

T10 脊髓节段损伤后神经源性膀胱中逼尿肌蛋白组学的生物信息分析*

唐丽亚¹ 瞿启睿¹ 刘 琼¹ 张雨辰¹ 吴 霞¹ 胡碧浓¹ 龙轶映¹ 许 明¹ 张 泓¹ 艾 坤^{1,2}

摘要

目的:利用生物信息分析筛查骶上脊髓损伤后神经源性膀胱中逼尿肌的差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)和关键信号通路。

方法:采用Hassan Shaker脊髓横断法制作骶上脊髓损伤模型,利用TMT定量标记技术检测逼尿肌中表达的蛋白质,将差异倍数(fold change, FC)>1.2或<1/1.2, $P<0.05$,独立肽段(unique peptide) ≥ 2 的蛋白质定义为DEPs,使用Metascape对DEPs进行KEGG通路富集分析。利用STRING及Cytoscape软件构建PPI网络,使用CytoHubba插件结合蛋白质的degree值筛选前10位的DEPs。

结果:模型组较空白组大鼠漏尿点压力、膀胱最大容量和逼尿肌收缩频率明显升高($P<0.01$);HE染色显示模型组逼尿肌移行上皮增厚,肌纤维排列层次欠清晰。在逼尿肌中总共筛选出了244个DEPs,其中上调128个,下调116个;KEGG中显著富集了磷酸戊糖途径、肌动蛋白细胞骨架调节和多巴胺能突触等15条信号通路;通过CytoHubba筛选出前10位的DEPs:6-磷酸葡萄糖脱氢酶(glucose dehydrogenase 6-phosphate, G6pd)、突触素(synaptophysin, Syp)、微管相关蛋白(microtubule-associated protein, Mapt)等。

结论:糖代谢、细胞骨架信号系统、多巴胺能突触等方面可成为骶上脊髓损伤后逼尿肌无抑制性收缩的潜在干预靶点。

关键词 骶上脊髓损伤;神经源性膀胱;蛋白组学;生物信息分析;差异表达蛋白;逼尿肌

中图分类号:R651.2,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-07-0865-07

Bioinformatics analysis of detrusor proteomics in neurogenic bladder after T10 spinal cord injury/TANG Liya, QU Qirui, LIU Qiong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(7):865—871

Abstract

Objective: Bioinformational analysis was used to screen out the differentially expressed proteins(DEPs) and key signaling pathways of bladder detrusor muscle in the pathogenesis of neurogenic bladder(NB) after suprasacral spinal cord injury(SSCI).

Method: A modified Hassan Shaker spinal cord transection method was used to produce a SSCI model. The proteins expressed in the bladder detrusor were detected by using TMT labeling quantitative proteomics. Proteins that showed $FC>1.2$ or $<1/1.2$, $P<0.05$, and unique peptide ≥ 2 were defined as DEPs. Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) pathway enrichment was performed on DEPs by using metascape. Constructing PPI network by using string database and Cytoscape software. CytoHubba combined with degree value was used to screen out the top 10 DEPs.

Result: Compared with the blank group, LPP, MCC and detrusor contraction frequency of the model group significantly increased($P<0.01$). HE staining showed that the transitional epithelium of the bladder detrusor in the model group was thickened and the arrangement of muscle fibers was not clear. A total of 244 DEPs were screened out in the bladder detractor, in which 128 were up-regulated and 116 were down-regulated. KEGG

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.07.001

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81874510);湖南省大学生创新创业训练计划项目(S202110541019);湖南省教育厅一般项目(20C1432)

1 湖南中医药大学,湖南省长沙市,410208; 2 通讯作者

第一作者简介:唐丽亚,女,硕士研究生;收稿日期:2021-07-20

mainly enriched 15 signaling pathways, such as Pentose phosphate pathway、actin cytoskeleton regulation and Dopaminergic synaptic signaling pathway, etc. The top 10 DEPs were selected by CytoHubba: glucose dehydrogenase 6-phosphate(G6pd), synaptophysin(Syp), microtubule-associated protein(Mapt), etc.

Conclusion: Potential targets of the treatment of uninhibited detrusor contraction after SSCI can be explored from the aspects of glucose metabolism, cytoskeleton signaling system and dopaminergic synapse.

