

·基础研究·

MG53基因敲除对小鼠延迟性肌肉酸痛期骨骼肌损伤的影响*

吴 迎¹ 伊木清^{2,3} 曾凡星¹

摘要

目的:探讨MG53敲除对骨骼肌损伤的影响,研究MG53在延迟性肌肉酸痛期是否具有减轻骨骼肌膜损伤的作用。

方法:8周龄雄性C57小鼠84只,根据基因型分为两大组,野生型(WT)组和敲除型(KO)组,每一大组按照取材时间点又分为7个小组,共14组,即WT组(WC、WE0、WE2、WE12、WE24、WE48、WE72)和KO组(KC、KE0、KE2、KE12、KE24、KE48、KE72),每组6只。在离心运动后相应时间点内眦取血,脱颈处死小鼠,取左腿股直肌用于Western blot实验,右侧用于形态学观察。全自动生化分析仪检测血清肌酸激酶(CK),透射电镜观察14个组大鼠骨骼肌超微结构的变化,Western blot检测MG53蛋白水平。

结果:KE0和KE2组CK较安静组非常显著性升高($P < 0.01$),KE24和WE0组CK较安静组显著升高($P < 0.05$),同一时间点CK值相比,KE0较WE0显著升高,KE24较WE24显著升高($P < 0.05$);骨骼肌超微结构随时程变化较为明显,KO组在运动后损伤较WT组更为严重,呈现出损伤早、恢复慢的特点,KE24损伤最为严重,且KE72仍然没有恢复到安静水平;WT组MG53蛋白在运动后即刻达到峰值并显著高于安静组($P < 0.05$),在24h出现第二次升高($P < 0.05$)。

结论:离心运动后KO组小鼠骨骼肌损伤较WT组更为严重,表明MG53能够明显减轻骨骼肌在延迟性肌肉酸痛期的损伤,WT组MG53蛋白在离心运动后即刻和24h显著升高,提示其在延迟性肌肉酸痛期骨骼肌损伤的修复中发挥了重要作用。

关键词 基因敲除;延迟性肌肉酸痛;骨骼肌;损伤

中图分类号:R685 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-06-0636-07

Effects of MG53 knock-out on skeletal muscle damage of mice during delayed onset muscle damage/
WU Ying, YI Muqing, ZENG Fanxing//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(6): 636—642

Abstract

Objective: To discuss the effect of knock-out MG53 on skeletal muscle, and to determine whether MG53 can protect skeletal muscle from injury during delayed onset muscle damage(DOMS).

Method: Eighty-four eight-week old C57 mice were divided into two groups due to their gene (WT and KO), and each group were divided into 7 subgroups again. 14 groups, 6 mice in each. They were WC, WE0, WE2, WE12, WE24, WE48, WE72 and KC, KE0, KE2, KE12, KE24, KE48, KE72. At each time point after 3 days eccentric exercise, the mice were decapitated after drawing blood. The rectus femoris of left leg was used to detect the level of MG53 with Western blot, the other side were used to do electron microscope analysis. Blood CK were measured also.

Result: The CK of K0 raised remarkably and decreased gradually until W 12. But the second peak appear at W24 and decreased again gradually since then. Ultrastructural changes of skeletal muscle after eccentric exer-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.06.006

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(31371205)

1 北京体育大学运动人体科学学院,北京,100084; 2 国家体育总局运动医学研究所; 3 通讯作者
作者简介:吴迎,男,博士研究生,讲师; 收稿日期:2016-02-02

cise at different time points is obvious. The injury is worsen gradually from W0 to W24, and improved gradually from W48 to W72. Comparing with W groups, the injury in K group were even worsen an each time point. The MG53 of W0 and W24 were 16% and 11% higher than those before exercise ($p<0.05$) and restored to normal in 72 hours after exercise.

Conclusion: The injury after severe exercise is more severity in MG53 knock-out mouse than those in wild mouse. and the MG53 protein increased significantly. It suggests that MG53 may significantly relieve the skeleton muscle injury in delayed muscle sore period.

