

· 基础研究 ·

自噬相关基因及蛋白在急性脊髓损伤后大鼠膀胱表达的实验研究

张力 崔宝娟 曾凡硕 黄来刚 张琪 孙敏 刘本玲 李强 王道清 孙强三

【摘要】 目的 观察自噬相关基因、蛋白在急性期脊髓损伤大鼠膀胱平滑肌组织中的表达。**方法** 选取 24 只雄性 Wistar 大鼠并随机分为模型组 (12 只) 及对照组 (12 只)。模型组采用改良 Allen's 法建立脊髓损伤模型, 对照组仅予以椎板切除处理。于术后 6 h 对 2 组大鼠进行 BBB 运动评分, 采用尼氏染色观察 2 组大鼠脊髓形态学变化, 采用 Western blotting 和免疫荧光染色法检测膀胱平滑肌细胞微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 及 P62 表达, 采用 RT-PCR 检测膀胱平滑肌自噬相关基因 LC3、P62、Beclin1 mRNA 表达。**结果** 模型组大鼠下肢运动功能 BBB 评分较对照组明显降低 ($P<0.05$)。尼氏染色观察可见模型组神经元及尼氏小体数量减少; Western blotting 染色提示模型组 LC3-II 表达较对照组增高 ($P<0.05$), P62 表达较对照组降低 ($P<0.05$)。免疫荧光染色法提示模型组膀胱平滑肌 LC3 阳性细胞率较对照组增高 ($P<0.05$), P62 阳性细胞率较对照组降低 ($P<0.05$)。RT-PCR 检测发现模型组 LC3 及 Beclin1 mRNA 水平较对照组升高 ($P<0.05$), P62 mRNA 水平较对照组降低 ($P<0.05$)。**结论** 自噬在急性脊髓损伤大鼠膀胱平滑肌中表达活跃, 可能与脊髓损伤后神经源性膀胱发病机制有关。

【关键词】 自噬; 急性期脊髓损伤; 膀胱; 微管相关蛋白 1 轻链 3

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2014HL080), 山东省自然科学基金 (ZR2014HP031), 山东省医药卫生科技发展计划 (2015WS0310)

Bladder autophagy after spinal cord injury Zhang Li*, Cui Baojuan, Zeng Fanshuo, Huang Laigang, Zhang Qi, Sun Min, Liu Benling, Li Qiang, Wang Daoqing, Sun Qiangsan. *Department of Rehabilitation Medicine, The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

Corresponding author: Sun Qiangsan, Email: sunqsan@126.com

【Abstract】 Objective To observe the expression of autophagy-related genes and proteins in the smooth bladder muscle of rats after spinal cord injury (SPI). **Methods** Twenty-four male Wistar rats were randomly and evenly divided into a model group and a control group. The model group had SPI induced using the modified Allen's method, while the control group was only given laminectomy. Six hours after the operation, the Basso Beattie Bresnahan (BBB) locomotor rating scale was used to evaluate the rats' hindlimb locomotor function. Nissl staining was used to observe the morphological changes in their spinal cords, while Western blotting and immunofluorescence staining were employed to assess the expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and protein 62 (P62). The expression of autophagy gene Beclin1 mRNA was determined using a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The average BBB score in the model group was significantly lower than in the control group. After Nissl's staining, a decreased number of neurons and Nissl bodies was observed. Western blotting showed that the expression of LC3-II had increased significantly and that of P62 had decreased significantly in the model group compared with the control group. The immunofluorescence staining showed LC3 and P62 dots in the bladders' smooth muscle cells. RT-PCR detected significantly higher LC3 and Beclin1 mRNA levels in the model group than in the control group; in contrast the average P62 mRNA level was significantly lower. **Conclusions** Autophagy was activated in rats' bladder muscles after SPI. That may be related to the pathogenesis of a neurogenic bladder after spinal cord injury.

