

DOI: 10.13376/j.cblls/2022164

文章编号: 1004-0374(2022)12-1506-13

骨骼肌质膜修复相关蛋白研究进展

吴柏乐, 吴 迎*

(北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100091)

摘要: 质膜修复 (plasma membrane repair, PMR) 是细胞存活及正常生理活动的重要保障。骨骼肌细胞易受机械刺激引发质膜损伤, 及时有效的质膜修复是维持骨骼肌细胞功能的关键。此外, 骨骼肌质膜修复缺陷也是肌营养不良症的主要病理特点。该文从骨骼肌生理和病理角度出发, 对参与 PMR 的相关蛋白进行全面综述, 系统梳理了 PMR 相关蛋白在骨骼肌损伤修复中的特点及协同效应, 总结并归纳了骨骼肌 PMR 的理论模型, 为膜修复蛋白在 PMR 中作用机制的深入研究提供新思路。

关键词: 骨骼肌; 膜修复蛋白; 运动性骨骼肌损伤; 肌营养不良症

中图分类号: Q241; R329.2 **文献标志码:** A

Research progress of proteins related to skeletal muscle plasma membrane repair

WU Bai-Le, WU Ying*

(College of Sport Science, Beijing Sport University, Beijing 100091, China)

Abstract: Plasma membrane repair (PMR) is an important guarantee for cell survival and normal physiological activities. Skeletal muscle cells are susceptible to plasma membrane damage caused by mechanical stimuli, and timely and effective PMR is essential to maintain skeletal muscle cell function. In addition, defective skeletal muscle PMR is also a major pathological feature of myotonic dystrophy. This paper presents a comprehensive review of the relevant proteins involved in PMR from the perspective of skeletal muscle physiology and pathology, systematically sorting out the characteristics and synergistic effects of PMR-related proteins in skeletal muscle injury repair, summarizing and generalizing the theoretical model of PMR in skeletal muscle, to provide new ideas for the in-depth study of the mechanism of membrane repair proteins in PMR.

Key words: skeletal muscle; plasma membrane repair protein; exercise induced muscle damage; muscle dystrophy

骨骼肌是机体重要的运动器官, 其易受到机械应力刺激从而诱发质膜损伤, 如未及时修复, 骨骼肌细胞将向“死亡”发展, 因此, 快速、精确、有效的质膜修复是维持骨骼肌正常收缩功能的重要保障^[1]。Cooper 和 Head^[2]认为骨骼肌不同于其他具有有效分化祖细胞的组织, 大规模的细胞凋亡对于骨骼肌来说并不是必要且适当的过程, 因此骨骼肌在很大程度上依赖于修复而不是再生。骨骼肌 PMR 障碍已被证明是引起肌细胞凋亡、坏死以及运动功能下降的主要原因^[3]。以 PMR 为突破口进行相关疾病治疗不断取得突破性进展, 然而, PMR 各靶点之间的协同和联动效应尚未完全阐明。现阶段研

究表明, 众多质膜修复蛋白“各司其职”但又“亲密无间”, 存在“千丝万缕”的联系, 因此, 系统梳理相关质膜修复蛋白十分必要。本文全面整理已有文献, 梳理了骨骼肌质膜修复相关蛋白在 PMR 中的可能机制, 为进一步开展骨骼肌损伤修复的分子机制研究提供思路和建议。

收稿日期: 2022-07-22; 修回日期: 2022-10-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31771312); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2020054)

*通信作者: E-mail: wuying@bsu.edu.cn; Tel: 010-62989582

1 骨骼肌质膜损伤概述

1.1 质膜损伤与运动性骨骼肌损伤

生理情况下, 大强度或不适应运动引起的运动后肌肉损伤称为运动性骨骼肌损伤 (exercise induced muscle damage, EIMD)。大量证据显示, EIMD 的主要诱因是骨骼肌质膜损伤^[4-6]。未经训练的受试者进行 20 min 离心运动即可引起血清肌酸激酶 (creatinase, CK) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 显著升高^[7]。Cooper 和 Head^[2] 认为, 运动后血清 CK 的迅速升高与骨骼肌质膜损伤有关, 这是由于胞内的大分子物质 (> 100 nm) 只有在“围墙”出现明显缺口的情况下才能进入血液, 要达到运动骨骼肌损伤后可观测到的血清 CK 水平, 一定是骨骼肌质膜产生了许多直径为数百纳米, 甚至微米级的“伤口”。EIMD 的后期主要表现为延迟性肌肉酸痛 (delayed onset muscle soreness, DOMS), 即损伤数小时后肌肉僵硬、酸痛和力量下降^[8]。DOMS 是造成运动表现下降的最常见原因之一, 如何减轻运动员在 DOMS 期的症状, 避免运动后骨骼肌功能的急速下降, 加速运动性肌肉损伤的恢复, 是运动人群最为关心的问题。能否以骨骼肌 PMR 为出发点, 从源头减轻运动骨骼肌损伤, 加速运动性疲劳恢复, 值得运动科学研究领域深入探索。

1.2 质膜损伤与肌营养不良症

肌营养不良症 (muscle dystrophys, MDs) 患者也会出现血清 CK 升高、Ca²⁺ 水平异常。肌营养不良蛋白基因突变或骨骼肌特异性膜修复蛋白表达异常是诱发 MDs 的关键。MDs 的早期阶段以膜通透性增加为显著特征, 后期表现为骨骼肌进行性无力、萎缩和退化。如 MDs 中最为常见的杜氏肌营养不良症 (duchenne muscle dystrophy, DMD), 肌细胞修复能力下降是其最主要的组织学特点, 病灶累及骨骼肌、心肌和呼吸肌, 是死亡率极高的多基因突变遗传性疾病。此外, 越来越多的肌营养不良症表型被证实与关键膜修复蛋白缺失有关, 例如肢带型肌营养不良 (limb-girdle muscular dystrophies, LGMDs) 2B 型与 dysferlin (DYSF) 缺失有关^[9-12], LGMD2A、LGMD2L 型与 CAPN3 突变有关^[13-14]。缺少 MG53 (mitsugumin 53) 将引起特发性炎症性肌病 (idiopathic inflammatory myopathies, IIM)^[15], IIM 是 MDs 的另一种形式, 其特征是因膜通透性异常引起的慢性炎症状态, 最终导致肌肉结构和功能的退化。

目前肌营养不良症的治疗仍是未能解决的难

题, 以 PMR 为突破口, 运用重组蛋白或基因疗法对此类疾病的治疗已在动物研究中取得进展。例如, Gushchina 等^[16] 利用重组人源 MG53 (recombinant human MG53, rhMG53) 改善了 LGMD2B 型小鼠的肌细胞膜完整性; 而一项使用重组膜联蛋白 A6 (recombinant annexin A6, rAnxA6) 干预 LGMD2C 型小鼠模型的研究发现, rAnxA6 可改善由质膜损伤引起的运动后血清 CK 升高, 并提高 LGMD2C 型小鼠肌纤维损伤后的运动功能^[17]。以上研究证实, 膜修复策略治疗 PMR 缺陷相关疾病具有临床应用前景。

综上, 无论是生理还是病理条件下, 骨骼肌质膜的损伤都是造成肌肉功能障碍和运动能力下降的重要诱因, 及时有效的质膜修复对维持正常的肌肉功能至关重要。因此, 从骨骼肌 PMR 角度出发, 以膜修复蛋白为抓手, 可为生理预防或病理治疗靶点的筛选提供依据。

2 骨骼肌质膜修复机制

2.1 细胞膜修复学说

PMR 是复杂而精细的工程, 其机制尚不完全清楚, 目前已知的细胞和分子模型包括: (1) 细胞膜张力改变学说^[18-19]; (2) “补丁”学说^[20]; (3) “细胞窑 (caveolae)”内吞学说^[21]; (4) 内体转运分选复合体 (endosomal sorting complex required for transport, ESCRT) 诱导的囊泡脱落学说^[22]; (5) “修复帽”学说^[23]。细胞膜受损时采用何种方式修复与“伤害”的性质、“伤口”大小以及细胞类型等有关。

膜修复依赖于细胞高度智能的修复体系, 细胞根据“伤口”大小、致伤因素等精准“手术”。“伤口”尺寸大于 10~40 nm 时 (不同类型细胞有差异), 均需要启动 Ca²⁺ 依赖性主动重密封。“补丁”学说阐释了大孔径“伤口” (> 100 nm) 如何在短时间内完成快速修复^[20]。“细胞窑”内吞主要出现在膜损伤孔径小于 80 nm 的修复中, 以消除膜上的毒性裂孔^[21]。膜“伤口”孔径在 10~20 nm 范围时, 膜依靠自身张力改变即可完成自主修复^[19]。然而, 当细胞膜出现更小损伤时, 例如由细菌成孔毒素 (pore-forming toxins, PFT) 诱导的化学损伤, ESCRT 系统可通过介导囊泡脱落对膜“小孔”进行修复, 并清除毒性物质^[24]。