Author's address Beijing Sport University, Beijing, 100084

Key word gene knockout; delayed onset muscle damage; skeletal muscle; damage

运动所致的肌肉酸痛分为急性运动疼痛(acute soreness)和延迟性肌肉酸痛(delayed onset muscle damage, DOMS), DOMS继发于早期机械损伤,随着时间的推移,由 Ca^{2+} 超载、炎性因子增加和能量物质消耗等引起,一般运动后24—48h达到峰值,7天之内逐渐减弱或消失。DOMS产生的一个重要原因就是肌膜的损伤。

MG53是近年来发现的具有横纹肌膜修复作用的胞浆蛋白,是TRIM家族成员之一,在骨骼肌和心肌中大量表达^[1]。细胞实验研究证实MG53在微电极引起的骨骼肌细胞膜损伤修复中发挥了重要作用。用GFP-MG53转染骨骼肌细胞于活细胞影像下观察, MG53在细胞膜出现损伤后能迅速察觉,并很快聚集转运到达“事故现场”发挥修补作用,在几十秒内就能完成^[2]。那么, MG53是否在运动所致的延迟性肌肉酸痛期发挥修复作用,如果可以它又呈现出怎样的特点,在延迟性肌肉酸痛期MG53蛋白表达水平怎样,目前还没有关于以上问题的研究报道。本研究运用离心运动模型,通过对MG53 WT型(MG53^{+/+})和KO型(MG53^{-/-})小鼠在DOMS期的损伤情况进行研究,旨在明确其在DOMS期是否具有减轻骨骼肌损伤的作用,探讨其可能机制,为防治运动性骨骼肌损伤(exercise induced muscle damage, EIMD),特别是DOMS期骨骼肌损伤提供依据使其成为治疗新靶点。

1 资料与方法

1.1 实验动物与分组

实验对象:8周龄SPF级雄性C57小鼠84只,根据基因型分为两大组,野生型(WT)组和敲除型(KO)组,每一大组按照取材时间点又分为7个小

组,共14组,即WT(WC、WE0、WE2、WE12、WE24、WE48、WE72)和KO(KC、KE0、KE2、KE12、KE24、KE48、KE72)。见表1。

表1 实验动物分组

组别	MG53 ^{+/+} (WT)	MG53 ^{-/-} (KO)
安静对照	WC	KC
运动后即刻组	WE0	KE0
运动后2h组	WE2	KE2
运动后12h组	WE12	KE12
运动后24h组	WE24	KE24
运动后48h组	WE48	KE48
运动后72h组	WE72	KE72

1.2 运动方案

适应性训练:适应性运动3天,跑台坡度0°,起始时间10min,每天一次,以后每天递增5min,跑速10m/min,共进行3天。

离心运动方案:休息2天后,15°下坡跑,初始速度5m/min,1m/5min递增,至17m/min,训练时间60min。

1.3 主要试剂

肌酸激酶(creatine kinase, CK)试剂盒购自北京利德曼公司,组织裂解液和PMSF购自碧云天公司,蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂购自Roche公司,BSA购自Amresco公司,电泳预制胶、Marker购自Life Technologies公司,电泳缓冲液、转膜缓冲液及PVDF膜购自Bio-rad公司,GAPDH一抗购自Santa Cruz公司, MG53一抗由美国新泽西州罗伯特伍德强生医学院麻建杰教授提供,所有二抗购自Santa Cruz公司。

1.4 小鼠基因型鉴定

将基因鉴定后单个染色体含有MG53基因的C57小鼠,称为MG53^{+/+}小鼠,让MG53^{+/+}小鼠进行相互杂交,根据孟德尔定律,繁殖生成的小鼠中

约有20%为MG53(+/-), (MG53野生型小鼠: WT), 20%为MG53(-/-), (MG53基因敲除小鼠: KO), 还有一半为MG53(+/-)小鼠。MG53(+/-)小鼠可继续用于繁殖, 健康的MG53WT及MG53KO小鼠即作为实验动物。