Author's address College of Acupuncture, Massage and Rehabilitation, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, 410208

Key word suprasacral spinal cord injury; neurogenic bladder; proteomics; bioinformatics analysis; differentially expressed proteins; detrusor

神经源性膀胱(neurogenic bladder, NB)是骶上脊髓损伤(suprasacral spinal cord injury, SSCI)的严重并发症之一^[1]。根据括约肌是否能协同,可表现为逼尿肌反射亢进(尿失禁)型或逼尿肌-括约肌协同失调(尿潴留)型神经源性膀胱。两类神经源性膀胱均有一个共同的病理特点,即逼尿肌无抑制性收缩。在临床上,抑制逼尿肌收缩可明显改善膀胱的功能,逼尿肌反射亢进型膀胱可有效改善尿失禁,逼尿肌-括约肌协同失调型可有效防止尿液返流,减轻肾损伤^[2]。因此,缓解逼尿肌无抑制性收缩是治疗骶上脊髓损伤后神经源性膀胱的主要思路之一。有研究显示,脊髓损伤后膀胱中蛋白质的表达发生了显著变化,这些差异表达蛋白(differentially expressed proteins, DEPs)可能对脊髓损伤后NB的功能改善产生重要影响^[3]。开展蛋白组学生物信息分析可从多个角度探讨逼尿肌无抑制性收缩的病理机制,帮助我们挖掘潜在的治疗靶点^[4]。

目前,关于骶上脊髓损伤所致NB的机制探讨主要从特定的角度展开研究,涉及逼尿肌末梢神经递质的释放、传入神经C纤维的兴奋性、膀胱平滑肌/间质细胞兴奋性等方面^[5]。从蛋白组学生物信息分析的角度展开的研究相对较少。本研究以骶上脊髓损伤后逼尿肌-括约肌协同失调型大鼠为动物模型^[6],以逼尿肌为靶点,使用TMT定量标记技术检测逼尿肌中DEPs,并对DEPs进行生物信息学分析,以期挖掘NB潜在的临床治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物设计

1.1.1 实验动物来源及分组:由湖南中医药大学动物实验中心(SPF级)提供的40只250—280g的健康

雌性成年SD大鼠(合格证编号:1107271911006889),饲养于湖南中医药大学动物中心实验室,饲养温度24—26℃,湿度50%—70%。

40只大鼠随机分为空白组(12只)和模型组(28)只,其中模型组28只大鼠采用Hassan Shaker脊髓横断法制备SSCI模型,脊髓休克过后共存活25只,其中13只模型组大鼠符合模型标准,12只不符合模型标准,予以剔除。符合模型标准的13只大鼠2次随机抽取12只纳入模型组。

1.1.2 SSCI模型制备:大鼠造模前2h腹腔注射青霉素钠20万单位以抗炎。10%的水合氯醛,按30mg/kg腹腔麻醉,大鼠俯卧固定在鼠板上,于第8—9胸椎处备皮、消毒,做长约2—3cm的纵向切口,暴露T8、T9的棘突和相邻的椎弓。用显微咬骨器咬除T8椎板和两侧椎弓根,暴露脊髓,牙科弯钩勾出脊髓,刀片横断。缝合肌肉,用5%碘伏消毒切口及周围,缝合皮肤。术后将大鼠放置在恒温电热毯上直至苏醒,单笼饲养;术后1周早晚腹腔注射青霉素钠;每天早、中、晚定时Crede手法辅助排尿;出现压疮、自残现象用碘伏消毒。空白组大鼠正常喂养直到尿流动力学检测,中途不做其它处理。

1.1.3 动物模型评估:①后肢运动功能评估:大鼠在行走时后肢处于拖动状态,BBB(Basso-Beattie-Bresnahan)运动评分^[7]为0分,则认为是成功的骶上脊髓损伤模型。②膀胱排尿功能评估:逼尿肌-括约肌协同失调型神经源性膀胱大鼠脊髓休克过后表现为膀胱胀大,大鼠下腹部及笼内垫料轻度潮湿;手法排尿时感觉尿道口有阻力;肌电图显示逼尿肌收缩频率增高,尿流动力学结果显示膀胱漏尿点压力(leak point pressure, LPP)、膀胱最大容量(maximum cystometric capacity, MCC)增高,则提示造模成功。