同一损伤事件中, 不同的修复机制可以组合发生^[25-26]。例如, 离心运动诱导的骨骼肌质膜损伤在不同时序间表现为机械损伤和化学损伤两种^[7], 随

着时间推移两种损伤可能共存,因此不可能仅存在一种孤立的修复模式。骨骼肌是人体质量最大的组织,又承担着活动(运动)这样的重要功能任务,骨骼肌细胞处于损伤和修复的动态平衡中,因此相比其他组织,其修复更具生理和病理意义。据报道,骨骼肌PMR主要通过“补丁”和“修复帽”两种模式修复^[27],骨骼肌丰富的 Ca^{2+} 和运动介导产生的活性氧(ROS)是骨骼肌质膜修复的重要分子信号,对骨骼肌质膜的成功密封至关重要^[28-29](图1)。

2.1.1 “补丁”模型

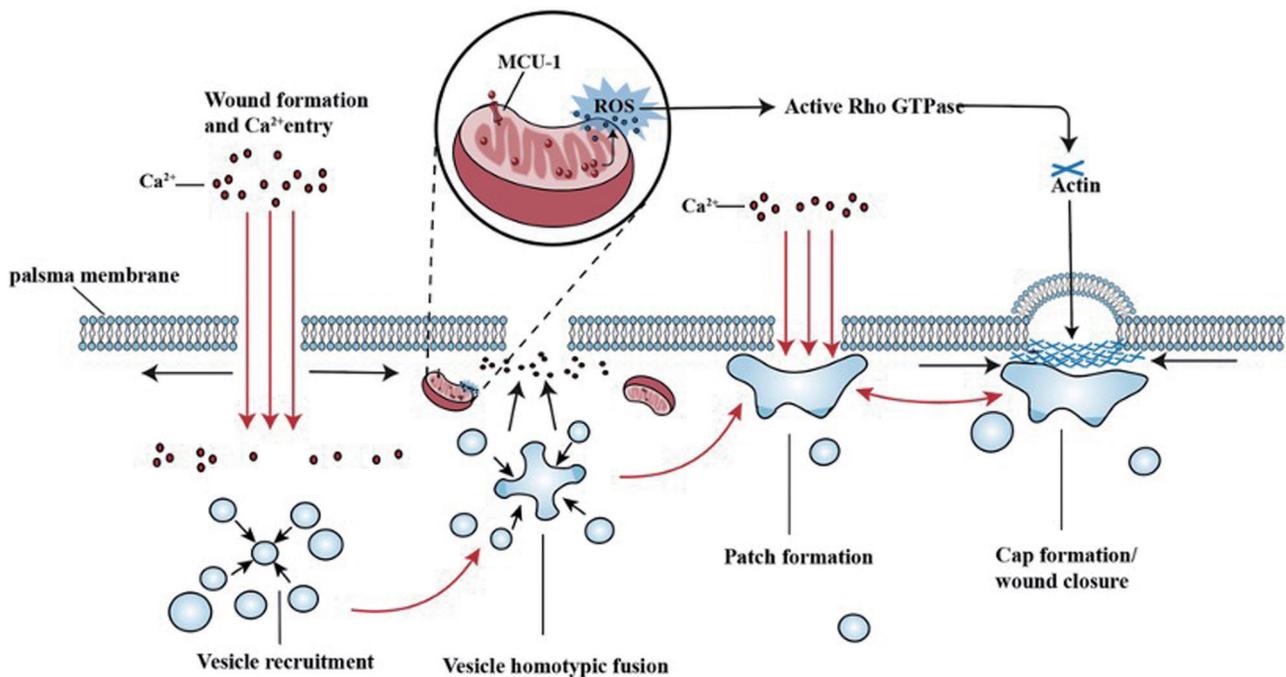
“补丁”模型是从无脊椎动物卵细胞中遗留下来的保守的原始保护机制,是所有大尺寸“伤口”短时间(通常在几秒内)完成修复的基础。骨骼肌质膜损伤后,胞内囊泡感知损伤信号,在驱动蛋白和肌球蛋白的指引下迅速向“伤口”聚集,并在损伤部位形成“补丁”状结构填补破孔部位(图1)^[30]。“补丁”的意义在于为受损细胞提供一个短暂的屏障,以应对膜损伤部位 Ca^{2+} 持续进入导致的细胞凋亡和坏死。目前暂不清楚运动或肌营养不良症诱导的骨骼肌质膜损伤的确切性质和大小,但在离心运动诱导损伤的肌纤维中观察到尺寸为 192 nm^2 的血

清白蛋白(serum albumin, SA)进入^[31],表明损伤尺寸至少为数百至数千平方纳米之间,这种损伤类型需要依赖快速有效的封闭以避免损伤部位持续暴露于细胞外环境。越来越多的证据表明,“补丁”的形成由 Ca^{2+} 依赖性膜修复蛋白协同介导,它们在囊泡募集、融合以及易位过程中发挥重要作用,这些蛋白包括DYSF^[30]、膜联蛋白家族(annexins, ANXs)^[32]、小窝蛋白3(caveolin-3, CAV-3)^[33]以及MG53^[34]等。

2.1.2 “修复帽”模型

“修复帽”是一种以膜修复蛋白为核心的修复机制。Croissant等^[23]发现肌纤维损伤后1 min,会在损伤部位形成“帽”形结构(图1),并在损伤后10 min消除。透射电镜(transmission electron microscope, TEM)结果表明,“修复帽”由损伤后细胞膜延伸的致密细丝组成^[23];激光共聚焦显示,多种膜修复蛋白定位于“修复帽”,包括ANXs、DYSF、MG53和含EH结构域蛋白2(EH-domain-containing protein 2, EHD2)等^[35]。其中,ANXs诱导的膜弯曲和膜收缩被证明是“修复帽”产生的关键。

目前,“修复帽”仅在骨骼肌质膜损伤模型中被报道,关于该结构的起源和特定功能还存在争



质膜损伤后, Ca^{2+} 大量进入,启动以下级联反应:(1)以膜修复蛋白为核心的 Ca^{2+} 依赖性膜修复蛋白介导囊泡融合,细胞内微囊泡经招募融合形成“补丁”,并易位至损伤部位;(2) Ca^{2+} 介导膜形态变化,在损伤部位形成“修复帽”;(3)MCU-1将胞浆 Ca^{2+} 泵入线粒体内导致mtROS信号爆发,激活Rho GTP酶进而启动氧化依赖性膜修复过程,促进PMR后期肌动蛋白聚合及细胞骨架重塑。

图1 骨骼肌PMR“补丁”—“修复帽”模型

议^[23]。Togo 等^[19]认为, 膜损伤导致肌动蛋白解聚和溶酶体胞吐引起的膜张力降低使骨骼肌质膜延伸, 从而产生多余的膜结构, 因此“修复帽”不是参与 PMR 期间所需的蛋白支架, 而是 PMR 后所需消除的冗余结构。PMR 后期观察到的巨噬细胞增多也支持上述观点^[36]。暂未有研究揭示“修复帽”和“补丁”之间的联系和时程特点, 有学者认为, 二者在骨骼肌 PMR 中并不互相排斥而是相互依存, 可能代表了骨骼肌 PMR 中两个连续的阶段^[23]。“修复帽”的意义可能在于形成紧密的结构来堵塞小孔, 利于 PMR 后期过量膜结构的消除, 从而促进骨骼肌质膜恢复完整。

2.2 质膜修复后期的氧化依赖性调节

ROS 在骨骼肌质膜的损伤修复中发挥了重要作用。已观察到骨骼肌质膜损伤初期, ROS 信号短暂增加并密集定位于损伤部位^[37]。Horn 等^[38]研究发现, 骨骼肌 PMR 所需要的 ROS 来源于线粒体而非细胞外; 此外, 他们团队利用线粒体活性氧 (mitochondrial ROS, mtROS) 淬灭剂 mito-TEMPO 干预离心运动损伤的肌纤维, 发现骨骼肌 PMR 能力显著下降, 表明 mtROS 对于骨骼肌 PMR 必不可少。mtROS 的增加需要线粒体钙离子单向转运蛋白 1 (mitochondrial calcium uniporter 1, MCU-1) 吸收胞浆中的 Ca^{2+} 。暂不清楚 Ca^{2+} 和 ROS 信号在 PMR 调控过程中是否存在时间和空间差异, 但二者之间似乎在不同水平上相互影响, 共同调节质膜损伤各阶段的修复进程。

骨骼肌 PMR 具有严格的时序特征, 早期局部应急机制能及时关闭细胞的“大门”, 防止胞内物质的外流及胞外物质的进入。Miyake 等^[39]将 PMR 后期描述为“质膜重组”的过程, 具体包括肌动蛋白聚合与细胞骨架重塑。与 Ca^{2+} 一样, ROS 也作为一种早期信号, “提醒”质膜受到损伤的同时激活氧化依赖性膜修复蛋白 MG53, 促进 PMR 早期的囊泡融合和转运^[40]。此外, ROS 还激活 RhoA 鸟苷三磷酸酶 (guanosine triphosphatase, GTPase) 和腺苷酸活化激酶 (AMP-activated kinase, AMPK)^[28], 促进伤口处 F-肌动蛋白 (F-actin) 聚合与细胞骨架重塑 (图 1)。

