



徐素宏, 浙江大学医学院“百人计划”研究员, 浙江大学医学院附属第二医院双聘教授, 浙江大学-爱丁堡大学联合学院副院长, 博士生导师。入选“国家青年人才”计划, 获浙江省高层次人才等荣誉。现担任中国动物学会发育生物学专业委员会副主任, 中国细胞生物学学会青年工作委员会委员, 中国生物物理学学会研习班结构与功能分化委员。主要从事组织损伤感应、修复和再生的分子细胞生物学机理研究。利用遗传学模式生物秀丽线虫, 建立了在体细胞膜损伤感应和修复模型, 揭示了亚细胞水平感应和修复的新模式, 发现了参与细胞膜修复的关键生物大分子及其调控机制。

<https://person.zju.edu.cn/suhongxu>

细胞膜损伤与修复——秀丽隐杆线虫中的启发

王园园¹ 孟曦男^{2,3} 徐素宏^{1,2,3*}

(¹浙江大学医学院干细胞和再生医学研究中心, 杭州 310058; ²浙江大学-爱丁堡大学联合学院, 海宁 314400;

³浙江大学医学院附属第二医院烧伤科, 杭州 310058)

摘要 细胞膜作为维持细胞内环境稳态的重要屏障, 其完整性可能会受到病原体、化学物质、辐射、炎症反应和机械应力的影响。细胞膜在损伤后的自我修复决定着受损细胞是否能够恢复功能并存活, 同时决定相应生物体组织结构和功能的正常。领域内过去的研究发现, 根据“伤害”的性质和“伤口”的大小, 细胞会启动不同的膜修复机制以恢复细胞膜结构和功能完整性。该文将总结细胞膜修复相关机制的研究现况, 重点介绍近年来利用成年秀丽隐杆线虫表皮细胞研究在体细胞膜损伤修复的成果。

关键词 细胞膜损伤修复; 修复机制; 膜修复的信号和因子; 秀丽隐杆线虫

Membrane Damage and Repair — Lessons from *C. elegans*

WANG Yuanyuan¹, MENG Xinan^{2,3}, XU Suhong^{1,2,3*}

(¹Center for Stem Cell and Regenerative Medicine, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China;

²Zhejiang University-University of Edinburgh Institute, Haining 314400, China; ³Department of Burn and Wound Repair of the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China)

Abstract The cell membrane is an important barrier for maintaining the homeostasis of the intracellular environment. The integrity of cell membrane can be affected by pathogens, chemicals, radiation, inflammatory responses, and mechanical stress. The self-healing of the cell membrane after injury determines whether cells can restore their functions for survival, and also determines whether the corresponding organism can maintain its normal structure and activity. Previous studies in the field have found that different membrane repair mechanisms are

收稿日期: 2022-06-15

接受日期: 2022-07-13

国家自然科学基金(批准号: 91754111)和科技部重点研发项目(批准号: 2021YFA1300302)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88981770, E-mail: shxu@zju.edu.cn

Received: June 15, 2022

Accepted: July 13, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91754111) and the Key Research and Development Projects of the Ministry of Science and Technology (Grant No.2021YFA1300302)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88981770, E-mail: shxu@zju.edu.cn

involved in restoring the structural and functional integrity of the cell membrane, depending on the type and size of “injury”. This review will firstly summarize the previous research findings on the mechanisms of cell membrane repair, and then focus on the recent *in vivo* studies in membrane repair by using the adult *C. elegans* epidermal cell.

Keywords membrane damage and repair; mechanism of repair; signals and factors of membrane repair; *C. elegans*

1 细胞膜损伤修复概述(induction)