1.2 尿流动力学和逼尿肌电信号检测

手术后第15天对对照组和模型组行尿流动力学检查^[8-9]:大鼠腹腔注射10%的水合氯醛,麻醉满意后取仰卧位,在耻骨联合上前正中中线作纵向3cm切口,暴露膀胱,于膀胱顶处剪一小口,将F3导尿管插入膀胱内,通过三通管将多通道生理记录仪、微量注射泵与F3导尿管连接,打开微量注射泵以0.1ml/min注入温度为25—35℃的生理盐水,记录膀胱压力曲线、LPP、MCC。在膀胱体表面平行插入一对针形电极,地线电极接腹部肌肉,与MP150多通道生理记录仪相连,检测逼尿肌电信号。

1.3 HE染色

左心室灌注0.9%的生理盐水直至右心耳流出清亮液体,钝性分离膀胱组织,在冰上取膀胱逼尿肌,0.4%的多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片后用二甲苯脱蜡,乙醇清洗,苏木精(Servicebio, China)染色10min,自来水浸泡15min,1%伊红(Servicebio, China)染色10min,乙醇和二甲苯脱水,中性树胶封片固定,显微镜下观察膀胱逼尿肌的结构。

1.4 获取DEPs

提取大鼠膀胱逼尿肌;剪碎组织,加入工作液(RIPA裂解液与蛋白酶抑制剂混合)混匀,冰浴超声30min;14000r/min、4℃离心5min,收集上清液于EP管中;使用BCA蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。

经过TMT标记和高通量LC-MS/MS定量分析后得到逼尿肌组织中表达的蛋白质,MaxQuant(version 1.6.1.0)搜库。将差异倍数(fold change, FC)>1.2或<1/1.2, $P<0.05$, 独立肽段 ≥ 2 的蛋白定义为DEPs。

1.5 DEPs的生物信息分析

将DEPs对应的基因名(gene symbol)导入Metascape(<https://metascape.org>)^[10],选择物种Rattus. norvegicus进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析;利用STRING数据库(<https://string-db.org/>)构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,下载tsv格式的分析结果并导入到Cytoscape软件^[11],对PPI做进一步可视化分析,利用Cytoscape中的CytoHubba插件^[12]和DEPs的degree值筛选PPI网络中前10位的关键基因。

1.6 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件进行数据处理。计量资料符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差表示,两组均数比较,满足正态性和方差齐性用 t 检验,不满足则用Wilcoxon检验。显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

空白组12只大鼠一般情况良好。模型组12只大鼠脊髓休克期过后,后肢随意运动消失,行走时后肢处于拖动状态,膀胱胀大,大鼠下腹部及笼内垫料轻度潮湿,手法排尿时感觉到尿道口有阻力。

2.1 尿流动力学和逼尿肌电信号

与空白组相比,模型组LPP、MCC和逼尿肌收缩频率明显增高($P<0.01$)(表1),膀胱内压力变化曲线和逼尿肌电信号见图1、图2。

2.2 HE染色观察结果

空白组逼尿肌上皮整齐紧密排列但有轻微脱落,无炎细胞浸润及充血水肿,肌纤维束排列层次较清晰(图3)。模型组移行上皮增厚,伴有大量单核细胞浸润,组织充血水肿明显,部分区域伴有微血管破裂出血改变,肌纤维排列层次欠清晰(图4)。