骨骼肌出现病理改变或剧烈运动会积累大量 ROS^[41-43]。骨骼肌细胞暴露于强氧化环境中 (5 mmol/L H_2O_2) 会严重抑制 PMR 反应^[44]。然而, 本课题组前期研究表明, 较低浓度的 H_2O_2 (20~100 $\mu\text{mol/L}$) 通过上调 MG53 表达促进骨骼肌 PMR^[40]。

Duan 等^[37]将受损骨骼肌纤维短暂暴露于氧化环境时可促进骨骼肌质膜的重密封, 但随着暴露时间延长, 骨骼肌 PMR 受到显著抑制。由此可见, ROS 信号根据其持续时间和信号强度似乎对 PMR 产生“双刃剑”效应。因此, 质膜损伤后如何在强度、时间和空间上对 ROS 进行严格调控需要进一步探索阐明。

3 膜修复蛋白在骨骼肌损伤修复中的作用

PMR 过程由许多膜修复蛋白介导, 目前已知在各组织 PMR 中发挥重要作用的膜修复蛋白包括 DYSF^[45]、ANXS^[46]、钙蛋白酶 (calpains, CAPNs)^[13]、MG53^[47]、AMPK^[28]、Anoctamin-5 (ANO5)^[48]、EHD2^[49]、CAV-3^[21]、沉默信息调节因子 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1)^[50]、半乳糖凝集素 1 (galectin-1, Gal-1)^[51]、ESCRT^[52]、可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感的融合蛋白附着受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE)^[53]、S100 蛋白家族^[54]、AHNAK^[55]、酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, ASMase)^[56] 以及突触结合蛋白 (synaptotagmins, SYTs)^[57] 等。

本文梳理了已有较多研究报道的骨骼肌质膜修复蛋白, 总结了它们在骨骼肌 PMR 中发挥的具体作用 (表 1)。筛选了首次报道该修复蛋白功能缺失或激活对骨骼肌 PMR 影响的研究文献, 梳理了各种膜修复蛋白对骨骼肌 PMR 的影响 (图 2)。图 2 数据来源于表 1 文献的原始数据, 对无法获取原始数据的文章利用 Oringin Pro 对图片中的数据进行提取。通过计算与对照组相比, 膜修复蛋白激活或抑制后膜损伤标志物的变化, 以及小鼠运动能力的增减百分比, 从而反映各种膜修复蛋白对骨骼肌 PMR 能力的影响。

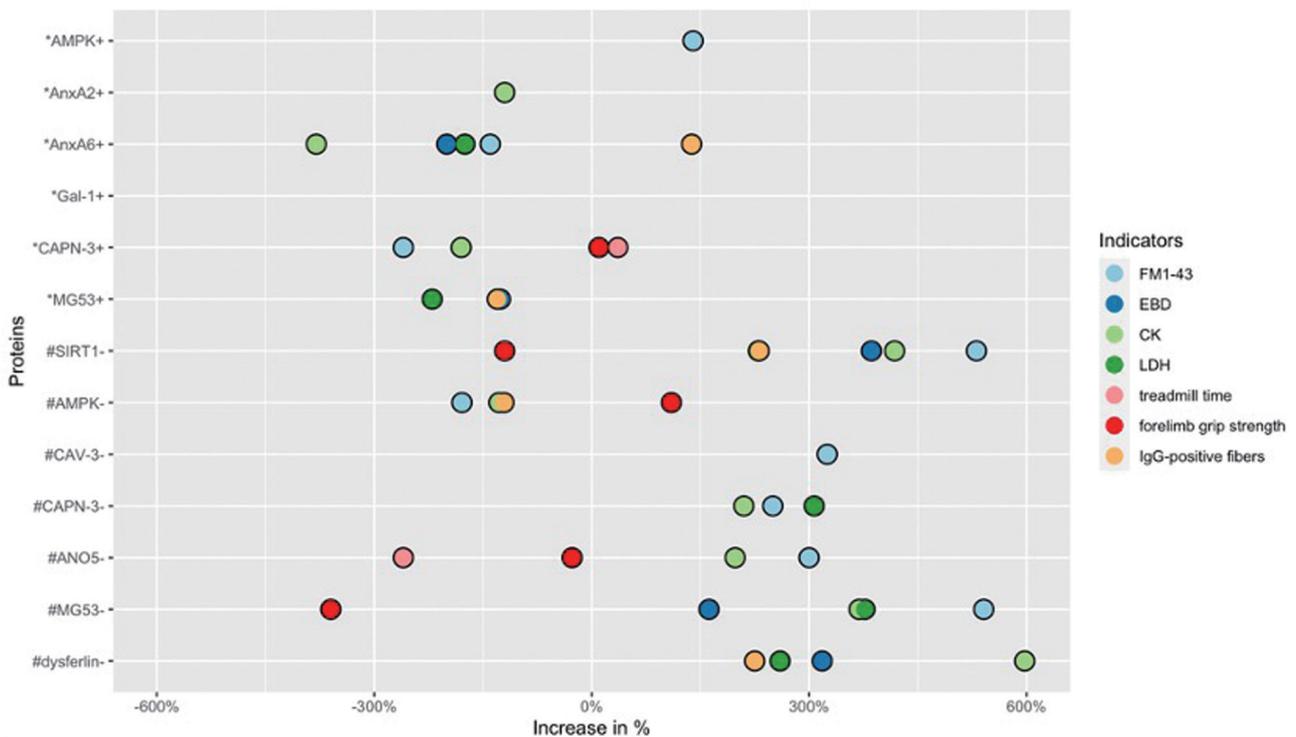
3.1 钙依赖性膜修复蛋白

3.1.1 dysferlin (DYSF)

DYSF 属于 ferlin 蛋白家族的一员, 是一种单通道跨膜蛋白, 具有一个 C 端胞外结构域和 7 个串联的 C2 结构域^[69-70]。DYSF 在骨骼肌中大量表达, 主要定位于骨骼肌质膜, 可参与成肌细胞融合、肌肉再生以及 PMR 过程^[71-73]。对 DYSF 的结构研究显示, DYSF 的功能由不同的 C2 结构域介导。C2 结构域能够结合 Ca^{2+} , 并调节许多 Ca^{2+} 依赖的细胞过程^[74]。据报道, DYSF 的 C2A 结构域主要介导 Ca^{2+} 敏感的磷脂结合^[75]、囊泡融合以及转运过程^[73]。C2B 和 C2C 结构域可调节 DYSF 在质膜上的释放

表1 骨骼肌PMR相关蛋白

蛋白名称	肌肉特异性	损伤感受器	囊泡运输	膜变形	肌动蛋白聚合	相关疾病	参考文献
Dysferlin	是	是	是	未明确	是	LGMD2B	[9, 58]
MG53	是	未明确	是	未明确	是	IIM	[16, 34]
Annexin A1	否	未明确	未明确	是	未明确	未明确	[59]
Annexin A2	否	是	是	未明确	未明确	未明确	[59-60]
Annexin A4	否	未明确	未明确	是	未明确	未明确	[46]
Annexin A5	否	未明确	是	是	未明确	未明确	[61]
Annexin A6	否	是	未明确	是	是	未明确	[62-63]
Calpain-1	否	是	未明确	未明确	未明确	未明确	[13]
Calpain-2	否	是	未明确	未明确	未明确	未明确	[13]
Calpain-3	是	是	未明确	未明确	未明确	LGMD2A	[14]
Anoctamin-5	是	是	是	未明确	未明确	LGMD2L	[48, 64-66]
SIRT1	是	未明确	是	未明确	未明确	未明确	[50]
Galectin-1	否	未明确	未明确	未明确	未明确	LGMD2B	[67]
AMPK	否	是	未明确	未明确	是	未明确	[28]
Caveolin-3	是	未明确	是	未明确	未明确	LGMD1C	[68]
EHD2	是	是	未明确	未明确	是	未明确	[35]