基因鉴定步骤: ①取小鼠左耳组织50mg并剪碎, 加入Tail lysis buffer 350 μ l和蛋白酶K震荡混匀; ②56 $^{\circ}$ C水浴过夜, 使其充分裂解; ③加入6M NaCl, Vortex混匀, 于冰盘静置5min; ④4 $^{\circ}$ C离心15min后提取上清; ⑤将上清与无水乙醇混匀, 4 $^{\circ}$ C离心5min; ⑥倒去无水乙醇, 室温下晾干后用TE溶解(pH=8), 4 $^{\circ}$ C冰箱保存待测; ⑦PCR反应; ⑧制胶、电泳(其中一孔加入水作为对照)、卸板、固定、染色和脱色; ⑨拍照并记录编号。

1.5 组织取材

在运动后相应时间点取出小鼠内眦取血, 取血后脱颈处死小鼠, 处死后速取后肢双侧股直肌, 先用生理盐水洗净, 剔除肌腱及筋膜组织, 用干净滤纸将其吸干, 左腿股直肌置于-80 $^{\circ}$ C冰箱保存待测, 右侧用于形态学观察。

1.6 血清CK检测

Beckman Unicel DXC600全自动生化分析仪检测各组血清CK水平。

1.7 透射电镜观察骨骼肌形态结构

取材时于冰浴(冰盘)下暴露肌肉组织, 取右侧股直肌, 快速去除多余脂肪和结缔组织, 将肌腹横切成3段, 每段长约5mm, 取中间一段投入4%戊二醛(0.1mol磷酸缓冲液稀释, pH 7.2)固定, 全程采用电镜取材专用一次性手术刀片, 固定4h后, 用0.1mol磷酸缓冲液冲洗, 洗3次每次15min, 后用锇酸在4 $^{\circ}$ C条件下固定2h, 再用0.1mol磷酸缓冲液冲洗, 洗3次每次15min。随后将肌肉样本进行丙酮系列脱水, 环氧树脂包埋, 在Leicauc61型切片机上切超薄切片, 用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染液染色。JEM-1400透射电镜观察14个组骨骼肌超微结构(低倍 \times 1000, 高倍 \times 8000)。

1.8 Western blot检测骨骼肌MG53蛋白水平

常规提取并测定骨骼肌组织蛋白浓度后, 调整样品体积为10 μ l/孔, 蛋白浓度为5 μ g/孔。配制好样品后与70 $^{\circ}$ C煮样10min, 冷却至常温后用NuPAGE Novex 10% Bis-Tris凝胶电泳分离蛋白, 电泳时间

为50min。电泳结束后将蛋白采用湿转法转至PVDF膜上(恒流250mA, 120min), 5% BSA封闭1.5h, 一抗(MG53: 1: 10000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 二抗孵育1h, 加化学发光液曝光显像, 采用Quantity One软件分析条带灰度值。

1.9 统计学分析

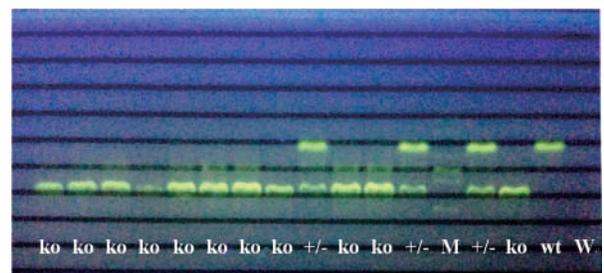
采用SPSS 13.0软件进行统计分析。实验数据以均数 \pm 标准差表示。CK值采用双因素方差分析检验交互作用, 同一时间点的比较采用独立样本T检验。WT型组MG53蛋白分析采用单因素方差分析, 采用LSD方法进行比较。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果

小鼠基因鉴定结果显示, 只有下部一条荧光条带的为KO小鼠, 只有上部一条荧光条带的为WT小鼠, 有两条荧光条带的为杂合型小鼠, 水对照组没有荧光条带。见图1。

图1 小鼠基因型鉴定结果



注: ko: 敲除型; wt: 野生型; +/-: 杂合型; M: marker; W: water

2.2 离心运动后各组血清CK变化

WT组离心运动后即刻CK较安静组显著升高($P < 0.05$), KE0、KE2 CK较安静组非常显著性升高($P < 0.01$), KE24显著性升高($P < 0.05$); 同一时间点CK值相比, KE2较WE2显著升高, KE24较WE24显著升高($P < 0.05$), CK在运动后即刻出现峰值, 且24h出现二次升高。见图2。

