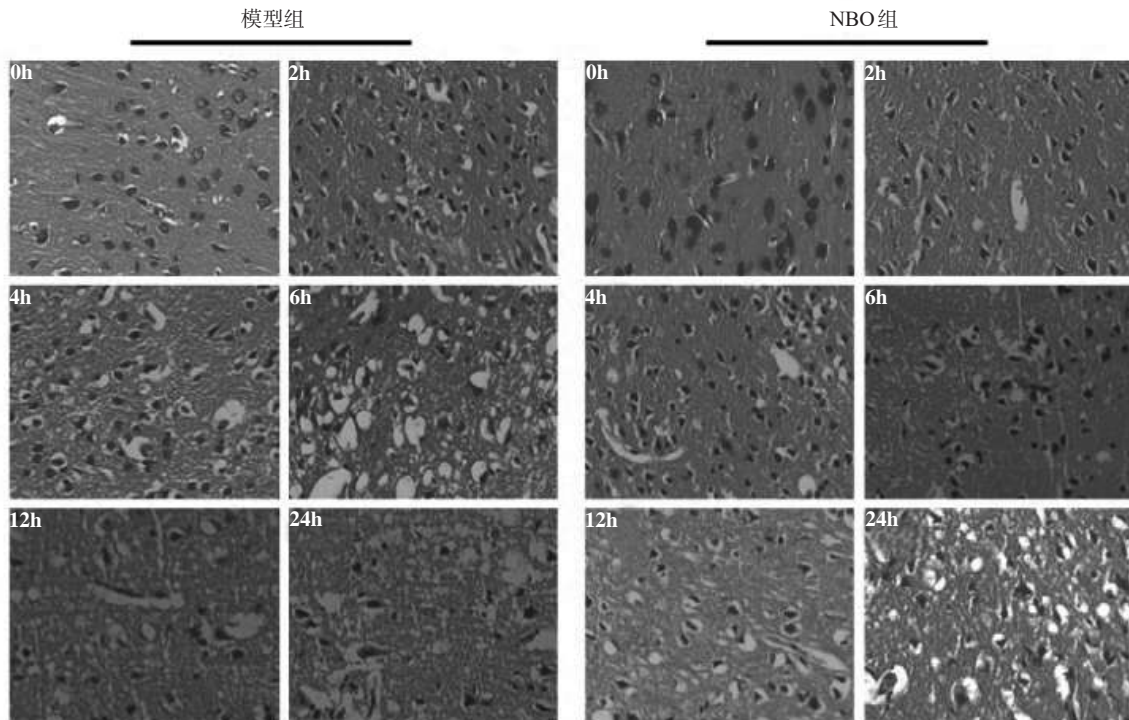
2.2 病理组织检查结果

模型组和NBO组的0h组结构和形态完整,神经细胞排列整齐,毛细血管内皮细胞正常、排列连接紧密、组织致密。缺血再灌注2h内两组大鼠脑组织均无明显的浓缩、深染,形态结构改变不明显,然而从缺血再灌注4h起,随着缺氧再灌注时间的延长,模型组脑组织病理改变愈加明显,逐渐出现明显的组织水肿,在缺血中心区域可见坏死组织逐渐增多,着色浅的坏死面积明显增大,呈筛网状,坏死细胞核皱缩明显,坏死区域内可见嗜酸性、核着色差和核溶解的神经细胞。NBO组自缺氧再灌注4h起,坏死组织逐渐增多,24h坏死区域可见较多嗜酸性、核着色差和核溶解的神经细胞,但与模型组相比,病变程度减轻,见图1。

2.3 脑组织NKCC1和HIF-1 α Western Blot结果

大鼠脑组织缺血再灌注各个时间点的NKCC1和HIF-1 α 蛋白的表达水平如图2所示。结果显示,模型组缺血再灌注2h时,NKCC1和HIF-1 α 蛋白水

图1 脑组织病理检查结果

(HE染色, $\times 200$)