图1 空白组膀胱内压力曲线与逼尿肌电信号对照图

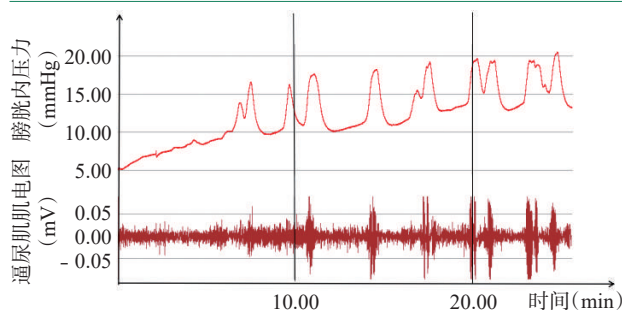


图2 模型组膀胱内压力曲线与逼尿肌电信号对照图

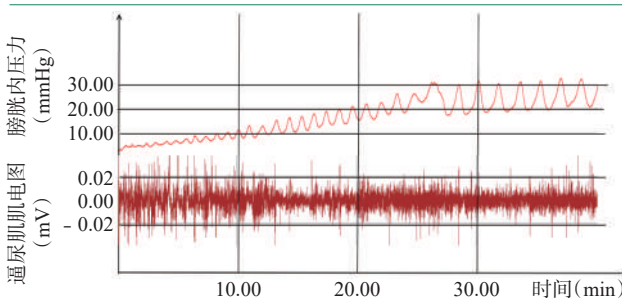


表1 大鼠膀胱漏尿点压力(LPP)、最大膀胱容量(MCC)和逼尿肌收缩频率比较 (x±s)

组别	例数	LPP (mmHg)	MCC (ml)	逼尿肌收缩频率 (Hz)
空白组	12	19.36±6.31	0.44±0.28	7.5±2.26
模型组	12	40.35±10.66 ^①	4.72±1.24 ^①	14.88±1.55 ^①
P值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与空白组比较,①P<0.01。

2.3 串联质量标签(tandem mass tag, TMT)定量分析

TMT定量分析共检测到6043个蛋白,根据FC>1.2或<1/1.2、P<0.05、独立肽段(unique peptide)≥2筛选出模型组/空白组中244个DEPs(图5)。其中,上调的蛋白有128个,下调的蛋白有116个。

2.4 DEPs的生物信息分析

2.4.1 DEPs的KEGG通路富集分析:本实验共检测到了405条通路,设置P<0.05共筛选出15条KEGG通路:碳代谢、帕金森病(多巴胺能突触)、肌动蛋白细胞骨架调节等(图6、表2)。

2.4.2 DEPs的PPI分析:利用STRING和Cytoscape制作244个DEPs的PPI图(图7),使用CytoHubba插件筛选出前10位的关键蛋白(图8),其生物学作用见表3。

3 讨论

本实验结果显示,模型组膀胱组织移行上皮增厚,伴有大量单核细胞浸润,组织充血水肿明显,肌纤维排列层次欠清晰;逼尿肌收缩频率明显增高,处于持续兴奋状态,但此时最大膀胱容量却明显增大,这说明在逼尿肌收缩的同时,由于括约肌无法协同

松弛,导致尿液滞留于膀胱,膀胱容量和漏尿点压力均增大。这反映逼尿肌与括约肌协同失调,提示造模成功。

逼尿肌中DEPs的KEGG通路富集分析结果显示,碳代谢、磷酸戊糖途径和胰高糖素信号通路等参与了该病的病理过程,CytoHubba筛选出的前10位关键基因中G6pd^[13]、Ldha^[14]、Eno1、Pkm^[15]、Aldoa和

图3 空白组膀胱逼尿肌 (HE染色,×100)

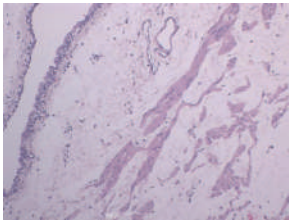


图4 模型组膀胱逼尿肌 (HE染色,×100)

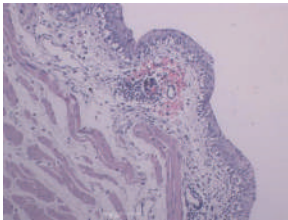
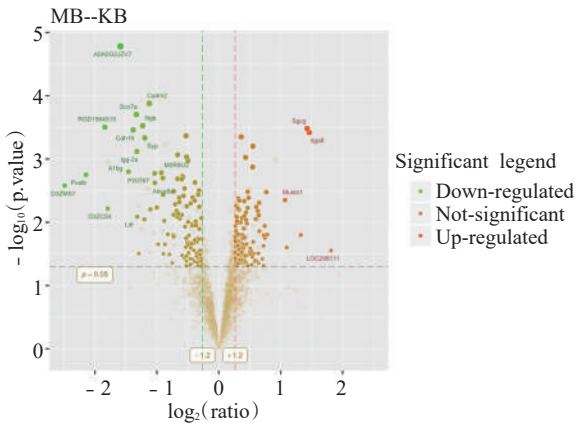