从低等生物到高等生物, 所有细胞的表面都被细胞膜覆盖。细胞膜不仅是分隔细胞内外环境的屏障, 还是细胞内外物质交换和信息传递的枢纽^[1]。因此, 细胞膜的完整性对维持细胞内稳态并发挥其正常生理功能至关重要^[2]。然而, 细胞膜常因生理病理因素导致损伤。目前发现细胞膜的损伤因素主要存在以下几类。(1) 物理因素: 如运动牵拉、细胞迁移、机械压力、辐射等。(2) 化学因素: 活性氧、磷脂酶等。(3) 生物因素: 细菌穿孔毒素(pore-forming toxins, PFTs)、寄生虫感染, 甚至来自细胞内的氧化应激以及溶酶体功能异常等均可以导致细胞膜损伤^[2-4]。当细胞膜受损时, 细胞将启动修复机制恢复细胞膜的完整性, 细胞膜在损伤后的自我修复决定着受损细胞是否能够恢复功能并存活下去, 若修复延迟或者受阻则会导致细胞的死亡, 甚至相关组织的降解, 从而引发多种疾病^[2,5-6]。比如, 烧伤及钝器划伤等导致皮肤细胞膜破损而引起炎症反应、感染及疤痕的产生; 血管内皮细胞膜的损伤可导致动脉粥样硬化; 胃肠道黏膜上皮受损可引起胃炎及胃溃疡的发生; 持续高强度或不适运动可导致骨骼肌损伤; 膜修复蛋白编码基因突变也可能导致肌肉萎缩症等遗传病^[7-9]; 免疫细胞分泌的内毒素导致细胞膜损伤; 等等^[10]。因此, 精准、快速和有效的细胞膜修复是维持损伤后细胞完整性及正常生理功能的前提。

至今研究发现, 虽然细胞无法预测质膜损伤发生的时间和精确位点, 但是细胞膜修复往往发生在几秒至几分钟之内。特异性的信号转导机制以及相关分子的相互作用可帮助细胞确定质膜损伤的性质和位置, 使细胞膜受损后细胞立即作出响应。同时细胞器、蛋白质、脂类和化学小分子等均会参与并有效地协调细胞膜修复。但是人们对于细胞膜修复的时空分子调控机制仍知之甚少。因此, 探索细胞膜快速响应损伤并启动修复的机制将有助于我们清晰全面地理解膜修复, 为开发干预和治疗由各种生理病理因素所导致的细胞膜损伤并维持有关组织

整体稳态和生物个体健康的方法提供重要的理论基础。

2 细胞膜损伤修复相关机制

体外研究表明, 因为细胞膜损伤的尺寸、持久性或其他生物物理参数存在显著的差异, 所以针对不同的细胞膜损伤, 细胞可能启动不同的膜修复机制以对受损膜结构进行修复^[11](图1)。

2.1 小型伤口修复机制(伤口直径<100 nm)

2.1.1 膜自发密封 在人工膜的研究中发现, 当脂双层上形成较小的伤口时, 破裂的脂双层可以自发融合封闭, 无需蛋白质等分子的辅助^[12]。在这个过程中, 损伤膜的弯曲边缘上存在的脂质紊乱为重新封闭提供了驱动力, 膜破损边缘张力下降至最低, 进而重新融合封闭膜缺损。然而在细胞环境中, 细胞膜表面高张力则不利于超过几纳米的伤口的自发密封^[13-14]。

2.1.2 膜内化和膜出芽 通过电镜技术, 研究者发现胞内囊泡在伤口处发生快速聚集、融合和外泌^[15-18]。后来的研究发现: 无论是在受到机械损伤还是由SLO所导致的小孔损伤(伤口直径<100 nm)的哺乳动物细胞中, 都存在大量的细胞内吞过程, 而且这种内吞过程紧随 Ca^{2+} 调控的溶酶体外泌过程发生。溶酶体与质膜的融合主要依赖突触结合蛋白(如: syt-VII、syt-XI)的活性^[19]。在肌肉细胞损伤修复的情况下, 钙依赖性膜结合蛋白dysferlin也可促进溶酶体与细胞表面的连接, dysferlin可以被切割成类似于syt的分子, 促进细胞内小泡与质膜的融合^[20-21]。当细胞膜受到损伤后, Ca^{2+} 的内流会引发溶酶体的外泌, 同时溶酶体将腔体中的酸性鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase, ASM)暴露到细胞膜外侧。ASM作为一种脂酶可将质膜上的鞘磷脂(sphingomyelin)加工成神经酰胺(ceramide), 而神经酰胺可促进依赖于小窝蛋白(caveolin)介导的内吞过程, 从而将细胞膜上的伤口内吞到细胞内并转运到溶酶体中进行降解^[22]。