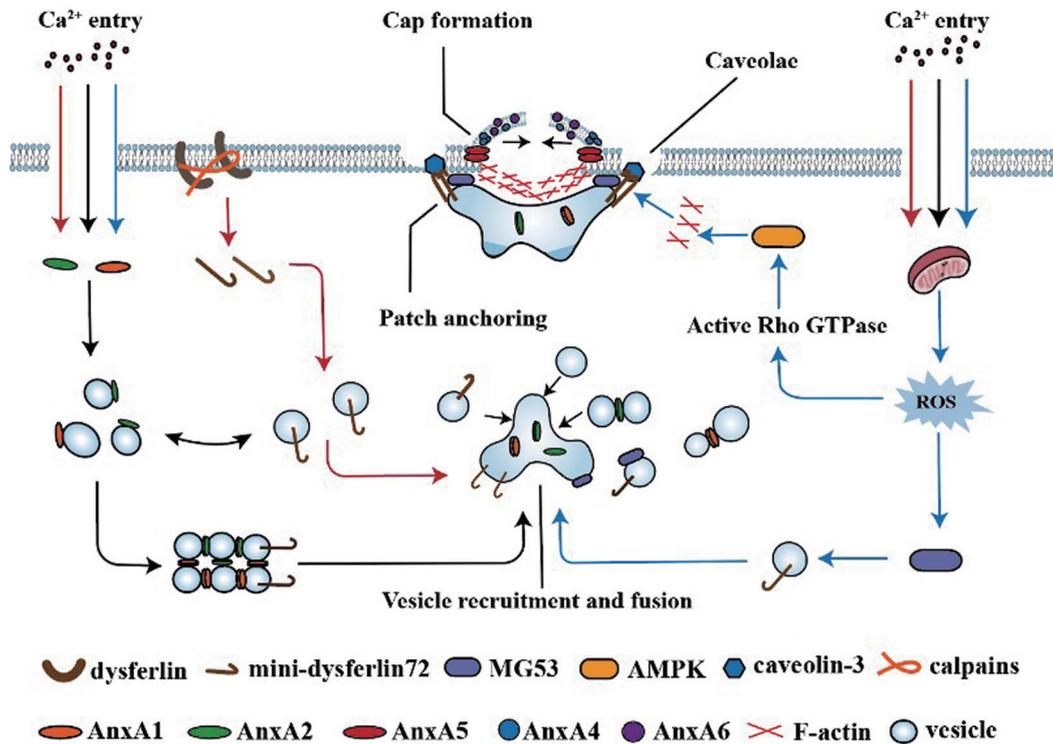
通过与对照组小鼠进行直接比较计算运动功能及膜损伤指标增减百分比。#：与WT小鼠相比；*：与肌营养不良小鼠相比；+：蛋白功能激活；-：蛋白功能缺失或抑制。

图2 膜修复蛋白功能缺失或激活对小鼠膜损伤标志物及运动能力的影响

效率^[76]。有研究指出，上述任一结构域发生基因突变都会导致肌营养不良症的出现，其中以 LGMD2B 最为常见^[30]。

DYSF 是 Ca²⁺ 依赖性骨骼肌 PMR 的核心蛋白，被形容为 PMR 中的 Ca²⁺ 依赖性“钩子”，介导细

胞内囊泡的募集、融合与转运，并促进“补丁”与肌膜间的有效融合(图3)^[77-78]。Han 等^[79]研究发现，缺乏 DYSF 的肌纤维没有表现出与肌营养不良症相同的膜脆性，而显示出激光损伤后 Ca²⁺ 介导膜密封的缺陷。DYSF 与许多膜修复蛋白之间存在紧密的联



骨骼肌PMR由以下三个过程共同介导完成。(1)红色箭头: dysferlin介导的PMR过程。dysferlin被CAPNs切割为mini-dysferlin72, 与AnxA1、AnxA2相互作用启动细胞内囊泡融合反应。(2)黑色箭头: ANXs家族介导的PMR过程。AnxA1和AnxA2以二聚体形式招募细胞内囊泡, AnxA4在膜损伤边缘组成三聚体使膜边缘弯曲, AnxA5形成二聚体降低膜表面张力防止受损质膜的扩张, AnxA6使膜收缩, 三者合力使膜不断折叠卷曲逐渐在膜破损处形成“修复帽”。(3)蓝色箭头: mtROS激活肌动蛋白聚合和氧化依赖性PMR过程。mtROS激活MG53并招募含dysferlin的囊泡向膜损伤部位聚集, MG53与caveolin-3相互作用使囊泡与细胞内膜融合, 阻断受损质膜内外的物质与能量交换; 此外, ROS激活Rho-GTP酶, 进一步激活AMPK, 从而启动F-actin聚合反应。

图3 膜修复蛋白介导骨骼肌PMR的分子机制

系, 包括CAPNs^[80]、CAV-3^[21]、ANXs^[78]以及MG53^[47]。Krahn等^[81]发现, 膜损伤后募集到损伤部位的DYSF并不是其全长形式, 而是一种截短的DYSF, 称为mini-DYSF72。mini-DYSF72由DYSF通过CAPN-1和CAPN-2催化裂解产生(图3)。Lennon等^[78]使用活细胞成像系统观察到在非损伤的肌细胞中, DYSF、AnxA1和AnxA2共沉淀并定位于骨骼肌质膜, 三者以 Ca^{2+} 依赖的形式相互作用, 共同促进囊泡的募集和融合^[32](图3红色箭头)。一项DYSF和ANXs在损伤部位募集时程特点的研究发现, AnxA1和AnxA2受到DYSF的调节^[82]。AnxA6独立于DYSF被招募到损伤位点, 在PMR后期出现的“修复帽”中观察到DYSF与AnxA6共定位, 位于“修复帽”的肩部区域, 推测DYSF可能介导“修复帽”肩结构的形成^[23]。MG53以非 Ca^{2+} 依赖性的方式招募含mini-DYSF72的囊泡(图3蓝色箭头)^[77,80], 促进囊泡“补丁”易位至膜受损部位。

3.1.2 钙蛋白酶(CAPNs)

CAPNs是在骨骼肌纤维中大量表达的 Ca^{2+} 依赖性半胱氨酸蛋白酶。骨骼肌中主要存在三种CAPN亚型, 分别为CAPN-1^[13]、CAPN-2^[80]和CAPN-3^[80], 均含有半胱氨酸CysPc结构域。CAPN-1/2在骨骼肌PMR中至关重要, 而目前尚未有足够证据表明CAPN-3在PMR中发挥修复作用, 其在肌纤维中与肌联蛋白(titin)紧密结合, 是支持三联管的主要结构。CAPN-3缺乏或突变被证明是LGMD2A型肌营养不良症的主要诱因^[14]。

CAPNs是 Ca^{2+} 依赖性PMR的重要介质, 其在骨骼肌PMR中主要发挥以下作用: (1) CAPN-1/2可切断质膜与细胞骨架的连接, 增加膜的流动性, 促进囊泡对伤口的重密封^[13]; (2) CAPN-1/2广泛参与膜损伤处的重构, 一方面可将DYSF切割成mini-DYSF72, 并由MG53招募到膜破损部位, 另一方面可参与“密封”后冗余物质的清除^[81]。

CAPN-1/2 参与的修复同肌纤维“伤口”大小和性质有关,其主要介导机械损伤诱导的“大伤口”撕裂修复,而不参与毒素引起的“小伤口”修补^[13]。然而,在运动引起的损伤中,CAPNs 过度的水解作用可能对 EIMD 恢复具有负面影响。研究表明,大强度离心运动后,CAPNs 表达相比对照组提升 3 倍,CAPNs 激活诱导肌原纤维降解与离心运动后肌肉力量下降^[83]。Zhang 等^[84]在离体实验中模拟肌肉离心损伤,发现抑制 CAPNs 可以减少离心收缩引起的损伤标志物增加。Kanzaki 等^[85]抑制 CAPNs 预防了离心损伤导致的肌肉力量急性下降,促进损伤后 3 天的力量恢复。上述研究提示,离心运动后 CAPNs 表达升高具有抑制恢复的作用,而适当抑制 CAPNs 则可促进恢复进程,这为运动后生理状态下促进骨骼肌机能恢复提供了新思路,同时也表明 CAPNs 对骨骼肌损伤修复存在“双刃”影响。有学者认为 CAPNs 可通过降解受损蛋白促进 EIMD 期骨骼肌蛋白质之间的转化,从而引起骨骼肌的整体机能恢复^[86]。因此,CAPNs 介导的蛋白质水解也许并不“促进”损伤,而有可能是引起运动适应的必要过程。

综上,CAPNs 是骨骼肌 PMR 的重要介质,同时也可能成为引起运动适应的关键靶点。CAPNs 在运动诱发的适应反应中的作用机制目前暂不明确。未来的研究需要确定 CAPNs 对离心运动的双面效应,并对 CAPNs 介导不同运动类型产生的适应性反应做更加全面的阐述。

3.1.3 Anoctamin-5 (ANO5)

ANO5 是 Anoctamin/TMEM16 家族成员,是编码离子通道和膜磷脂的调节剂^[87-88]。ANO5 带有一个特定的 SCRD 结构域,负责扰乱膜磷脂^[48]。ANO5 中的 R758W 或 R758C 突变可导致 LGMD2L 型,然而这两种突变都位于 SCRD 结构域之外,表明 ANO5 在 PMR 中的作用似乎不依赖于 SCR 结构域^[64]。Foltz 等^[48]观察到 ANO5 敲除小鼠肌纤维中的 ANXs 运输异常,提示 ANO5 可能促进关键 PMR 蛋白易位至膜损伤位点。2021 年,Chandra 等^[89]的研究表明,ANO5 缺乏可导致内质网 Ca^{2+} 过载从而抑制 PMR。但目前未有研究直接证明 ANO5 直接作用于质膜,所以其是否属于 Ca^{2+} 依赖性 PMR 的一环还存在争议。

3.1.4 小窝蛋白(CAV)