图5 244个差异表达蛋白(DEPs)的火山图



注:绿色代表下调的DEPs,橙色代表上调的DEPs,棕色代表无显著性意义的蛋白。

图6 244个DEPs的KEGG通路富集分析结果

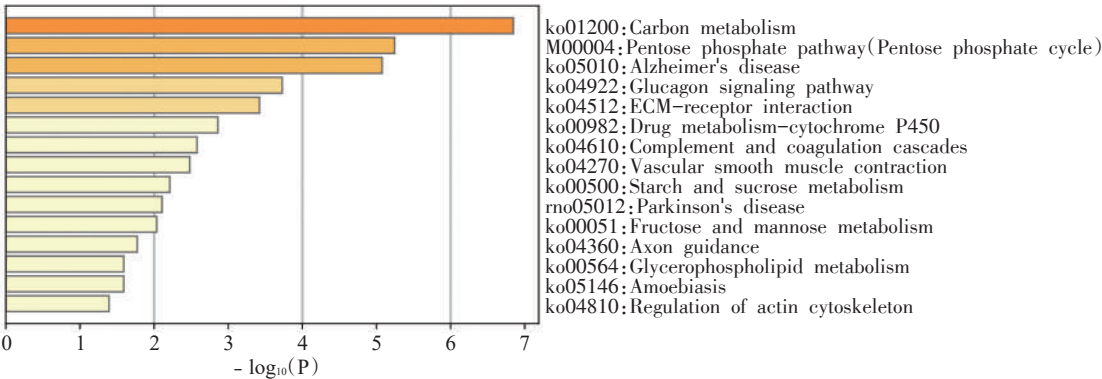


表2 244个DEPs的KEGG通路富集分析

KEGG 信号通路	中文名称	输入蛋白质数	%	Log10(P)
ko01200:Carbon metabolism	碳代谢	11	5.24	- 6.85
M00004:pentose phosphate pathway (pentose phosphate cycle)	磷酸戊糖途径	4	1.9	- 5.24
ko05010:Alzheimer's disease	阿尔茨海默病	11	5.24	- 5.08
ko04922:glucagon signaling pathway	胰高糖素信号通路	7	3.33	- 3.73
ko04512:ECM - receptor interaction	细胞外基质受体相互作用	6	2.86	- 3.42
ko00982:drug metabolism - cytochrome P450	药物代谢 - 细胞色素 P450	5	2.38	- 2.86
ko04610:complement and coagulation cascades	补体系统	5	2.38	- 2.58
ko04270:vascular smooth muscle contraction	血管平滑肌收缩	6	2.86	- 2.48
ko00500:starch and sucrose metabolism	淀粉和蔗糖代谢	3	1.43	- 2.21
mo05012:Parkinson's disease	帕金森病(多巴胺能突触)	6	2.86	- 2.11
ko00051:fructose and mannose metabolism	果糖和甘露糖的代谢	3	1.43	- 2.04
ko04360:axon guidance	轴突导向	6	2.86	- 1.77
ko00564:glycerophospholipid metabolism	甘油磷脂代谢	4	1.9	- 1.59
ko05146:Amoebiasis	阿米巴病	4	1.9	- 1.59
ko04810:regulation of actin cytoskeleton	肌动蛋白细胞骨架的调节	6	2.86	- 1.39

表3 10个关键蛋白

蛋白 IDs	蛋白质中文名	基因名	蛋白质的作用	独立肽段	差异倍数 (FC值)	P 值
P05370	6-磷酸葡萄糖脱氢酶	G6pd	催化戊糖磷酸途径,参与糖酵解的另一种途径	21	1.24	0.006
P04642	L-乳酸脱氢酶 A 链	Ldha	参与丙酮酸发酵成乳酸	11	1.30	0.02
M0R5J4	2-磷酸-D-甘油酸水解酶	Eno1	参与糖酵解过程	16	1.4	0.004
P02770	白蛋白	Alb	结合水, Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	37	0.69	0.02
P07825	突触素	Syp	将囊泡定位于质膜,参与调节短期和长期突触可塑性	7	0.44	0.0005
P11980	丙酮酸激酶	Pkm	参与糖酵解过程;催化生成 ATP;调节转录和翻译	3	1.38	0.006
F1LST4	微管相关蛋白	Mapt	参与细胞骨架的形成	9	0.65	0.009
P05065	果糖二磷酸醛缩酶 A	Aldoa	在糖酵解和糖异生中起关键作用	21	1.39	0.049
R9PXU6	肌动蛋白结合蛋白	Vcl	参与肌动蛋白丝结合	75	1.50	0.03
P09811	糖原磷酸化酶	Pygl	糖代谢中重要的变构酶	19	1.26	0.02