除了内吞作用外, SLO等成孔毒素损伤质膜后

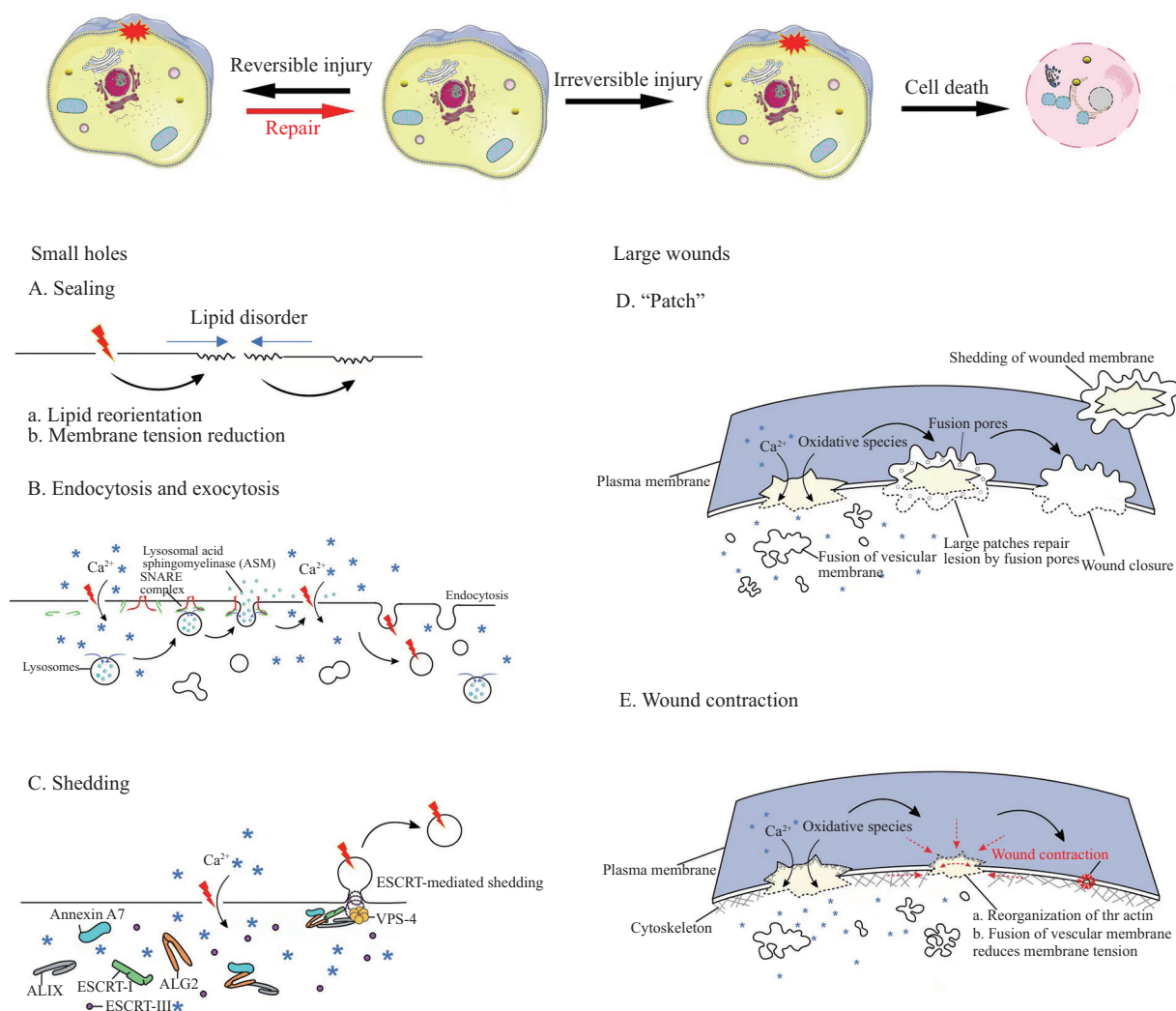


图1 细胞膜损伤后的细胞命运和细胞膜修复机制

Fig.1 The cell fate after wounding and overview of membrane repair mechanisms

的修复依赖于ESCRT(endosomal sorting complex required for transport)即转运必需内体分选复合体^[6,23]。这种质膜穿孔损伤会诱导Ca²⁺内流, 激活膜联蛋白A7(annexin A7)、钙离子结合蛋白ALG2(apoptosis-linked gene 2)及ALIX(ALG2 interacting protein X)等, 招募ESCRT-III在伤口处富集, 并与VPS-4(vacuolar protein sorting 4)共同促进受损细胞膜向胞外的出芽和脱落, 从而修复细胞膜^[24-26]。

2.2 大型伤口修复机制(伤口直径>100 nm)

2.2.1 补丁模型 当细胞膜受到较大损伤(伤口直径高达几微米)时, 损伤后Ca²⁺的内流会引起胞内囊泡聚集于细胞膜缺损之下并发生相互融合, 在膜伤口边缘以“补丁”(patch)的形式对膜进行修补, 以保证膜的完整性^[18,27-28]。然而, 为了回答“细胞内融合的大囊泡”如何恢复含有不规则伤口的脂质双层的

连续性问题, 有假说提出: 损伤形成的“膜补丁”同细胞膜受损区域多个离散点进行融合, 从而将受损的膜碎片释放^[5,14]。关于这种“顶点融合”的假说仍然存在较大争议, 多个融合点如何同时在较大伤口周围稳定存在并形成“环”, 同时去除伤口周围区域正常细胞膜的模型仍然需要更多的理论依据^[29]。