CAV 基因家族蛋白有三个亚型,包括:CAV-1、CAV-2 和 CAV-3。CAV-1 和 CAV-2 在脂肪细胞、成

纤维细胞和内皮细胞中联合表达,而 CAV-3 在骨骼肌和心肌中特异性表达^[21]。CAV-3 由一个马蹄形结构域和一个支架结构域组成,其通过支架结构域与其他 PMR 蛋白相互作用,而马蹄形结构域则对 CAV-3 进行膜锚定必不可少^[33]。CAV-3 缺失是引起 LGMD1C 型肌营养不良症的主要原因^[68]。而在 DMD 中发现 CAV-3 表达上调,与 WT 小鼠相比增加约 3 倍,表明 CAV-3 无论过量或是不足,都可能引起肌纤维病变^[33]。CAV-3 是形成小窝(caveolae,直径 60~80 nm 的内陷膜结构)所必需的标志性蛋白,在肌质膜和 T 小管中表达并定位于肌细胞的 RYR 受体^[90](图 3)。骨骼肌细胞膜表面富含 caveolae,其扁平化已被证明可以通过减少细胞骨架施加的张力来保护骨骼肌质膜免受机械损伤^[90]。因此,caveolae 似乎通过控制膜张力来预防膜“伤口”的进一步扩大。此外,MG53 似乎通过膜表面 caveolae 实现精准“定位”,促进修复囊泡与细胞内膜融合,使“补丁”精准地锚定在膜上(图 3)^[91]。有学者指出,CAV-3 在 PMR 中的作用可能与其介导的线粒体生物功能息息相关,包括保持线粒体结构稳定、调节 ROS 的产生和维持细胞能量稳态^[92],CAV-3 介导膜-线粒体之间的相互作用还需进一步阐明。

3.1.5 膜联蛋白家族(ANXs)

ANXs 是 Ca^{2+} 敏感性磷脂结合家族蛋白,在哺乳动物中已有 12 个 ANXs 家族成员被发现(AnxA1~11、AnxA13)^[93]。ANXs 蛋白家族的显著特征是能以 Ca^{2+} 和肌动蛋白依赖性的方式结合磷脂。ANXs 参与多种 PMR 过程,包括改变膜通透性、调节脂质结合、囊泡融合、细胞骨架重组以及膜折叠^[94-95]。AnxA1 是第一个被发现与骨骼肌 PMR 有关的 ANXs^[96],其他在骨骼肌 PMR 中发挥重要作用的 ANXs 成员还包括 AnxA2^[97-98]、AnxA4^[99-100]、AnxA5^[61,101-102]、AnxA6^[103-106]。不同 ANXs 家族成员在 PMR 过程中执行“任务”的能力与它们的 Ca^{2+} 敏感性有关。对 Ca^{2+} 信号的反应差异决定了不同 ANXs 在损伤部位的募集能力,拥有较高 Ca^{2+} 亲和力的 ANXs 总是首先出现在损伤位点。研究表明,肌纤维 PMR 过程中拥有最高 Ca^{2+} 敏感性的 AnxA6 最快募集,而对 Ca^{2+} 敏感性较低的 AnxA2 最后出现在损伤部位^[23,82]。

DYSF 是 ANXs 最重要的协同“伙伴”。研究表明,AnxA1、AnxA2 与 DYSF 之间的相互作用促进细胞内囊泡的融合与转运(图 3 黑色箭头)^[78]。DYSF 敲除将导致 AnxA1、AnxA2 与 AnxA6 的转

运效率大幅下降^[62]。此外, 在 DYSF 敲除小鼠肌纤维中还发现一种截短的 AnxA6 (AnxA6N32), 会严重破坏完整的 AnxA6 向损伤位点的易位, 抑制其修复功能^[107]。ANXs 家族之间的协同在骨骼肌 PMR 中也发挥重要作用。AnxA4 和 AnxA6 共同介导了膜伤口边缘的卷曲与变形, 被证明与“修复帽”的产生有关(图 3 黑色箭头)^[23, 100]。AnxA5 可降低受损质膜表面张力起到稳定伤口的作用^[61]。AnxA1、AnxA4 和 AnxA5 的修复功能似乎受到 AnxA6 的调控, AnxA6 突变可导致 AnxA4 和 AnxA5 功能受到抑制, 使得“修复帽”无法正常形成^[46], AnxA6 与 DYSF 共敲除可完全阻断 AnxA1 的修复功能^[62]。此外, ANXs 家族之间还被报道存在代偿效应^[108], 如敲除 AnxA1 后, 其他 ANXs 家族成员包括 AnxA2、AnxA4、AnxA5 和 AnxA6 在不同组织中的表达出现了上调或下降^[109], 表明有些成员对 AnxA1 介导的生理过程具有补偿作用, 同样的现象在 AnxA5 敲除小鼠中也有体现^[110]。

AnxA6 是近年来在骨骼肌质膜损伤模型中研究最多的 ANXs 家族成员。动物模型研究发现, AnxA6 缺乏可导致某种形式的肌营养不良^[107], 但没有证据表明人类肌营养不良症与 AnxA6 有关。外源性 rAnxA6 已被用于肌营养不良症的治疗, 并可预防大强度运动引起的急性骨骼肌损伤^[63]。

3.2 非Ca²⁺依赖性膜修复蛋白

3.2.1 MG53

MG53 是 E3 泛素连接酶 TRIM 家族的成员, 也称为 TRIM72, 在骨骼肌和心肌中特异性表达, 是 TRIM 家族唯一具有 PMR 效应的蛋白。Cai 等^[34]通过一系列 MG53 基因敲除实验表明, MG53 是骨骼肌 PMR 的重要参与者, MG53 敲除小鼠表现出进行性肌力下降与骨骼肌质膜损伤。MG53 虽为可溶性蛋白质, 但因其与膜上磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 结合的特性, 能在损伤后与膜紧密结合, 因此 MG53 也被喻为肌细胞损伤后的“分子绷带”^[111]。

与其他 Ca²⁺ 依赖性膜修复蛋白不同, 缺乏 MG53 虽然会导致 Ca²⁺ 依赖性 PMR 过程受阻, 但 MG53 的修复作用并不直接依赖细胞外 Ca²⁺ 水平, 而是具有氧化依赖性^[34]。在转染 GFP-MG53 的 C2C12 细胞培养液中加入还原剂, 可立即消除 MG53 在损伤位点的聚集, 加入氧化剂后 MG53 的修复功能得到恢复^[47]。然而在无 Ca²⁺ 的溶液中, MG53 也无法完成修复功能, 这可能与 MG53、DYSF 以及 CAV-3

在骨骼肌 PMR 中高度“绑定”有关。DYSF 和 CAV-3 均为 Ca²⁺ 依赖性修复蛋白。研究表明, MG53 在损伤部位的成功定位依赖于 CAV-3。Cai 等^[68]在 C2C12 细胞中共转染 GFP-MG53 与 CAV-3 突变体 (P104L-CAV3), 发现 GFP-MG53 异常定位于高尔基体, 从而导致肌膜修复失败。DYSF 的修复作用受到 MG53 的调控, 在 MG53 缺失肌纤维中观察到胞内囊泡可以聚集但无法易位至损伤部位^[112]。此外, 内源性 MG53 需要通过 DYSF 发挥修复作用。在损伤后的 DYSF 敲除肌管中观察到 MG53 在损伤部位聚集, 但由于缺乏有效的囊泡融合而无法完成修复^[112]。

值得注意的是, 外源性 MG53 的修复功能不依赖 DYSF, 外源性 rhMG53 在 DYSF 敲除小鼠肌纤维中也表现出很强的修复能力, 提示内源性 MG53 与外源性 MG53 的修复机理可能存在不同^[16, 113]。除此之外, 外源性 MG53 的修复功能与内源性 MG53 无关, rhMG53 在不表达内源性 MG53 的组织中同样发挥修复作用^[16]。有学者认为细胞膜上暴露的 PS 可能是外源性 MG53 发挥作用的关键节点, 但调控外源性 MG53 发挥修复作用的信号分子调控机制仍不清楚。由于外源性 MG53 在细胞膜修复方面的特殊作用, 其已成为膜修复异常相关疾病的重要治疗靶点。大量的研究表明, rhMG53 在骨骼肌损伤^[16]、心肌损伤^[114]、药物性肝损伤^[115]、急性肺损伤^[116] 以及急性肾损伤^[117] 方面表现出强大的治疗潜力。

3.2.2 EHD2

EHD 是一类高度保守的 ATP 酶, 目前已知 4 种 EHD 蛋白 (EHD1~4), 其中 EHD1 和 EHD2 在成肌细胞融合中发挥重要作用。Posey 等^[49]发现 C2C12 细胞中 EHD1 与 EHD2 的结合导致肌融合效率降低。此外, EHD2 缺失会抑制成肌细胞融合并隔离 DYSF。基于此特性, EHD2 可能参与 DYSF 介导的 PMR 过程。Marg 等^[118]在之后进行了一系列膜修复实验, 证实 EHD2 参与骨骼肌 PMR, 缺少 EHD2 会导致 DYSF 在损伤部位募集受阻。EHD2 是目前唯一被证明参与 PMR 的 EHD 家族成员, 但没有更多的证据阐明其在 PMR 中的具体作用机制, EHD2 与其他 PMR 蛋白之间是否存在协同或制约关系目前未见研究报道, EHD2 在 PMR 中的具体贡献如何还需进一步阐明。