注:分别在缺血再灌注0,2,4,6,12和24h采集模型组和NBO组大鼠大脑组织标本进行病理学检查

平(0.113 ± 0.009 和 0.119 ± 0.011)与0h相比(0.104 ± 0.014 和 0.115 ± 0.010),没有明显升高($P > 0.05$)。随着缺血再灌注时间的延长,NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平逐渐升高,在缺血再灌注12h时,NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平分别达到 0.192 ± 0.015 和 0.295 ± 0.011 ,与0h相比蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。缺血再灌注24h,NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平有轻微升高(0.211 ± 0.014 和 0.304 ± 0.010),但与缺血再灌注12h的蛋白水平相比,差异没有显著性意义($P > 0.05$)。

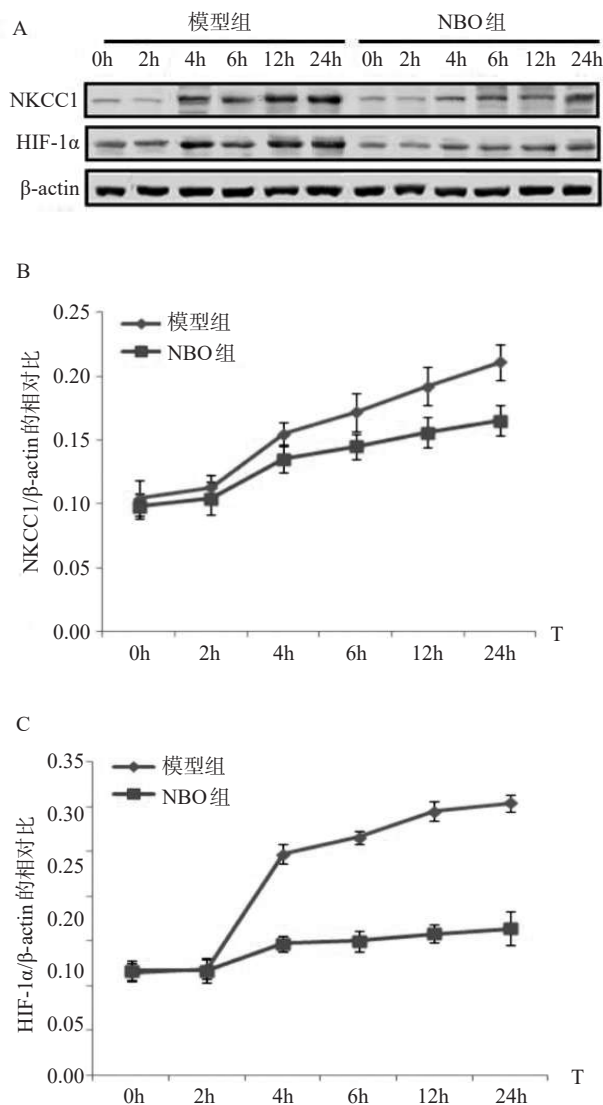
NBO组缺血再灌注2h时NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平(0.104 ± 0.013 和 0.117 ± 0.014)与0h时相比(0.098 ± 0.010 和 0.117 ± 0.011),NKCC1蛋白和HIF-1 α 蛋白水平基本没变化($P > 0.05$)。自缺血再灌注4h起,NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平分别达到(0.135 ± 0.010 和 0.147 ± 0.009),与0h相比蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。缺血再灌注24h时,NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平有轻微升高(0.165 ± 0.012 和 0.164 ± 0.019),但与缺血再灌注4h的蛋白水平相比,差异没有显著性意义($P > 0.05$),结果见图2。

各个时间点的两组间蛋白水平差异采用两独立样本 t 检验,结果发现NBO组和模型组NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平在缺氧2h内没有明显差异($P > 0.05$)。但是自缺氧4h起,NBO组NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平均明显低于模型组水平,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

脑缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中的主要生理病理过程,缺血、缺氧在缺血脑组织的病理发生发展过程中起重要作用,提高脑组织氧供将会减轻脑组织损伤,是治疗脑卒中合理、重要的治疗方法^[15]。按供氧方式不同,氧疗可以分为高压氧(hyperbaric oxygen,HBO)和NBO。HBO能显著提高缺血脑组织的氧分压,有助于防止缺血脑组织的坏死,具有无创性的优势,在治疗缺血性脑损伤中得到医学上的肯定。但由于其需要高压氧舱和专业技术人员,通常急性缺血性脑卒中患者难以及时地接受HBO治疗,所以HBO治疗在临床应用中受到一定程度的限