图7 244个DEPs的PPI图

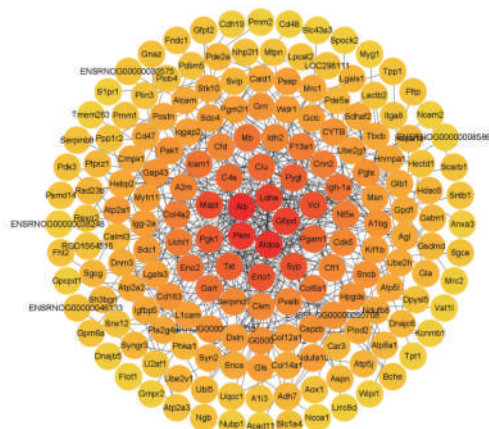
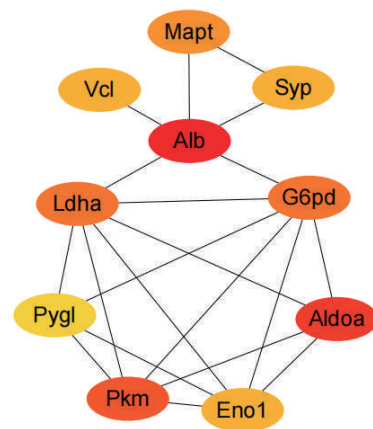


图8 244个DEPs中前10位关键蛋白图



Pygl^[16]6个上调基因参与了细胞的糖酵解过程。研究表明,脊髓损伤后机体代谢发生了重大变化^[17],肌肉中与糖酵解有关的基因表达增加^[18],基因表达水平改变也暗示在骶上脊髓损伤后膀胱逼尿肌的代谢

方式发生改变,这可能与逼尿肌通过糖酵解来满足无抑制性收缩时需要的能量有关^[19]。近期研究发现,Pkm2可促进平滑肌细胞表型转换和内膜增生,这可能是膀胱壁增厚的原因之一^[20]。因此,逼尿肌

产生无抑制性收缩可能与糖酵解相关蛋白质的表达增加有关。

KEGG 结果还发现细胞外基质(extracellular matrix, ECM)-受体相互作用、轴突导向以及肌动蛋白细胞骨架调节等途径在逼尿肌中显著富集,模型组中微管相关蛋白(microtubule-associated protein, Mapt)表达发生改变。研究表明,神经源性膀胱中 ECM 成分的改变可能影响 ECM 与细胞内的信号传递,从而调节肌动蛋白细胞骨架系统^[21-22]。此外,微管也是细胞骨架的组成部分之一,其中 Mapt 是微管的重要组成部分,微管系统的聚合与解聚通过调节细胞骨架系统起到外耦合作用,使平滑肌细胞膜上钙通道活性发生改变,进而调节平滑肌收缩^[23]。研究表明,在心脏中微管系统可以通过与肌动蛋白之间的交联,从而改变心肌收缩力^[24]。细胞骨架调节可以激活一系列下游信号通路,最终影响肌动蛋白聚合^[25](图9),而平滑肌收缩是由于肌节中肌动蛋白相对于肌球蛋白产生滑动引起的,此外,其收缩强弱也与细胞质中 Ca^{2+} 浓度、逼尿肌细胞上突触的形成以及囊泡释放神经递质有关。研究表明,突触中肌动蛋白骨架的改变与突触末端的可塑性调节、囊泡运输和神经递质的释放有关^[26]。因此,骶上脊髓损伤后膀胱逼尿肌中 ECM 和细胞骨架的改变可能是逼尿肌无抑制性收缩的原因之一。