3.2.3 SIRT1

SIRT1 是一种 NAD⁺ 敏感的脱乙酰酶, 在骨骼

肌中高度表达,是近年来新确定的参与骨骼肌 PMR 的蛋白之一。Gordon 等^[119]利用白藜芦醇(一种 SIRT1 激活剂)对 DMD 小鼠进行治疗发现,激活 SIRT1 可减轻 DMD 小鼠肌肉损伤。之后又有学者发现,在 DMD 小鼠中过表达 SIRT1 可以减少 DMD 小鼠血清 CK 并提高肌肉耐力。以上研究表明,使用 SIRT1 激活剂可作为肌营养不良症的候选治疗方法。而近年的研究也证明了 SIRT1 在骨骼肌 PMR 中的潜力,Fujiwara 等^[50]发现缺乏 SIRT1 会抑制线粒体功能从而干扰骨骼肌质膜损伤后的重密封,并导致轻度的肌营养不良症。

3.2.4 AMPK 复合物

AMPK 是一种异源三聚体复合物,是细胞内的能量代谢感受器,由三个亚基组成(α 、 γ 和 β),其激酶结构域在 α 亚基中,必须将其磷酸化才能产生显著的活性。Ono 等^[28]通过对 DYSF 结合蛋白进行蛋白质组学鉴定发现,AMPK α 与 γ 亚基参与调节骨骼肌 PMR,其中 γ 亚基在 PMR 期间于损伤部位聚集,且受到 DYSF 的调节;而 AMPK α 的磷酸化对 PMR 期间肌动蛋白的聚集十分重要,抑制 AMPK α 磷酸化将导致肌动蛋白骨架解聚从而使损伤肌管修复失败。同时,该团队使用二甲双胍对 DMD 小鼠进行 3 个月的治疗,发现与对照组相比,使用二甲双胍可以减少血清 CK 以及降低受伤肌纤维百分比,并提高 DMD 小鼠的运动能力^[28]。上述结果表明,AMPK 磷酸化对骨骼肌 PMR 起到积极作用,AMPK 激活可作为骨骼肌膜损伤疾病的候选治疗靶点。

许多细胞器可对 PMR 产生积极影响,例如线粒体已被证明可调节 ROS 从而介导 PMR^[120],内质网对 Ca^{2+} 平衡的调节也在 PMR 中起到重要作用^[89]。AMPK 通过 PINK1-Parkin/TBK1 通路诱导线粒体碎片化,而 ROS 诱导的线粒体碎片化过程已被证明是骨骼肌 PMR 的必要条件^[120]。因此,以下问题值得深入探讨:AMPK 是否介导骨骼肌 PMR 的相关信号转导;其下游靶标是否直接参与骨骼肌 PMR;除此之外,运动已被证明是 AMPK 的有效激活剂,长期运动训练是否能从 AMPK/PMR 角度阐述运动骨骼肌损伤适应相关机制;AMPK 激活剂能否用于 EIMD 的治疗。

3.2.5 Galectin-1 (Gal-1)

Gal-1 是一种非糖基化蛋白质,具有碳水化合物识别结构域,又称 CRD 结构域,在所有哺乳动物中高度保守。Gal-1 是近年来发现的最特殊的骨

骼肌 PMR 蛋白,有研究表明缺乏 Gal-1 的小鼠表现出成肌细胞融合和肌肉再生的减少,但不会影响骨骼肌 PMR 进程,表明 Gal-1 并非是 PMR 所必需的蛋白^[121]。近年的研究显示,Gal-1 可能是提高质膜损伤后修复能力的重要 PMR 蛋白^[51,67]。在一项使用外源性 Gal-1 治疗 DYSF 缺陷型肌营养不良症小鼠的研究中,发现 Gal-1 可在无 Ca^{2+} 溶液中修复受损肌管,这与所有 Ca^{2+} 依赖性 PMR 蛋白不同^[67]。重组 Gal-1 在质膜损伤后上调 PMR 相关蛋白,如 AnxA1、AnxA2、AnxA4 和 AnxA6 的表达,并增加膜的脂质流动性^[67]。

非 Ca^{2+} 依赖性膜修复蛋白在骨骼肌 PMR 中具有临床价值,同时也为骨骼肌 PMR 研究提供了新思路。非 Ca^{2+} 依赖性 PMR 蛋白,如 Gal-1 的激活,能否补偿 Ca^{2+} 依赖性蛋白缺失导致的肌肉功能下降?对非 Ca^{2+} 依赖性膜修复蛋白的挖掘可能是丰富 PMR 理论模型的关键,更多的非 Ca^{2+} 依赖性膜修复途径可能是今后膜修复领域的研究重点。

4 小结与展望

本文综述了膜修复蛋白在骨骼肌 PMR 中的现有报道,有些研究较少的膜修复蛋白并未深入探讨,但参与骨骼肌 PMR 的“修补匠”远不止这些,需要在不断深入的研究中继续挖掘。PMR 是一项复杂的、系统的、时序性的工程,仍有很多问题亟待解决。首先,膜修复蛋白的“挖掘”需不断深入。近年来,蛋白质组学的应用为膜修复蛋白的发现提供了新思路,例如,Ono 等^[28]通过蛋白质组学对 DYSF 结合伴侣进行鉴定,从而确定 AMPK 复合物参与骨骼肌 PMR。Vila 等^[29]通过对损伤肌管进行蛋白质组学分析发现线粒体蛋白表达增加,从而确定线粒体相关蛋白参与骨骼肌 PMR。未来对骨骼肌膜修复蛋白的挖掘应从亚细胞层面入手,探索更多与骨骼肌细胞器之间存在“cross-talk”的膜修复蛋白。例如内质网相关蛋白 ANO5,这类蛋白的探索对于丰富骨骼肌 PMR 机制有着重要意义。其次,在膜损伤相关疾病的发生发展中,膜修复蛋白对 PMR 的调控机制仍不清晰。联合应用膜修复蛋白对膜损伤相关疾病的治疗作用、时程特点以及剂量效应有待阐明。膜修复蛋白在生理性骨骼肌损伤中的研究仍具有探索前景,加速 EIMD 恢复是提高运动员运动表现,促进运动性疲劳恢复的关键。动物实验已经表明,PMR 途径能够成为解决这一大难题的潜在治疗靶点,如重组 AnxA6 可以预防运动

引起的急性肌肉损伤, 减少小鼠 DOMS 期的运动能力下降^[63]。PMR 代谢变化也为运动损伤的评定提供了新思路, 大强度运动导致的血清膜修复蛋白水平变化或许能成为诊断 EIMD 和运动性疲劳的新指标。运动引起的适应性变化是否包含 PMR 能力的提高, 不同运动形式对 PMR 能力的影响是否相同, 膜修复蛋白在此过程中发挥了怎样的效应, 以上问题引起了本课题组极大的兴趣。再次, 目前 PMR 的各部分机制研究相对独立, 未来的关键是将涉及骨骼肌 PMR 过程的相关机制联系起来, 把“故事”的起因、发展、高潮和结局串联起来“故事”才完整, 如 PMR 的蛋白机制与细胞机制之间的联系, 各个系统间的信号转导途径等, 以便更好地阐明骨骼肌 PMR 过程中每个阶段的机制与特点。

[参 考 文 献]