图2 Western Blot法检测脑组织NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注:A.Western Blot法检测脑组织NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平;
B.NKCC1/β-actin相对值测定结果;C.HIF-1 α /β-actin相对值测定结果

制。NBO虽疗效不及高压氧,但具有简单易行,价格低廉、易于临床推广应用,并可有效延长脑缺血溶栓时间窗^[16]等优势,但同时有一些研究持反对意见,认为常压高浓度氧疗可增加神经元变性及脑水肿的风险,因此NBO在急性脑卒中应用的安全性和有效性需要进一步研究和探索。

本研究首先通过病理组织学检查,结果发现模型组和NBO组在缺血2h再灌注后的各个时间点,

NBO组的脑组织病理改变明显轻于模型组,说明NBO疗法可以减少神经细胞的死亡、具有神经保护功能^[17]。这一结果得到其他研究的支持^[13]。进一步通过Western Blot法检测缺氧指标HIF-1 α 蛋白,发现模型组HIF-1 α 蛋白自缺氧再灌注4h起明显增加,并且在缺氧再灌注12h后的一段时间内保持高水平。该结果与本课题组前期研究结果基本一致,并且也得到其他研究的支持^[2]。但是NBO组缺血再灌注4h后缺氧指标HIF-1 α 蛋白的表达明显低于模型组,说明NBO疗法可以下调脑缺血再灌注后脑组织HIF-1 α 蛋白的表达,改善脑组织缺氧状况^[13]。

细胞膜上具有许多重要的离子转运蛋白,NKCC1在生理条件下,主要分布于微血管内皮细胞、星形胶质细胞和神经元的细胞膜上,是中枢神经系统重要的离子转运蛋白^[18],主要调节神经元、神经胶质细胞、内皮细胞、脉络丛上皮细胞中Na⁺、K⁺、Cl⁻离子的平衡,从而维持血脑屏障离子通透性,保持神经元细胞正常离子浓度和容积^[17],协助维持适当的细胞体积变化^[19-20]。有研究证实在大鼠缺血的模型上,皮层神经元中NKCC1的转录水平和蛋白水平都会显著的上调,介导水进入细胞内,诱发脑水肿,此外还可促进Ca²⁺内流,引起细胞内Ca²⁺“超载”现象,加重细胞损伤。反之,抑制NKCC1的表达可以减轻脑梗死面积,同时降低脑缺血造成的脑水肿风险^[12]。但是有关NBO在脑缺血再灌注中对NKCC1的生物活性及水平的影响的研究尚未见报道。因此本研究通过线栓法构建大鼠大脑MCAO,研究NBO对大鼠脑缺血再灌注损伤脑组织NKCC1蛋白表达的影响,观察NBO疗法对大鼠缺血性脑损伤的保护作用,为临床缺血性脑卒中患者氧疗和护理监测提供重要理论依据。

通过Western Blot法研究发现模型组和NBO组大鼠脑组织NKCC1蛋白的表达水平在缺血再灌注开始2h内基本无变化。随着缺血再灌注时间的延长,模型组NKCC1蛋白水平显著增高,并且在缺血12h后保持高水平。NBO组大鼠在缺氧再灌注4h后的各个时间点的NKCC1蛋白水平的表达均明显低于模型组。该结果表明缺血性脑卒中的NBO氧疗法可以下调脑组织NKCC1蛋白表达水平,从而抑制NKCC1的过度激活,减轻神经毒性和细胞