2.3 离心运动后透射电镜下观察骨骼肌随时程变化的损伤情况

WC组与KC组肌原纤维排列整齐, 横纹明显, 明带、暗带清晰可辨; Z线清楚、无扭曲, 两组间无明显差别。见图3。

WE0组肌原纤维排列出现轻微错位,横纹略模糊,明带和暗带可分辨,对位基本整齐,Z线基本连续模糊、少有错位。KE0组比WT型组运动后即刻超微结构变化明显,肌原纤维排列出现轻微错位,明带和暗带可分辨,但是对位不齐,部分Z线扭曲,错位较WE0更加明显。见图4。

WE2组与WE0组超微结构改变相似,肌原纤维排列出现轻微错位,横纹略模糊,明带和暗带可分辨,对位不齐,部分Z线扭曲,错位更加明显。KE2比WE2超微结构损伤更为严重,肌小节出现扭曲断裂,明带和暗带虽可分辨,但较为模糊、对位不齐,Z

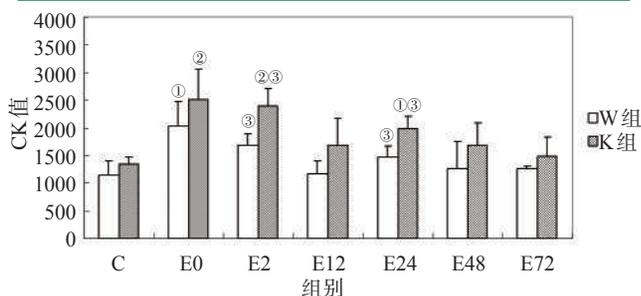
线扭曲严重,错位比WE2更加明显。见图5。

WE12组电镜可见超微结构改变程度比WE2组明显加重:肌原纤维排列紊乱,明带和暗带出现错位与断裂,Z线扭曲变形,错位明显,线粒体出现明显空泡变性。KE12组电镜观察可见骨骼肌损伤比WE12更为严重,表现为肌小节紊乱,明带和暗带出现混乱、错位与断裂,Z线扭曲变形。见图6。

WE24组可见超微结构改变程度比12h组明显加重:肌原纤维排列严重紊乱,横纹模糊不清,明带和暗带严重混乱,Z线严重扭曲变形。KE24组超微结构改变程度比WE24组明显加重,肌原纤维排列严重紊乱,横纹模糊不清,明带和暗带严重混乱,不易分辨,Z线严重扭曲变形,杂乱无章,出现了分节性断裂,没有连续性。KE24是所有组中损伤最为严重的。见图7。

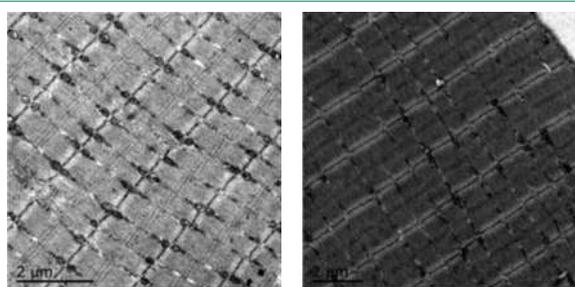
WE48组仍可见明显的肌纤维超微结构损伤,但改变程度比24h组略有减轻。表现为肌原纤维排列紊乱,横纹模糊不规则,明带和暗带可分辨,但对位不齐,Z线虽然不齐但具有连续性。KE48组仍可见明显的肌纤维超微结构损伤,但改变程度比KE24组略有减轻,仍重于WE48组。表现为肌原纤维排