- [1] Abmayr SM, Pavlath GK. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development*, 2012, 139: 641-56
- [2] Cooper ST, Head SI. Membrane injury and repair in the muscular dystrophies. *Neuroscientist*, 2015, 21: 653-68
- [3] Ho M, Post CM, Donahue LR, et al. Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet*, 2004, 13: 1999-2010
- [4] MacIntyre DL, Reid WD, McKenzie DC. Delayed muscle soreness. The inflammatory response to muscle injury and its clinical implications. *Sports Med*, 1995, 20: 24-40
- [5] Abaidia AE, Cosyns S, Dupont G. Muscle oxygenation induced by cycling exercise does not accelerate recovery kinetics following exercise-induced muscle damage in humans: a randomized cross-over study. *Respir Physiol Neurobiol*, 2019, 266: 82-8
- [6] Stozer A, Vodopivec P, Krizancic Bombek L. Pathophysiology of exercise-induced muscle damage and its structural, functional, metabolic, and clinical consequences. *Physiol Res*, 2020, 69: 565-98
- [7] Newham DJ, Jones DA, Edwards RH. Plasma creatine kinase changes after eccentric and concentric contractions. *Muscle Nerve*, 1986, 9: 59-63
- [8] Cheung K, Hume P, Maxwell L. Delayed onset muscle soreness: treatment strategies and performance factors. *Sports Med*, 2003, 33: 145-64
- [9] Bansal D, Miyake K, Vogel SS, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*, 2003, 423: 168-72
- [10] Liu J, Aoki M, Illa I, et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1998, 20: 31-6
- [11] Bashir R, Britton S, Strachan T, et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet*, 1998, 20: 37-42
- [12] Blandin G, Beroud C, Labelle V, et al. UMD-DYSF, a novel locus specific database for the compilation and interactive analysis of mutations in the dysferlin gene. *Hum Mutat*, 2012, 33: E2317-31
- [13] Piper AK, Sophocleous RA, Ross SE, et al. Loss of calpains-1 and -2 prevents repair of plasma membrane scrape injuries, but not small pores, and induces a severe muscular dystrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318: C1226-37
- [14] Jahnke VE, Peterson JM, Van Der Meulen JH, et al. Mitochondrial dysfunction and consequences in calpain-3-deficient muscle. *Skelet Muscle*, 2020, 10: 37
- [15] McElhanon KE, Young N, Hampton J, et al. Autoantibodies targeting TRIM72 compromise membrane repair and contribute to inflammatory myopathy. *J Clin Invest*, 2020, 130: 4440-55
- [16] Gushchina LV, Bhattacharya S, McElhanon KE, et al. Treatment with recombinant human MG53 protein increases membrane integrity in a mouse model of limb girdle muscular dystrophy 2B. *Mol Ther*, 2017, 25: 2360-71
- [17] Demonbreun AR, Fallon KS, Oosterbaan CC, et al. Recombinant annexin A6 promotes membrane repair and protects against muscle injury. *J Clin Invest*, 2019, 129: 4657-70
- [18] Gozen I, Dommersnes P. Pore dynamics in lipid membranes. *Eur Phys J Spec Top*, 2014, 223: 1813-29
- [19] Togo T, Krasieva TB, Steinhardt RA. A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 4339-46
- [20] Terasaki M, Miyake K, McNeil PL. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca²⁺-dependent vesicle-vesicle fusion events. *J Cell Biol*, 1997, 139: 63-74
- [21] Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, et al. The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 1761-6
- [22] Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*, 2009, 458: 445-52
- [23] Croissant C, Gounou C, Bouvet F, et al. Annexin-A6 in membrane repair of human skeletal muscle cell: a role in the cap subdomain. *Cells*, 2020, 9: 1742
- [24] 赵莎莎, 石丽君, 吴迎. ESCRT复合体在细胞质膜损伤修复中的功能. *生物化学与生物物理进展*, 2022, 49: 503-13
- [25] Draeger A, Monastyrskaya K, Babiychuk EB. Plasma membrane repair and cellular damage control: the annexin survival kit. *Biochem Pharmacol*, 2011, 81: 703-12
- [26] Jimenez AJ, Perez F. Plasma membrane repair: the adaptable cell life-insurance. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 47: 99-107
- [27] Dias C, Nylandsted J. Plasma membrane integrity in health and disease: significance and therapeutic potential. *Cell Discov*, 2021, 7: 4
- [28] Ono H, Suzuki N, Kanno SI, et al. AMPK complex activation promotes sarcolemmal repair in dysferlinopathy.

- Mol Ther, 2020, 28: 1133-53
- [29] Vila MC, Rayavarapu S, Hogarth MW, et al. Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Differ*, 2017, 24: 330-42
- [30] Abdullah N, Padmanarayana M, Marty NJ, et al. Quantitation of the calcium and membrane binding properties of the C2 domains of dysferlin. *Biophys J*, 2014, 106: 382-9
- [31] Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, et al. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng*, 1999, 12: 439-46
- [32] Waddell LB, Lemckert FA, Zheng XF, et al. Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70: 302-13
- [33] Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14: 98-112
- [34] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 56-64
- [35] Demonbreun AR, Quattrocelli M, Barefield DY, et al. An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. *J Cell Biol*, 2016, 213: 705-18
- [36] Middel V, Zhou L, Takamiya M, et al. Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair. *Nat Commun*, 2016, 7: 12875
- [37] Duan X, Chan KT, Lee KKH, et al. Oxidative stress and plasma membrane repair in single myoblasts after femtosecond laser photoporation. *Ann Biomed Eng*, 2015, 43: 2735-44
- [38] Horn A, Van der Meulen JH, Defour A, et al. Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells. *Sci Signal*, 2017, 10: eaaj1978
- [39] Miyake K, McNeil PL, Suzuki K, et al. An actin barrier to resealing. *J Cell Sci*, 2001, 114: 3487-94
- [40] 吴迎, 石丽君, 伊木清. 外源性H₂O₂对小鼠骨骼肌细胞MG53膜修复作用的影响. *中国康复医学杂志*, 2019, 34: 683-8
- [41] Gomez-Cabrera MC, Salvador-Pascual A, Cabo H, et al. Redox modulation of mitochondriogenesis in exercise. Does antioxidant supplementation blunt the benefits of exercise training? *Free Radic Biol Med*, 2015, 86: 37-46
- [42] Winokur ST, Barrett K, Martin JH, et al. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) myoblasts demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Neuromuscul Disord*, 2003, 13: 322-33
- [43] Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 2008, 88: 1243-76
- [44] Howard AC, McNeil AK, McNeil PL. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. *Nat Commun*, 2011, 2: 597
- [45] Anderson LV, Davison K, Moss JA, et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet*, 1999, 8: 855-61
- [46] Croissant C, Gounou C, Bouvet F, et al. Trafficking of annexins during membrane repair in human skeletal muscle cells. *Membranes*, 2022, 12: 153
- [47] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol*, 2009, 11: 56-64
- [48] Foltz SJ, Cui YY, Choo HJ, et al. ANO5 ensures trafficking of annexins in wounded myofibers. *J Cell Biol*, 2021, 220: e202007059
- [49] Posey AD, Pytel P, Gardikiotes K, et al. Endocytic recycling proteins EHD1 and EHD2 interact with fer-1-like-5 (Fer1L5) and mediate myoblast fusion. *J Biol Chem*, 2011, 286: 7379-88
- [50] Fujiwara D, Iwahara N, Sebori R, et al. SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury. *PLoS One*, 2019, 14: e0218329
- [51] Vallecillo-Zúniga ML, Rathgeber M, Poulson D, et al. Evaluating therapeutic activity of Galectin-1 in sarcolemma repair of skeletal muscle. *Methods Mol Biol*, 2022, 2442: 663-83
- [52] Muratori C, Silkuniene G, Mollica PA, et al. The role of ESCRT-III and Annexin V in the repair of cell membrane permeabilization by the nanosecond pulsed electric field. *Bioelectrochemistry*, 2021, 140: 107837
- [53] Coddling SJ, Marty N, Nazish A, et al. Dysferlin binds SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptors) and stimulates membrane fusion in a calcium-sensitive manner. *J Biol Chem*, 2016, 291: 14575-84
- [54] Turner CT, Zeglinski MR, Richardson KC, et al. Granzyme B contributes to barrier dysfunction in oxazolone-induced skin inflammation through E-cadherin and FLG cleavage. *J Invest Dermatol*, 2021, 141: 36-47
- [55] Davis TA, Loos B, Engelbrecht AM. AHNAK: the giant jack of all trades. *Cell Signal*, 2014, 26: 2683-93
- [56] Ramírez-Montiel F, Mendoza-Macías C, Andrade-Guillén S, et al. Plasma membrane damage repair is mediated by an acid sphingomyelinase in *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog*, 2019, 15: e1008016
- [57] Sreetama SC, Takano T, Nedergaard M, et al. Injured astrocytes are repaired by Synaptotagmin XI-regulated lysosome exocytosis. *Cell Death Differ*, 2016, 23: 596-607
- [58] Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol*, 2004, 14: 206-13
- [59] Leikina E, Defour A, Melikov K, et al. Annexin A1 deficiency does not affect myofiber repair but delays regeneration of injured muscles. *Sci Rep*, 2015, 5: 18246
- [60] Bittel DC, Chandra G, Tirunagri LMS, et al. Annexin A2 mediates dysferlin accumulation and muscle cell membrane repair. *Cells*, 2020, 9: 1919
- [61] Carmeille R, Bouvet F, Tan S, et al. Membrane repair of human skeletal muscle cells requires Annexin-A5. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863: 2267-79
- [62] Swaggart KA, Demonbreun AR, Vo AH, et al. Annexin A6 modifies muscular dystrophy by mediating sarcolemmal