【Key words】 Autophagy; Spinal cord injury; Bladder; Microtubule-associated protein 1 light chain 3

Fund program: Natural Science Foundation of Shandong Province (grants ZR2014HL080 and ZR2014HP031),

Shandong Province Medicine and Health Science Development Program (grant 2015WS0310)

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重中枢神经系统损伤疾病,能引起运动、感觉等各种功能障碍,神经源性膀胱是脊髓损伤并发症之一,可导致膀胱排尿障碍,严重影响患者生活质量,并且临床缺乏有效治疗手段^[1-2]。已有研究证实脊髓损伤可激活自噬,参与神经损伤修复^[3],亦可促进实验小鼠下肢运动功能改善^[4]。自噬是一种选择性降解胞质蛋白、蛋白聚集物及细胞器^[5-6]的胞内代谢机制,其首先形成自噬小体,即由双层膜将需要降解的胞质成分围成自噬小泡,经过成核和延伸形成自噬体,再通过细胞微管系统运送至溶酶体并与其融合形成自噬溶酶体,从而降解胞质成分^[7]。其中位于膜上的微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) 是检测自噬的金指标^[8],其包含两种形式:可溶形式 LC3-I 和脂溶形式 LC3-II, LC3-II 由 LC3-I 转化形成,当自噬激活时,LC3-II 相应增加。P62 是 LC3 与泛素蛋白的连接蛋白,在自噬溶酶体中降解,可作为观察自噬降解的重要指标^[8-9]。Beclin1 与第三类磷酸肌醇 3 激酶(VPS34)等形成核心复合物,是自噬小泡的重要组成部分,标志着自噬的开始^[8,10-11]。以往研究多聚焦于脊髓损伤后支配膀胱的受损神经^[12-13],而对于膀胱平滑肌的病理生理机制研究较少。基于此,本实验对急性期脊髓损伤后膀胱平滑肌自噬表达情况进行探讨。

材料与方法

一、实验动物及分组

选取清洁级 Wistar 大鼠 24 只(均购于山东大学医学院实验动物中心),体重(270±20)g,2~3 月龄,雄性,实验前经适应性饲养 1 周,室温(22±2)℃,食物及水供给充足。采用随机数字表法将上述大鼠分为模型组及对照组,每组 12 只。

二、主要实验试剂及仪器

主要实验试剂包括兔抗 LC3 抗体(Cell Signal Technology)、兔多抗 P62 抗体(Abcam)、逆转录试剂盒、扩增试剂盒(TAKARA),LC3、Beclin1 及 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由 TAKARA 设计并合成;主要实验仪器包括打击器、实时荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf)等。

三、脊髓损伤模型制备

采用 10%水合氯醛按每千克体重 3 ml 腹腔注射麻醉模型组大鼠,根据第 13 浮肋确定 T₁₁ 棘突,以此为中行手术正中切口,依次分离皮肤、肌肉,暴露 T₁₀₋₁₂

棘突,咬断棘突及椎板,暴露脊髓。根据改良 Allen's 法^[14-15]采用自制打击器将玻璃导管固定于脊髓打击部位正上方,5 g 砝码沿玻璃导管于 20 cm 处自由落体击打脊髓,坠落后立即将砝码撤去,脊髓打击部位逐渐变青紫,随后依次按顺序缝合伤口。脊髓损伤制模成功标准如下:大鼠苏醒后其双下肢拖地行走,尾部无法活动,下腹部可触及膀胱,出现尿潴留^[16]。对照组大鼠只给予椎板切除术处理。2 组大鼠手术过程中均给予 1 ml 生理盐水补充丢失的血容量,术后常规饮食,按摩膀胱协助排尿 2 次/天。

四、下肢运动功能评分

采用 BBB (Basso-Beattie-Bresnahan) 运动能量表^[17]评估术后大鼠下肢功能,将术后大鼠置于宽阔场地中,由 2 位熟悉 BBB 评分细则但并未参与实验的工作人员观察大鼠运动情况,至少持续观察 4 min,总分为 21 分,0 分表示无运动功能,21 分表示运动功能正常,取其平均值纳入分析。