图2 离心运动后各组血清CK值



组内与安静对照相比:① $P < 0.05$;② $P < 0.01$;组间同一时间点相比:③ $P < 0.05$

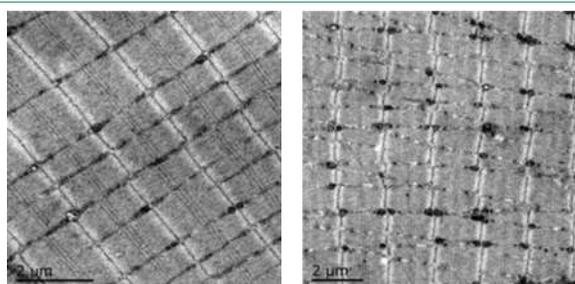
图3 安静组骨骼肌超微结构 (×1000)



WC组

KC组

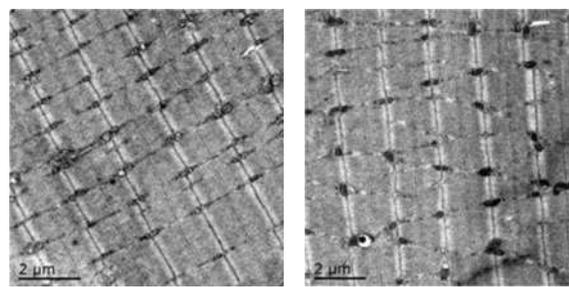
图4 离心运动后即刻组骨骼肌超微结构 (×1000)



WE0组

KE0组

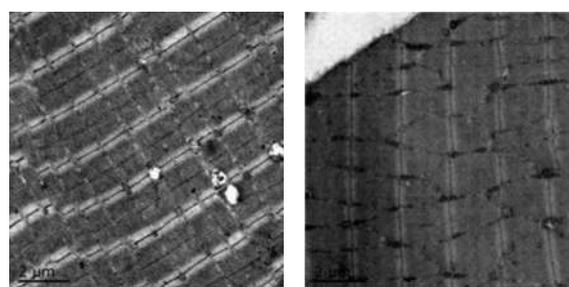
图5 离心运动后2h组骨骼肌超微结构 (×1000)



WE2组

KE2组

图6 离心运动后12h组骨骼肌超微结构 (×1000)



WE12组

KE12组

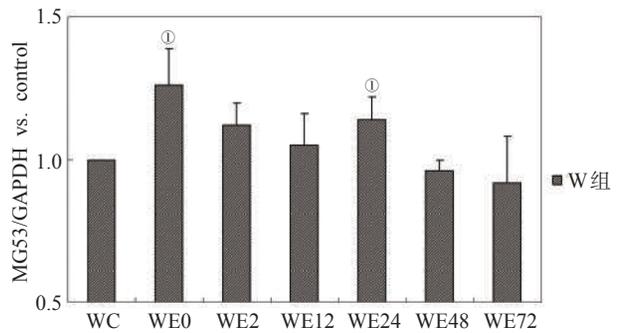
列紊乱,横纹模糊不规则,明带和暗带可分辨,但对位不齐,Z线基本恢复,具有一定连续性。见图8。

WE72组肌纤维超微结构损伤程度明显比48h组减轻,肌小节较规则,明带和暗带较清晰,Z线错位、模糊和消失等异常明显减少;少许线粒体肿胀,大部分线粒体排列整齐,形态正常且分布在Z线两侧。KE72组肌纤维超微结构损伤程度比48h组减轻,但仍较WE72组严重,肌原纤维排列较规则,明带和暗带也逐渐恢复清晰,Z线基本清晰,虽有连续性,但是仍有对位不齐。见图9。

2.4 离心运动后WT组各时间点MG53蛋白变化
在离心运动后即刻和24h,WT组MG53蛋白表

达分别比安静对照显著性增加16%和11%($P < 0.05$)。Western blot结果显示,MG53蛋白表达运动后即刻达到峰值,且在运动后24h出现二次升高,到72h基本恢复到安静水平。见图10。

图10 离心运动后WT组各时间点MG53蛋白表达



与安静对照相比:① $P < 0.05$

图7 离心运动后24h组骨骼肌超微结构 (×1000)