- repair. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111: 6004-9
- [63] Demonbreun AR, Fallon KS, Oosterbaan CC, et al. Recombinant annexin A6 promotes membrane repair and protects against muscle injury. J Clin Invest, 2019, 129: 4657-70
- [64] Gerke V, Rescher U. ANO5 in membrane repair - status: "It's complicated". Cell Calcium, 2021, 97: 102415
- [65] Foltz S, Wu F, Ghazal N, et al. Sex differences in the involvement of skeletal and cardiac muscles in myopathic mice. Am J Physiol Cell Physiol, 2022, 322: C283-95
- [66] Griffin DA, Johnson RW, Whitlock JM, et al. Defective membrane fusion and repair in Anoctamin5-deficient muscular dystrophy. Hum Mol Genet, 2016, 25: 1900-11
- [67] Vallecillo-Zúniga ML, Rathgeber MF, Poulson PD, et al. Treatment with galectin-1 improves myogenic potential and membrane repair in dysferlin-deficient models. PLoS One, 2020, 15: e0238441
- [68] Cai C, Weisleder N, Ko JK, et al. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. J Biol Chem, 2009, 284: 15894-902
- [69] Han R, Campbell KP. Dysferlin and muscle membrane repair. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19: 409-16
- [70] Muriel J, Lukyanenko V, Kwiatkowski T, et al. The C2 domains of dysferlin: roles in membrane localization, Ca²⁺ signalling and sarcolemmal repair. J Physiol, 2022, 600: 1953-68
- [71] Glover L, Brown RH Jr. Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. Traffic, 2007, 8: 785-94
- [72] Usha Kalyani R, Perinbam K, Jeyanthi P, et al. Fer1L5, a dysferlin homologue present in vesicles and involved in C2C12 myoblast fusion and membrane repair. Biology (Basel), 2020, 9: 386
- [73] Kravtsova VV, Bouzinova EV, Matchkov VV, et al. Abnormal membrane localization of $\alpha 2$ isoform of Na, K-ATPase in *m. soleus* of dysferlin-deficient mice. Bull Exp Biol Med, 2019, 166: 593-7
- [74] Tominaga K, Tominaga N, Williams EO, et al. 4-Phenylbutyrate restores localization and membrane repair to human dysferlin mutations. iScience, 2022, 25: 103667
- [75] Allen DG, Gervasio OL, Yeung EW, et al. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. Can J Physiol Pharmacol, 2010, 88: 83-91
- [76] Zhou L, Middel V, Reischl M, et al. Distinct amino acid motifs carrying multiple positive charges regulate membrane targeting of dysferlin and MG53. PLoS One, 2018, 13: e0202052
- [77] Cooper ST, Head SI. Membrane injury and repair in the muscular dystrophies. Neuroscientist, 2015, 21: 653-68
- [78] Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. J Biol Chem, 2003, 278: 50466-73
- [79] Han R, Bansal D, Miyake K, et al. Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. J Clin Invest, 2007, 117: 1805-13
- [80] Lek A, Evesson FJ, Lemckert FA, et al. Calpains, cleaved mini-dysferlinC72, and L-type channels underpin calcium-dependent muscle membrane repair. J Neurosci, 2013, 33: 5085-94
- [81] Krahn M, Wein N, Bartoli M, et al. A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. Sci Transl Med, 2010, 2: 50ra69
- [82] Roostalu U, Strähle U. *In vivo* imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. Dev Cell, 2012, 22: 515-29
- [83] Raastad T, Owe SG, Paulsen G, et al. Changes in calpain activity, muscle structure, and function after eccentric exercise. Med Sci Sports Exerc, 2010, 42: 86-95
- [84] Zhang BT, Yeung SS, Allen DG, et al. Role of the calcium-calpain pathway in cytoskeletal damage after eccentric contractions. J Appl Physiol (1985), 2008, 105: 352-7
- [85] Kanzaki K, Watanabe D, Kuratani M, et al. Role of calpain in eccentric contraction-induced proteolysis of Ca²⁺-regulatory proteins and force depression in rat fast-twitch skeletal muscle. J Appl Physiol (1985), 2017, 122: 396-405
- [86] Owens DJ, Twist C, Cobley JN, et al. Exercise-induced muscle damage: what is it, what causes it and what are the nutritional solutions? Eur J Sport Sci, 2019, 19: 71-85
- [87] Pedemonte N, Galletta LJV. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins). Physiol Rev, 2014, 94: 419-59
- [88] Whitlock JM, Hartzell HC. Anoctamins/TMEM16 proteins: chloride channels flirting with lipids and extracellular vesicles. Annu Rev Physiol, 2017, 79: 119-43
- [89] Chandra G, Sreetama SC, Mázala DAG, et al. Endoplasmic reticulum maintains ion homeostasis required for plasma membrane repair. J Cell Biol, 2021, 220: 3
- [90] Sinha B, Köster D, Ruez R, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. Cell, 2011, 144: 402-13
- [91] Cai C, Weisleder N, Ko JK, et al. Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. J Biol Chem, 2009, 284: 15894-902
- [92] Schilling JM, Patel HH. Non-canonical roles for caveolin in regulation of membrane repair and mitochondria: implications for stress adaptation with age. J Physiol, 2016, 594: 4581-9
- [93] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. Physiol Rev, 2002, 82: 331-71
- [94] Boye TL, Nylandsted J. Annexins in plasma membrane repair. J Biol Chem, 2016, 291: 961-9
- [95] Simonsen AC, Boye TL, Nylandsted J. Annexins bend wound edges during plasma membrane repair. Curr Med Chem, 2020, 27: 3600-10
- [96] Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. J Biol Chem, 2003, 278: 50466-73
- [97] Gabel M, Chasserot-Golaz S. Annexin A2, an essential partner of the exocytotic process in chromaffin cells. J Neurochem, 2016, 137: 890-6

- [98] Croissant C, Carmeille R, Brévar C, et al. Annexins and membrane repair dysfunctions in muscular dystrophies. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 5276
- [99] Boye TL, Maeda K, Pezeshkian W, et al. Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nat Commun*, 2017, 8: 1623
- [100] Florentsen CD, Kamp-Sonne A, Moreno-Pescador G, et al. Annexin A4 trimers are recruited by high membrane curvatures in giant plasma membrane vesicles. *Soft Matter*, 2021, 17: 308-18
- [101] Bouter A, Gounou C, Bérat R, et al. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat Commun*, 2011, 2: 270
- [102] Lin YC, Chipot C, Scheuring S. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. *Nat Commun*, 2020, 11: 230
- [103] Cornely R, Rentero C, Enrich C, et al. Annexin A6 is an organizer of membrane microdomains to regulate receptor localization and signalling. *Iubmb Life*, 2011, 63: 1009-17
- [104] Shah A, Schiffmacher AT, Taneyhill LA. Annexin A6 controls neuronal membrane dynamics throughout chick cranial sensory gangliogenesis. *Dev Biol*, 2017, 425: 85-99
- [105] Sugimoto MA, Ribeiro ALC, Costa BRC, et al. Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1. *Blood*, 2017, 129: 2896-907
- [106] Day J, Sonnemann K, Bement W. Determining the role of annexin A6 in cell membrane repair. *FASEB J*, 2018, 32: 1
- [107] Demonbreun AR, Allen MV, Warner JL, et al. Enhanced muscular dystrophy from loss of dysferlin is accompanied by impaired annexin A6 translocation after sarcolemmal disruption. *Am J Pathol*, 2016, 186: 1610-22
- [108] Grewal T, Wason SJ, Enrich C, et al. Annexins - insights from knockout mice. *Biol Chem*, 2016, 397: 1031-53
- [109] Hannon R, Croxtall JD, Getting SJ, et al. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse. *FASEB J*, 2003, 17: 253-5
- [110] Belluoccio D, Grskovic I, Niehoff A, et al. Deficiency of annexins A5 and A6 induces complex changes in the transcriptome of growth plate cartilage but does not inhibit the induction of mineralization. *J Bone Miner Res*, 2010, 25: 141-53
- [111] 伊木清, Jianjie M. MG53——肌细胞损伤的“分子绷带”. *中国运动医学杂志*, 2012, 31: 1117-21+047
- [112] Yao W, Li H, Han X, et al. MG53 anchored by dysferlin to cell membrane reduces hepatocyte apoptosis which induced by ischaemia/reperfusion injury *in vivo* and *in vitro*. *J Cell Mol Med*, 2017, 21: 2503-13
- [113] 吴迎. MG53对运动诱导骨骼肌细胞膜损伤的修复作用研究[D]. 北京: 北京体育大学, 2016
- [114] Gumper-Fedus K, Park KH, Ma H, et al. MG53 preserves mitochondrial integrity of cardiomyocytes during ischemia reperfusion-induced oxidative stress. *Redox Biol*, 2022, 54: 102357
- [115] Han Y, Black S, Gong Z, et al. Membrane-delimited signaling and cytosolic action of MG53 preserve hepatocyte integrity during drug-induced liver injury. *J Hepatol*, 2022, 76: 558-67
- [116] Jia Y, Chen K, Lin P, et al. Treatment of acute lung injury by targeting MG53-mediated cell membrane repair. *Nat Commun*, 2014, 5: 4387
- [117] Duann P, Li H, Lin P, et al. MG53-mediated cell membrane repair protects against acute kidney injury. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 279ra36
- [118] Marg A, Schoewel V, Timmel T, et al. Sarcolemmal repair is a slow process and includes EHD2. *Traffic*, 2012, 13: 1286-94
- [119] Gordon BS, Delgado Díaz DC, Kostek MC. Resveratrol decreases inflammation and increases utrophin gene expression in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Clin Nutr*, 2013, 32: 104-11
- [120] Guillén-Samander A, Leonzino M, Hanna MG, et al. VPS13D bridges the ER to mitochondria and peroxisomes via Miro. *J Cell Biol*, 2021, 220:5
- [121] Georgiadis V, Stewart HJS, Pollard HJ, et al. Lack of galectin-1 results in defects in myoblast fusion and muscle regeneration. *Dev Dyn*, 2007, 236: 1014-24