五、尼氏染色及免疫荧光染色

于术后 6 h 模型组和对照组各随机取 6 只大鼠以过量麻醉法处死,取出损伤部位脊髓及膀胱组织,置于 4%多聚甲醛溶液中浸泡 24 h 以上,经脱水、石蜡包埋后切成 4 μm 石蜡切片。尼氏染色:脊髓石蜡切片经尼氏染色液染色后,脱水透明封片。免疫荧光染色:膀胱石蜡切片经 3%过氧化氢处理 10 min,微波抗原修复,5%山羊血清封闭,一抗兔抗 LC3 (1:100),P62 (1:100)4℃过夜孵育,复温 1 h,避光条件下荧光二抗孵育 50 min,DIPI 复染,经倒置荧光显微镜采集图像,采用 Image ProPlus 软件分析图像。

六、Western blotting 检测

于术后 6 h 实验组及模型组各随机取 6 只大鼠处死,迅速将膀胱组织取出,取适量膀胱组织用于提取组织总蛋白,余存于-80℃环境中以备后续实验。采用 BCA 法测量蛋白浓度,样品使用 5%~12% SDS-PAGE 凝胶电泳,经转膜、封闭后加入相应一抗,兔抗 LC3 (1:500, Cell Signal Technology),兔抗 P62 (1:500, Abcam),4℃过夜孵育,二抗山羊抗兔辣根过氧化物酶抗体(1:5000, 中杉金桥),山羊抗小鼠辣根过氧化物酶抗体(1:5000, 中杉金桥)室温摇床孵育 1 h,采用化学发光法显影。选用 Image J 软件进行 LC3 及 P62 灰度分析。

七、RT-PCR 检测

取各组大鼠适量膀胱组织置于 Trizol 裂解液中,并用匀浆器匀浆,提取总 RNA,通过逆转录试剂盒并按照说明书将 RNA 逆转录成 cDNA,扩增条件按照扩

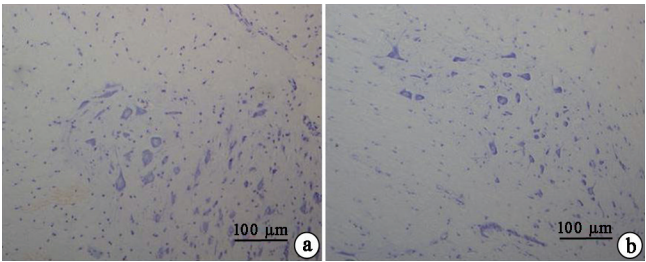
增试剂盒说明书设置。大鼠引物序列如下: GAPDH 上游为 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', 下游为 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'; LC3 上游为 5'-CGAGAGCGAGAGAGATGAAGACGG-3', 下游为 5'-GGTAACGTCCCTTTTTCCTTGCTGTA-3'; P62 上游为 AGAATGTGGGGAGAGCGTGGC, 下游为 GGGTGT-CAGGCGGCTTCTCTT; Beclin1 上游为 5'-GAAACTG-GACACGAGCTTCAAGA-3', 下游为 5'-ACCATCCTG-GCGAGTTTCAATA-3'。

八、统计学分析
本研​​究所得计量数据均以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 版统计学软件包进行数据分析处理,计量数据比较采用 t 检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、2 组大鼠脊髓损伤运动功能评分比较
与对照组大鼠四肢运动自如比较,模型组大鼠双侧下肢基本无运动功能或膝关节、髋关节有轻微活动,其 BBB 运动功能评分[(0.500±0.837)分]较低,与对照组 BBB 评分[(0.500±0.837)分]组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

二、2 组大鼠脊髓形态学观察对比
尼氏小体是神经元体内嗜碱型颗粒,当神经元功能正常时,其结构较固定,当神经元受损时,尼氏小体会减少甚至溶解,因此通过尼氏染色可观察神经元和尼氏小体状态。本研究通过镜下观察发现对照组脊髓灰质前角神经元细胞尼氏小体结构完整,细胞呈多角形;模型组可见神经元数量减少,胞体肿胀呈圆形,尼氏小体数量减少。详见图 1。



注:a 为对照组,b 为模型组

图 1 模型组及对照组脊髓损伤部位尼氏染色(×200)