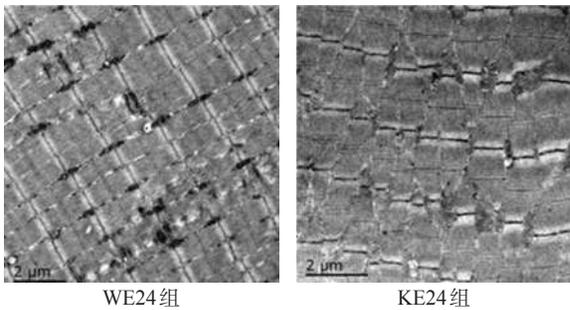


图8 离心运动后48h组骨骼肌超微结构 (×1000)

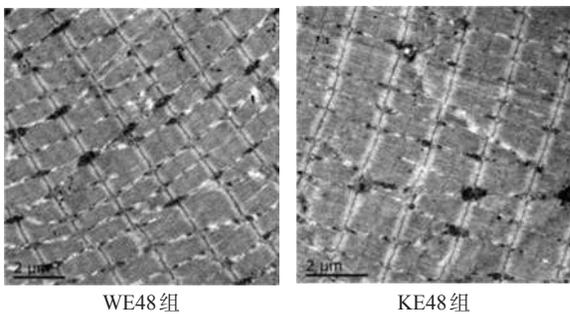
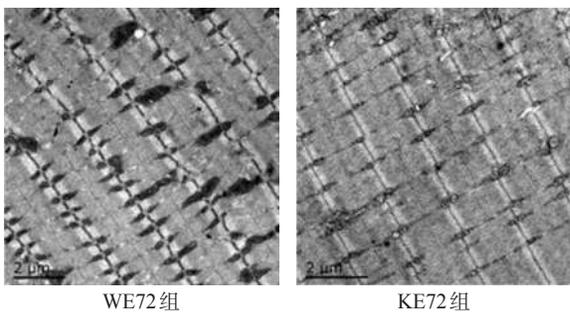


图9 离心运动后72h组骨骼肌超微结构 (×1000)



3 讨论

3.1 离心运动对骨骼肌损伤的影响

一定强度的离心运动后,骨骼肌往往伴随着延迟性肌肉酸痛的发生。许多学者提出了不同的学说试图来解释DOMS的产生机制,但到目前为止还没有哪种学说得到公认。不可否认的是,由离心运动引起的机械性牵拉是肌纤维结构改变的最直接原因,其牵拉产生的作用是两方面的:①对肌纤维膜的牵拉,离心运动比其他运动方式对肌纤维膜的牵拉更为深刻,虽然肌膜可以承受一定范围内的牵拉,但是长时间大强度离心运动所引起的肌纤维膜结构的破坏是造成DOMS主要原因之一^[3-4]。②对肌原纤维的牵拉,肌丝滑行是肌纤维收缩的基础,离心运动通过影响粗、细肌丝的正常滑动,改变骨骼肌超微结构^[5]。

本实验通过CK检测来反映运动后骨骼肌细胞膜通透性的改变,结果显示:KO组在运动后2h和24h血清CK含量显著高于WT组,说明敲除MG53后肌膜损伤更为严重。本实验通过透射电镜观察到,MG53 KO各组在离心运动后均比同一时间点WT型组损伤严重,KO组在运动后即刻(KE0)就表现出了明显的损伤:肌原纤维排列出现错位,横纹模糊,明带和暗带可分辨,但是对位不齐,部分Z线模糊,错位较WE0组更加明显,部分线粒体排列不均

匀且不规则。随后KE2和KE12组明带暗带开始模糊,肌小节发生不规则扭曲,Z线错位进一步加剧,并出现了“断层”现象。KE24是损伤最为严重的一个组,肌原纤维排列严重紊乱,横纹模糊不清,明带和暗带严重混乱,不易分辨;Z线严重扭曲变形,杂乱无章,出现了分节性断裂,没有连续性。KE48组稍微有所恢复,肌小节清晰度有所改善,Z线较为连续但仍有错位。WE72组基本恢复到正常,明带、暗带和Z线也逐渐恢复清晰,但是KE72组仍表现出一定程度损伤,恢复较为缓慢。