本次分析还富集到了一条多巴胺能突触通路。研究显示,在脊髓中含有大量可以产生多巴胺(dopamine, DA)的酪氨酸羟化酶(TH)+神经元,在胸段

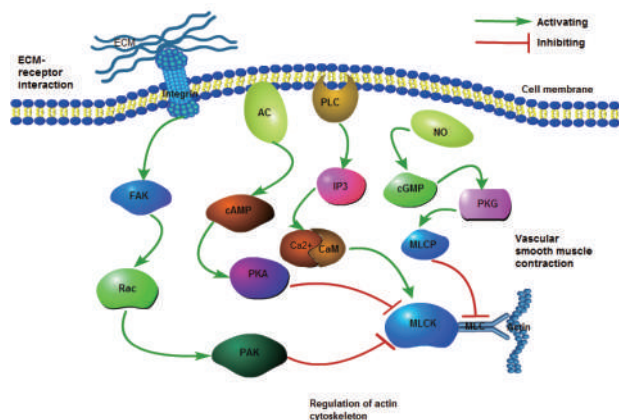
脊髓横断后,腰髓和骶髓中 DA 的合成增加,从而调节脊髓损伤后膀胱的排尿反射^[27]。DEPs 中突触核蛋白(synuclein Alpha, SNCA)参与了该条信号通路。研究表明,SNCA 参与了突触小泡运输和神经递质的释放^[28]。此外,存在于轴突末梢突触囊泡中的突触素(synaptophysin, Syp)与突触的可塑性和突触囊泡释放神经递质有关^[29]。最新的一项研究显示,多巴胺可更好地协调逼尿肌-括约肌,改善脊髓损伤大鼠的排尿功能^[30],这与本次分析结果相符。因此,多巴胺能信号通路可成为今后治疗骶上脊髓损伤后逼尿肌无抑制性收缩的潜在靶点之一。

从本次对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱逼尿肌的生物信息分析中发现,膀胱出现无抑制性收缩可能与逼尿肌中糖代谢水平改变、细胞外基质和细胞骨架改变以及多巴胺能突触信号通路激活有关。这些可能是骶上脊髓损伤后缓解逼尿肌无抑制性收缩,提高膀胱排尿效率的潜在治疗靶点。本项目从模型角度探讨了骶上脊髓损伤后逼尿肌无抑制性收缩的可能病理机制,能否通过干预这些途径对骶上脊髓损伤后神经源性膀胱起到治疗作用,还有待进一步验证。

参考文献

- [1] Hamid R, Averbeck MA, Chiang H, et al. Epidemiology and pathophysiology of neurogenic bladder after spinal cord injury[J]. World J Urol, 2018, 36(10):1517—1527.
- [2] 刘昊,秦川,张晓润,等.逼尿肌-尿道外括约肌协同失调诊断和治疗的研究进展[J].江苏医药, 2019, 45(9):944—947.
- [3] Lee JY, Kim BJ, Sim G, et al. Spinal cord injury markedly altered protein expression patterns in the affected rat urinary bladder during healing stages[J]. J Korean Med Sci, 2011, 26(6):814—823.
- [4] Chen C, Hou J, Tanner JJ, et al. Bioinformatics methods for mass spectrometry-based proteomics data analysis[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8):2873.
- [5] Hu HZ, Granger N, Jeffery ND. Pathophysiology clinical importance and management of neurogenic lower urinary tract dysfunction caused by suprasacral spinal cord injury[J]. J Vet Intern Med, 2016, 30(5):1575—1588.
- [6] Shaker H, Mourad MS, Elbialy MH, et al. Urinary bladder hyperreflexia: a rat animal model[J]. Neurourol Urodyn, 2003, 22(7):693—698.
- [7] Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score