三、2 组大鼠 LC3、P62 蛋白表达比较
通过免疫荧光法检测可观察到 LC3 蛋白呈绿色荧光斑点,分布在细胞核周围,P62 蛋白主要分布在细胞核周围。本研究模型组 LC3 蛋白阳性细胞率较对照组明显增高,组间差异具有统计学意义($P<0.05$);而模型组 P62 蛋白阳性细胞率较对照组明显降低,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。详见图 2、表 1。

表 1 模型组及对照组 LC3、P62 阳性细胞率比较(% , $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	LC3	P62
模型组	6	78.4±2.8 ^a	11.8±0.3 ^a
对照组	6	47.0±1.8	41.1±6.1

注:与对照组相同指标比较,^a $P<0.05$

四、2 组大鼠膀胱平滑肌 LC3、P62 蛋白表达量比较

Western blotting 检测显示模型组脊髓损伤(急性期)大鼠膀胱组织 LC3-Ⅱ表达量较对照组明显增高,组间差异具有统计学意义($P<0.05$),模型组 P62 表达水平较对照组明显降低,组间差异具有统计学意义($P<0.05$)。详见图 3 及表 2。

表 2 模型组及对照组大鼠膀胱平滑肌 LC3、P62 蛋白表达灰度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	LC3 Ⅱ/actin	P62/actin
模型组	6	1.353±0.423 ^a	0.298±0.269 ^a
对照组	6	0.563±0.526	0.648±0.076

注:与对照组相同指标比较,^a $P<0.05$

五、2 组大鼠膀胱平滑肌 LC3、P62、Beclin1 mRNA 水平比较

通过实时荧光定量 RT-PCR 检测发现,与对照组比较,模型组大鼠膀胱平滑肌 LC3、Beclin1 mRNA 相对含量明显升高,P62 mRNA 相对含量明显降低,组间差异均具有统计学意义($P<0.05$)。详见表 3。

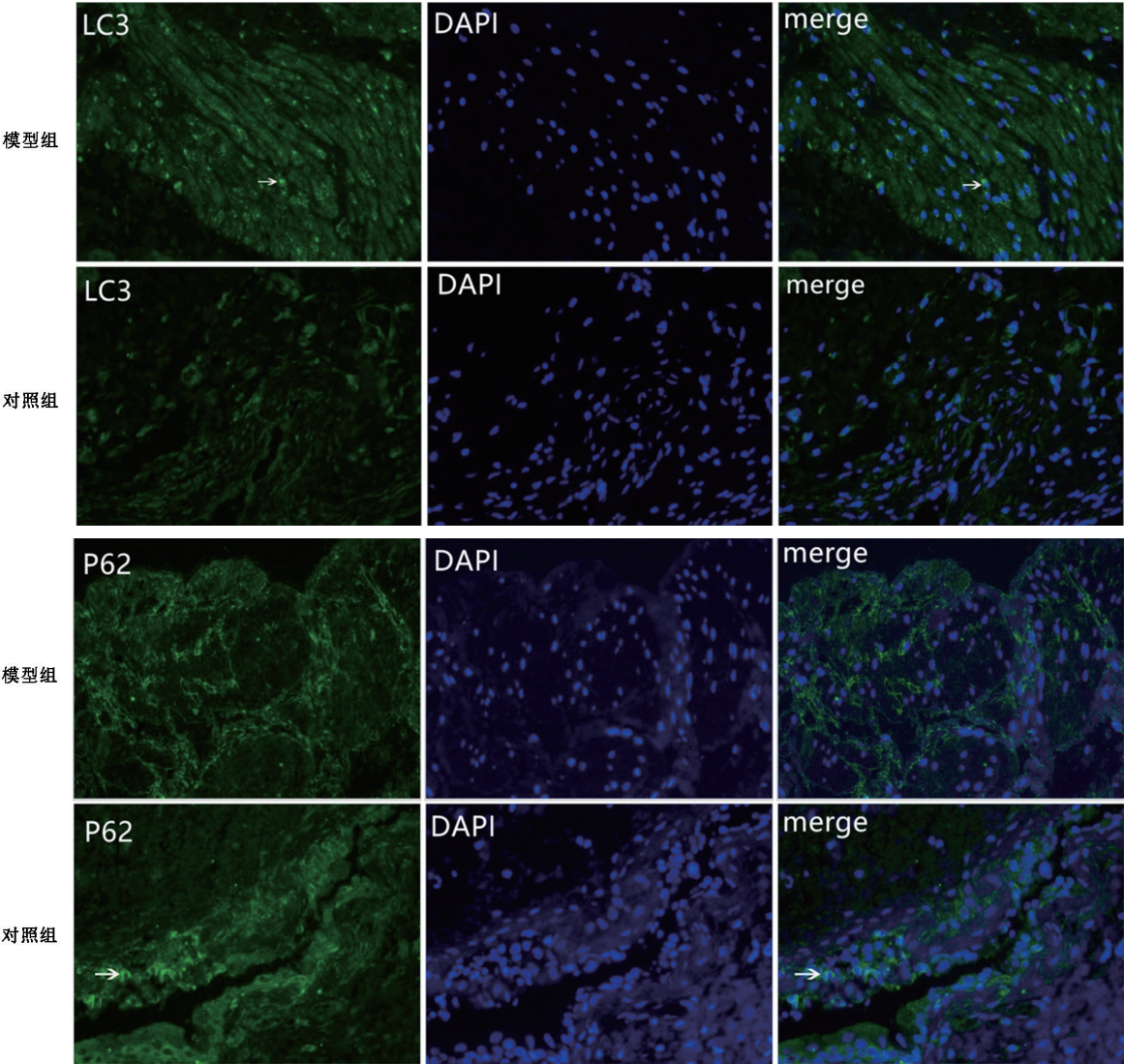
表 3 模型组及对照组大鼠膀胱平滑肌 LC3、P62、Beclin1 mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	LC3	P62	Beclin1
模型组	6	5.933±0.610 ^a	0.586±0.210 ^a	1.418±0.242 ^a
对照组	6	1.010±0.172	1.000±0.069	1.000±0.424