本实验中KO组骨骼肌超微结构在离心运动后表现出损伤早、损伤重、恢复慢的特点,损伤早主要指运动后即刻出现损伤,肌膜通透性非常显著性增高,损伤重是指各时间点观察到较WT型组更为严重的损伤,恢复慢主要是指48h—72h KO组没有恢复到安静水平,仍存在超微结构损伤,但WT组到72h基本恢复到安静水平。WT组的形态结构变化与其他学者的实验结果基本一致。Lockhart等^[6]研究发现离心运动后小鼠骨骼肌损伤最为严重的时期为24—48h,魏源^[7]研究证实,离心运动后骨骼肌组织形态结构和超微结构都发生了不同程度的变化,以运动后24—48h间最为严重,实验组运动后72h微损伤能明显修复。Li等^[8]研究发现,在MG53 WT和KO小鼠皮肤手术,制造一个长10mm、深3mm的伤口暴露肌肉,WT组小鼠伤口愈合速度在第5天至第13天明显快于KO组小鼠,到第15天两组小鼠都基本痊愈,这提示可能存在其他信号代偿性发挥了修复作用。本实验通过KO组与WT组形态学对比观察,发现MG53在DOMS期有减轻骨骼肌损伤的作用。

3.2 MG53在DOMS期对骨骼肌损伤的修复作用

肌细胞膜损伤的修复过程极其复杂,目前已深入分子水平。大量研究证实,Ca²⁺在其中发挥了重要的作用^[9-15]。研究表明,肌细胞膜损伤后,肌膜“伤口”附近胞内Ca²⁺浓度迅速增加,并调控许多蛋白参与修复工作^[11,16]。目前发现参与细胞膜损伤修复的蛋白主要有Dysferlin、Annexins、Calpain、Cav-3、MG53等^[17-18],Dysferlin是研究比较多的蛋白,研究证实其在囊泡转运融合当中发挥了重要作用^[19-22],敲除Dysferlin后肌母细胞内囊泡融合修复作用

丧失^[23-26]。MG53是近年来国内外学者关注较多的蛋白之一。内源性MG53在RNA杂交及Western blot实验中都证实是心肌和骨骼肌特异性蛋白,在其他组织中均未发现,因此,根据目前研究确定MG53只在横纹肌中存在。MG53也叫TRIM72,它的氨基端包含一个环指结构、一个锌结合基元和一个卷曲结构组成的结构域,羧基端则含有一个SPRY结构^[2]。Weisleder等^[27]通过细胞实验证实MG53在骨骼肌细胞修复中发挥了重要作用,表现出修复快、特异性强、具有氧依赖性等特点。在MG53^{-/-}细胞中转染GFP-MG53,肌管损伤后发现绿色荧光以囊泡状快速移动到“事发地点”。在心脏损伤模型的灌流液中,MG53出现和达到峰值的时间要早于肌酸激酶和肌钙蛋白,往往在几分钟内就达到峰值,其后迅速恢复。Cai等^[28]研究证实,Dysferlin是参与膜修复的重要蛋白之一,然而它需要MG53协助转运到膜损伤部位,敲除MG53后Dysferlin不能正常“修补”,并提出MG53、Dysferlin和Cav-3可能形成一个复合体共同发挥修复作用。本实验结果显示MG53蛋白表达在WE0组和WE24组显著增加,与血清CK值WE0组和WE24组的显著降低一致,提示MG53对肌膜有修复作用,并且电镜结果显示KE0组和KE24组明显比WE0组和WE24组损伤严重,这一结果也证实了MG53对骨骼肌损伤的修复作用。另一方面,在48h—72h这一炎症损伤阶段,KO组线粒体损伤更为严重,恢复较慢,肿胀及空泡化依然严重。

综上所述,离心运动后KO组小鼠骨骼肌损伤较WT组更为严重,表明MG53能够明显减轻骨骼肌在延迟性肌肉酸痛期的损伤,WT组MG53蛋白表达在离心运动后即刻和24h显著升高,提示其在延迟性肌肉酸痛期骨骼肌损伤的修复中发挥了重要作用。