图9 细胞外基质受体相互作用、肌动蛋白细胞骨架调节和血管平滑肌收缩3条KEGG通路的作用关系



- [J]. *J Neurotrauma*,2002,19(10):1251—1260.
- [8] 张雨辰,张泓,艾坤,等.大鼠脊髓损伤后神经源性膀胱模型的制备[J].*中国康复医学杂志*,2014,29(6):542—546.
- [9] Andersson KE, Soler R, Füllhase C. Rodent models for urodynamic investigation[J]. *Neurol Urodyn*, 2011, 30(5): 636—646.
- [10] Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*,2019,10(1):1523.
- [11] Otasek D, Morris JH, Bouças J, et al. Cytoscape automation: empowering workflow-based network analysis[J]. *Genome Biol*,2019,20(1):185.
- [12] Chin CH, Chen SH, Wu HH, et al. CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome [J]. *BMC Syst Biol*,2014,8 Suppl 4(Suppl 4):S11.
- [13] Seri S, D'Alessandro A, Seri M. Variations of the enzymatic activity of the rat's gum glycolytic cycle following administration of sweeteners[J]. *Boll Soc Ital Biol Sper*, 1995,71(9—10):249—256.
- [14] Bai X, Jiang H, Han G, et al. Chidamide suppresses the glycolysis of triple negative breast cancer cells partially by targeting the miR-33a-5p-LDHA axis[J]. *Mol Med Rep*, 2019,20(2):1857—1865.
- [15] Son SW, Chau GC, Kim ST, et al. Vacuolar H⁺-ATPase subunit V0C regulates aerobic glycolysis of esophageal cancer cells via PKM2 signaling[J]. *Cells*,2019,8(10):1137.
- [16] Bo WJ, Smith MS. A histochemical and biochemical study of phosphorylase and glycogen synthetase in smooth muscle [J]. *Anat Rec*,1965,153(3):295—301.
- [17] Gorgey AS, Dolbow DR, Dolbow JD, et al. Effects of spinal cord injury on body composition and metabolic profile-part I[J]. *J Spinal Cord Med*,2014,37(6):693—702.
- [18] Long YC, Kostovski E, Boon H, et al. Differential expression of metabolic genes essential for glucose and lipid metabolism in skeletal muscle from spinal cord injured subjects[J]. *J Appl Physiol*(1985),2011,110(5):1204—1210.
- [19] Boberg L, Szekeres FLM, Arner A. Signaling and metabolic properties of fast and slow smooth muscle types from mice[J]. *Pflugers Arch*,2018,470(4):681—691.
- [20] Jain M, Dhanesha N, Doddapattar P, et al. Smooth muscle cell-specific PKM2 (pyruvate kinase muscle 2) promotes smooth muscle cell phenotypic switching and neointimal hyperplasia[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2021, 41(5):1724—1737.
- [21] 张永革,何晓伟,张伟,等.逼尿肌反射亢进大鼠膀胱ICC细胞兴奋性变化及意义[J].*临床泌尿外科杂志*,2015,30(2):168—171.
- [22] Romero S, Le Clainche C, Gautreau AM. Actin polymerization downstream of integrins: signaling pathways and mechanotransduction[J]. *Biochem J*,2020,477(1):1—21.
- [23] Pritchard HAT, Gonzales AL, Pires PW, et al. Microtubule structures underlying the sarcoplasmic reticulum support peripheral coupling sites to regulate smooth muscle contractility[J]. *Sci Signal*,2017,10(497):eaan2694.
- [24] Caporizzo MA, Chen CY, Prosser BL. Cardiac microtubules in health and heart disease[J]. *Exp Biol Med* (Maywood),2019,244(15):1255—1272.
- [25] Sweeney HL, Hammers DW. Muscle Contraction[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(2):a023200.
- [26] Jung M, Kim D, Mun JY. Direct visualization of actin filaments and actin-binding proteins in neuronal cells[J]. *Front Cell Dev Biol*,2020(8):588556.
- [27] Hou S, Carson DM, Wu D, et al. Dopamine is produced in the rat spinal cord and regulates micturition reflex after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*,2016,285(Pt B):136—146.
- [28] Huang M, Wang B, Li X, et al. α -synuclein: a multifunctional player in exocytosis, endocytosis, and vesicle recycling[J]. *Front Neurosci*,2019(13):28.
- [29] Huang X, Wang X, Yang M, et al. Spontaneous neuronal plasticity in the contralateral motor cortex and corticospinal tract after focal cortical infarction in hypertensive rats[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*,2020,29(12):105235.
- [30] Hou S, DeFinis JH, Daugherty SL, et al. Deciphering spinal endogenous dopaminergic mechanisms that modulate micturition reflexes in rats with spinal cord injury[J]. *eNeuro*,2021,8(4):ENEURO.0157—21.2021.