注:与对照组相同指标比较,^a $P<0.05$

讨 论

脊髓损伤按病程可分为急性期和亚急性期/慢性期,急性期是指创伤后前 7 天左右,该阶段主要发生细胞凋亡、炎症、轴突变性等病理生理变化;亚急性期/慢性期主要有神经退行性变及胶质瘢痕形成等^[22]。脊髓损伤急性期机体膀胱排尿功能会暂时性丧失(即进入尿潴留期),膀胱排尿障碍主要是由其逼尿肌与尿道外括约肌活动失协调引起^[12]。已有实验研究采用 TRPV 通道(transient receptor potential vanilloid channel)阻滞剂对大鼠进行脊髓鞘内注射^[18]以治疗神经源性膀胱;另外肉毒素^[19-21]、抗胆碱能药物已应用于临床治疗,但效果尚需进一步证实。自噬作为一种胞内代谢机制,可能也在急性脊髓损伤后神经源性膀胱发病中起作用,如有研究已证实由 mTOR 信号通路



注:DAPI 为细胞核,LC3、P62 为绿色荧光(白色箭头所示),merge 为前两者融合后图片
图 2 模型组及对照组大鼠膀胱组织免疫荧光染色观察(×400)

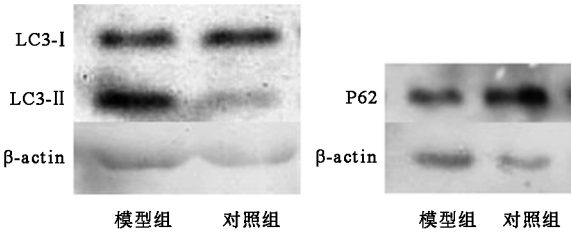


图 3 模型组及对照组大鼠膀胱平滑肌 LC3、P62 蛋白表达比较

调控的自噬在大鼠急性脊髓损伤发病中起重要作用^[22]。急性期脊髓损伤可激活机体自噬,本实验应用改良 Allen's 法制作大鼠急性脊髓损伤模型,并于脊髓损伤急性期(即术后 6 h)处死大鼠^[23],通过尼氏染色法观察脊髓压迫部位横断面,发现坏死神经元增多;BBB 评分提示模型组大鼠下肢运动功能较对照组明显降低,证明造模成功。通过 Western blotting 和免疫