参考文献

- [1] McNeil P. Membrane repair redux: redox of MG53[J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(1):7—9.
- [2] Cai C, Masumiya H, Weisleder N, et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery[J]. *Nature cell biology*, 2009, 11(1):56—64.
- [3] Mackey AL, Brandstetter S, Schjerling P, et al. Sequenced re-

- sponse of extracellular matrix deadhesion and fibrotic regulators after muscle damage is involved in protection against future injury in human skeletal muscle[J]. *FASEB J*, 2011, 25(6):1943—1959.
- [4] Lange S, Ehler E, Gautel M. From A to Z and back? Multi-compartment proteins in the sarcomere[J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(1):11—18.
- [5] Ingber DE. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2008, 97(2—3):163—179.
- [6] Lockhart NC, Brooks SV. Protection from contraction-induced injury provided to skeletal muscles of young and old mice by passive stretch is not due to a decrease in initial mechanical damage[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006, 61(6):527—533.
- [7] 魏源. 离心运动大鼠骨骼肌微损伤组织形态学变化及人参G115的干预[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(33):6470—6473.
- [8] Haichang Li, Pu Duann, Pei-Hui Lin, et al. Modulation of wound healing and scar formation by MG53 protein-mediated cell membrane repair[J]. *The journal of biological chemistry*, 2015, 290(40), 24592-24603.
- [9] McNeil PL, Kirchhausen T. An emergency response team for membrane repair[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6): 499—505.
- [10] Andrews NW, Almeida PE, Corrotte M. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair[J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(12):734—742.
- [11] Idone V, Tam C, Goss JW, et al. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis[J]. *J Cell Biol*, 2008, 180(5):905—914.
- [12] Idone V, Tam C, Andrews NW. Two-way traffic on the road to plasma membrane repair[J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(11):552—559.
- [13] Jimenez AJ, Maiuri P, Lafaurie-Janvore J, et al. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair[J]. *Science*, 2014, 343(6174):1247136.
- [14] Babiyuchuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, et al. Blebbing confers resistance against cell lysis[J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(1):80—89.
- [15] Babiyuchuk EB, Monastyrskaya K, Potez S, et al. Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(8):1126—1134.
- [16] Chakrabarti S, Kobayashi KS, Flavell RA, et al. Impaired membrane resealing and autoimmune myositis in synaptotagmin VII-deficient mice[J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(4):543—549.
- [17] Wallace GQ, McNally EM. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies [J]. *Annu Rev Physiol*, 2009, (71):37—57.
- [18] Draeger A, Schoenauer R, Atanassoff AP, et al. Dealing with damage: plasma membrane repair mechanisms[J]. *Biochimie*, 2014, (107):66—72.
- [19] Posey AD Jr, Demonbreun A, McNally EM. Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2011, (96):203—230.
- [20] Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, et al. Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(50):50466—50473.
- [21] Kesari A, Fukuda M, Knoblach S, et al. Dysferlin deficiency shows compensatory induction of Rab27A/Slp2a that may contribute to inflammatory onset[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(5):1476—1487.
- [22] Nagaraju K, Rawat R, Veszelszky E, et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B[J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(3):774—785.
- [23] Demonbreun AR, Fahrenbach JP, Deveaux K, et al. Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy[J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(4):779—789.
- [24] de Luna N, Gallardo E, Soriano M, et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro"[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(25): 17092—17098.
- [25] Humphrey GW, Mekhedov E, Blank PS, et al. GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(2):127—135.
- [26] Philippi S, Bigot A, Marg A, et al. Dysferlin-deficient immortalized human myoblasts and myotubes as a useful tool to study dysferlinopathy[J]. *PLoS Curr*, 2012, (4):RRN1298.
- [27] Weisleder N, Takizawa N, Lin P, et al. Recombinant MG53 protein modulates therapeutic cell membrane repair in treatment of muscular dystrophy[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(139):1—11.
- [28] 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]. *J Biol Chem*, 2009, 284(23):15894—15902.