水肿,从而起到保护脑组织的作用。

综上所述,NBO疗法可以下调脑缺血再灌注后脑组织NKCC1蛋白和HIF-1 α 蛋白的表达,减轻大鼠脑缺血再灌注损伤,促进大鼠神经功能恢复,具有脑损伤保护作用。模型组和NBO组的NKCC1和HIF-1 α 蛋白水平在缺血再灌注2h内基本维持在正常水平,脑组织形态结构改变不明显,随着缺氧时间的延长,模型组大鼠脑细胞NKCC1表达增加,引起脑细胞损伤。但是NBO组大鼠在缺血再灌注2h之后的各个时间点,由于进行氧疗干预,其NKCC1蛋白和HIF-1 α 蛋白水平均无明显大幅度增加且均低于模型组水平。该结果表明在脑缺血再灌注损伤中,NBO疗法可以下调NKCC1和HIF-1 α 蛋白的表达,从而起到减少脑细胞的死亡,降低脑梗死体积、保护血脑屏障、改善神经功能的作用,证实了NBO氧疗是缺血性脑卒中的有效治疗康复手段,为临床缺血性脑卒中患者进行氧疗提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] Feng R,Wang P, Gao C,et al. Effect of sertraline in the treatment and prevention of poststroke depression: a meta-analysis[J]. *Medicine*(Baltimore), 2018, 97(49):e13453.
- [2] Wang P,Li L,Zhang Z, et al. Time-dependent activity of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 and homeostasis of intracellular pH in astrocytes exposed to CoCl₂ treatment[J].*Mol Med Rep*, 2016, 13(5):4443—4450.
- [3] Wang P, Li L, Zhang Z, et al. Time dependent homeostasis between glucose uptake and consumption in astrocytes exposed to CoCl₂ treatment[J].*Mol Med Rep*,2016, 13(3):2909—2917.
- [4] 陈素艳, 张振香, 高峰. 常压吸氧对急性缺血性脑卒中中的作用的研究进展[J]. *中华物理医学与康复杂志*,2014,36(10):813—816.
- [5] Shi S,Qi Z, Ma Q, et al. Normobaric hyperoxia reduces bloodoccludin fragments in rats and patients with acute ischemic stroke[J].*Stroke*,2017,48(10):2848—2854.
- [6] 王珂, 张振香,陈素艳, 等. 45%浓度氧对大鼠缺血再灌注损伤的实验研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2013, 16(13):50—51.
- [7] 曲连龙, 张金伟. Na-K-2Cl协同转运蛋白(NKCC1)在缺血性脑水肿中的研究进展[J]. *卒中与神经疾病*,2014, 21(2):114—117.
- [8] Zhang J, Pu H, Zhang H, et al. Inhibition of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter attenuates blood- brain- barrier disruption in a mouse model of traumatic brain injury[J].*Neurochem Int*, 2017, 111:23—31.
- [9] 周亚亚, 贺福初, 姜颖. Na-K-Cl协同转运蛋白研究进展[J]. *现代生物医学进展*,2011,11(15):2996—3000.
- [10] Haas M.The Na-K-Cl cotransporters[J].*Am J Physiol Cell Physiol*,1994,267,C869—C885.
- [11] Yan Y, Dempsey RJ, Flemmer A, et al.Inhibition of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage[J].*Brain Res*, 2003, 961(1): 22—31.
- [12] Walcott BP, Kahle KT, Simard JM. Novel treatment targets for cerebral edema[J]. *Neurotherapeutics*, 2012, 9(1):65—72.
- [13] 陈素艳,高峰,张清勇, 等. 不同浓度常压氧对大鼠脑缺血再灌注损伤早期的保护作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2014,31(1): 111—113.
- [14] 易呈志, 廖忆刘, 易成腊, 等. BK通道对大鼠脑缺血再灌注损伤神经细胞内钙离子浓度及凋亡的影响[J]. *中华实验外科杂志*,2011,28(9):1431—1433.
- [15] 刘益,隋树杰, 张倩, 等. 常压氧疗治疗缺血性脑卒中的实验研究[J]. *护理研究*,2013,27(5):1265—1267.
- [16] 师文娟,梁佳,董雯,等. 常压高浓度氧治疗对脑缺血一再灌注大鼠星形胶质细胞活性的影响[J]. *首都医科大学学报*,2015, 36(5):709—713.
- [17] 杨冰, 李明, 刘信龙, 等. 海水浸泡开放性颅脑外伤早期水通道蛋白4和Na⁺-K⁺-2Cl⁻协同转运蛋白1表达的改变[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志*,2017,24(1):1—5.
- [18] Wang P, Wang X, Li L,et al. Role of sodium-hydrogen exchanger isoform 1 in regulating hepatocyte apoptosis induced by hyperammonaemia[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2018, 41(8):490—497.
- [19] Jayakumar AR,Norenberg MD.The Na-K-Cl Co-transporter in astrocyte swelling[J].*Metabolic Brain Disease*,2010,25(1): 31—38.
- [20] Zhang J,Pu H,Zhang H, et al. Inhibition of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter attenuates blood- brain- barrierdisruptionin a mouse model of traumatic brain injury[J].*Neurochem Int*, 2017,111:23—31.