荧光检测 LC3、P62 表达,RT-PCR 检测 LC3、P62、Beclin1 mRNA 水平,均证实模型组自噬现象较对照组活跃,很可能与神经源性膀胱发病有关。

目前自噬分为 3 类,包括巨自噬(亦称为自噬)、微自噬和分子伴侣介导的自噬。在营养充足时,自噬可清除失效或受损细胞器或蛋白;在营养缺乏时,自噬能将老化蛋白质降解成氨基酸等成分以维持细胞生存^[25]。自噬发生时 ProLC3 首先通过 Atg4 去除其 C 末端形成 LC3-I,LC3-I 共价结合磷脂酰乙醇胺形成 LC3-II,在吞噬小泡上 LC3-II 特异性结合形成 Atg12-Atg5-Atg16 复合物,随后形成自噬小体或自噬溶酶体^[8,26-27]。本实验通过制作急性脊髓损伤大鼠模型,其膀胱处于急性缺血、缺氧等应激环境下,自噬激活,通过 Western blotting 检查显示其 LC3-II 表达量较对照组升高,提示自噬在模型组中较活跃,与以往研究结

果一致。P62 作为自噬降解的一个重要参考指标,在哺乳动物和果蝇中,自噬抑制程度与 P62 表达水平升高有关,提示 P62 蛋白水平能反映自噬状况,同样 P62 表达水平降低也与自噬激活有关^[8,28]。本实验发现术后 6 h 时模型组 P62 表达量较对照组减少,与上述研究结果基本一致。Beclin1 是自噬的必要起始部分,与抗凋亡蛋白 Bcl-2 作用,在脊髓损伤时能抑制神经元凋亡,是自噬激活开始的重要参考指标^[10,24]。本研究应用 RT-PCR 检测自噬相关因子 mRNA 水平,发现模型组大鼠 LC3、Beclin1 mRNA 相对水平较对照组升高,P62 mRNA 相对水平较对照组降低,进一步验证了自噬在急性脊髓损伤后膀胱平滑肌中表现活跃。

有研究指出糖基化终末产物可通过 ERK 和 AKT 信号通路诱导血管平滑肌自噬激活^[29-30];氯喹作为自噬抑制剂能通过抑制自噬从而减缓大鼠肺动脉高压模型肺动脉高压进展^[31];在人类正常气道平滑肌细胞中,经异戊二烯基转移酶抑制剂处理,能激活自噬,同时检测到 LC3-II 表达量升高^[32];在正常大鼠膀胱平滑肌细胞中,通过电镜亦发现自噬小体^[33]。上述研究均证明平滑肌细胞中存在自噬,自噬小体一般在细胞胞质中形成,本实验应用免疫荧光法检测 LC3、P62 呈绿色荧光斑点主要分布于细胞核周围,与以往研究结果一致。

脊髓损伤急性阶段膀胱多处于尿潴留期,其平滑肌细胞受到过度机械牵拉^[34],可能处于缺血、缺氧状态,能量供应缺乏。而缺氧能诱导 HIF-1 介导的 HIF-1/Bnip3 或者 PINK-1/Parkin 信号通路激活^[35],同时 mTORC1 作为营养传感器,能激活 mTOR 信号通路^[36],调控自噬水平升高。自噬作为胞内代谢机制之一,能促进一些细胞器(如功能障碍的线粒体)胞内蛋白质降解并提供能量^[35-36];同时持续的机械牵拉会诱导 PI3K/AKT 等信号通路激活、生长因子(如碱性成纤维细胞生长因子等)增多,这些信号通路与生长因子可致平滑肌细胞增殖、肥大^[34,37]。对于过度机械牵拉,空腔器官(如心肌细胞)和膀胱平滑肌细胞发生肥大的分子机制类似,因为心肌细胞肥大所涉及的信号通路与平滑肌类似^[37],在心肌细胞中这些信号通路均广泛参与调控自噬^[38]。有研究证实通过敲除某些自噬基因,可加速心肌细胞收缩功能失调,促进心肌细胞肥大^[39],故推测自噬在膀胱平滑肌细胞中极有可能起相似作用。

综上所述,本研究结果表明,脊髓损伤急性期膀胱可能由于过度机械牵拉而缺血、缺氧,导致平滑肌自噬水平活跃。

参 考 文 献

[1] Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic

- spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate [J]. *Spinal Cord*, 2014, 52(2): 110-116. DOI: 10.1038/sc.2012.158.
- [2] Sezer N, Akkuş S, Uğurlu FG. Chronic complications of spinal cord injury [J]. *World J Orthop*, 2015, 6(1): 24-33. DOI: 10.5312/wjo.v6.i1.24.
- [3] Ribas VT, Schnepf B, Challagundla M, et al. Early and sustained activation of autophagy in degenerating axons after spinal cord injury [J]. *Brain Pathol*, 2015, 25(2): 157-170. DOI: 10.1111/bpa.12170.
- [4] Sekiguchi A, Kanno H, Ozawa H, et al. Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(5): 946-956. DOI: 10.1089/neu.2011.1919.
- [5] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. *Nat Cell Mol Biol*, 2010, 12(9): 814-822. DOI: 10.1038/ncb0910-814.
- [6] Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Autophagy in disease [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 648: 79-92. DOI: 10.1007/978-1-60761-756-3-5.
- [7] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075. DOI: 10.1038/nature06639.
- [8] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222. DOI: 10.1080/15548627.2015.110.0356.
- [9] Zhou Y, Zhang H, Zheng B, et al. Retinoic acid induced-autophagic flux inhibits ER-Stress dependent apoptosis and prevents disruption of blood-spinal cord barrier after spinal cord injury [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(1): 87-99. DOI: 10.7150/ijbs.13229.
- [10] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571-580. DOI: 10.1038/cdd.2010.191.
- [11] 陈科, 程汉华, 周荣家. 自噬与泛素化蛋白降解途径的分子机制及其功能 [J]. *遗传*, 2012, 34(1): 5-18. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00005.
- [12] Pikov V, Wrathall JR. Coordination of the bladder detrusor and the external urethral sphincter in a rat model of spinal cord injury: effect of injury severity [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(2): 559-569.
- [13] De Groat WC, Yoshimura N. Mechanisms underlying the recovery of lower urinary tract function following spinal cord injury [J]. *Prog Brain Res*, 2006, 152: 59-84. DOI: 10.1016/S0079-6123(05)5-2005-3.
- [14] Hyun JK, Lee YI, Son YJ, et al. Serial changes in bladder, locomotion, and levels of neurotrophic factors in rats with spinal cord contusion [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(10): 1773-1782. DOI: 10.1089/neu.2007.0485.
- [15] Kuricova M, Ledecy V, Liptak T, et al. Oral administration of inosine promotes recovery after experimental spinal cord injury in rat [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(11): 1785-1791. DOI: 10.1007/s10072-014-1840-3.
- [16] 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. DOI: 10.13969/j.issn.1001-1242.201406.009.
- [17] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-20. DOI: 10.1089/neu.1995.12.1.
- [18] Merrill L, Vizzard MA. Intravesical TRPV4 blockade reduces repeated variate stress-induced bladder dysfunction by increasing bladder ca-

- capacity and decreasing voiding frequency in male rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2014, 307(4): R471-480. DOI: 10.1152/ajpregu.00008.2014.
- [19] Chen SL, Bih LI, Chen GD, et al. Comparing a transrectal ultrasound-guided with a cystoscopy-guided botulinum toxin a injection in treating detrusor external sphincter dyssynergia in spinal cord injury[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011, 90(9): 723-730. DOI: 10.1097/PHM.0b013e31821a72a3.
- [20] Chen SF, Chang CH, Kuo HC. Clinical efficacy and changes of urothelial dysfunction after repeated detrusor botulinum toxin A injections in chronic spinal cord-injured bladder[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(6): 164-167. DOI: 10.3390/toxins8060164.
- [21] Chen SF, Chang CH, Kuo HC. Effect of detrusor botulinum toxin a injection on urothelial dysfunction in patients with chronic spinal cord injury: a clinical and immunohistochemistry study before and after treatment[J]. *Spinal Cord*, 2016, 1-6. DOI: 10.1038/sc.2015.241.
- [22] Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, et al. The role of mTOR signaling pathway in spinal cord injury[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(17): 3175-3179. DOI: 10.4161/cc.21262.
- [23] Hou H, Zhang L, Zhang L, et al. Acute spinal cord injury in rats induces autophagy activation[J]. *Turk Neurosurg*, 2014, 24(3): 369-373. DOI: 10.5137/1019-5149.
- [24] Wang ZY, Lin JH, Muharram A, et al. Beclin-1-mediated autophagy protects spinal cord neurons against mechanical injury-induced apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2014, 19(6): 933-945. DOI: 10.1007/s10495-014-0976-1.
- [25] Smith CM, Chen Y, Sullivan ML, et al. Autophagy in acute brain injury: Feast, famine, or folly? [J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 43(1): 52-59. DOI: 10.1016/j.nbd.2010.09.014.
- [26] Liu S, Sarkar C, Dinizo M, et al. Disrupted autophagy after spinal cord injury is associated with ER stress and neuronal cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6:e1582. DOI: 10.1038/cddis.2014.527.
- [27] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
- [28] Bartlett BJ, Isakson P, Lewerenz J, et al. p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects[J]. *Autophagy*, 2011, 7(6): 572-583. DOI: 10.4161/auto.7.6.14943.
- [29] Tai S, Hu XQ, Peng DQ, et al. The roles of autophagy in vascular smooth muscle cells[J]. *Int J Cardiol*, 2016, 211: 1-6. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.02.128.
- [30] Hu P, Lai D, Lu P, et al. ERK and Akt signaling pathways are involved in advanced glycation end product-induced autophagy in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 29(4): 613-618. DOI: 10.3892/ijmm.2012.891.
- [31] Long L, Yang X, Southwood M, et al. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation[J]. *Circ Res*, 2013, 112(8): 1159-1170. DOI: 10.1161/CIRCRESA-HA.111.300483.
- [32] Ghavami S, Mutawe MM, Schaafsma D, et al. Geranylgeranyl transferase modulates autophagy and apoptosis in human airway smooth muscle[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(4): 420-428. DOI: 10.1152/ajplung.00312.2011.
- [33] 赵江, 董兴有, 杨兴亮, 等. 人和大鼠膀胱平滑肌细胞存在低水平的自噬[J]. *第三军医大学学报*, 2014, 7(15): 1394-1397. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.13.005.
- [34] Imamura M, Kanematsu A, Yamamoto S, et al. Basic fibroblast growth factor modulates proliferation and collagen expression in urinary bladder smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(4): F1007-F1017. DOI: 10.1152/ajprenal.00107.2007.
- [35] Yoshii SR, Mizushima N. Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(10): 2797-2801. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.01.013.
- [36] Yuan HX, Russell RC, Guan KL. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress induced autophagy[J]. *Autophagy*, 2013, 9(12): 1983-1995. DOI: 10.4161/auto.26058.
- [37] Adam RM, Roth JA, Cheng HL, et al. Signaling through PI3K/Akt mediates stretch and PDGF-BB-dependent DNA synthesis in bladder smooth muscle cells[J]. *J Urol*, 2003, 169(6): 2388-2393. DOI: 10.1097/01.ju.0000063980.99368.35.
- [38] Li Z, Wang J, Yang X. Functions of autophagy in pathological cardiac hypertrophy[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(6): 672-678. DOI: 10.7150/ijbs.11883.eCollection.2015.
- [39] Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 619-624. DOI: 10.1038/nm1574.

(修回日期: 2017-08-23)

(本文编辑: 易 浩)