2.2.2 伤口收缩 尽管在穿孔毒素SLO导致的损伤中已经证实小窝蛋白介导的内吞参与小型伤口细胞膜修复, 但是目前尚不清楚该种膜内化作用是如何促进较大机械创伤的细胞膜修复的。有研究发现, 在机械损伤的肌纤维的肌膜下存在高度分支的细胞内囊泡轮廓, 这些内化囊泡可以通过形态变化分散膜表面张力进而参与伤口收缩的过程, 最终实现重新封闭伤口^[16,30]。细胞骨架作为真核细胞中的蛋白纤维网络结构, 在承受外力和维持细胞基本形态上

发挥至关重要的作用。当损伤发生时,细胞膜下细胞骨架立即被破坏并发生解聚,密集堆积的肌动蛋白的解聚可以为细胞内囊泡在伤口附近的聚集和融合提供相应的空间^[31]。重新环绕于损伤部位的肌动蛋白丝(F-actin)和肌球蛋白(myosin-II)在修复过程中通过其收缩帮助封闭伤口^[2,32]。在非洲爪蟾卵母细胞、果蝇胚胎细胞和秀丽隐杆线虫(以下简称线虫)表皮细胞的膜修复过程中,肌动蛋白在伤口周围形成环状结构,并通过肌动球蛋白收缩介导伤口的愈合^[11,33-35]。有研究表明ESCRT复合体也参与由物理损伤所导致的细胞膜上大型伤口(微米级别)的修复过程^[24]。对于较大的伤口,F-actin的解聚以及ESCRT的组装均有利于受损细胞膜的脱落,进而实现细胞膜修复^[36]。

3 质膜修复的信号和因子

3.1 Ca^{2+} 结合蛋白在细胞膜修复中的功能

细胞内环境的稳态离不开细胞膜的选择透过性,这种性质在特定环境下允许小分子(如水分子、二氧化碳等)进出细胞,限制大分子或极性物质(如蛋白质、金属离子等)的进出,从而保持细胞内物质成分的稳定。细胞膜破损后,细胞能够在几十秒内将受损细胞膜重新密封,恢复细胞膜的选择透过性^[37]。早期对海胆卵细胞的研究发现了在胞外 Ca^{2+} 缺失的条件下,细胞膜损伤后的修复将无法实现并最终导致细胞质渗出和细胞死亡,并且首次阐明了 Ca^{2+} 对于细胞膜修复的重要性^[38]。后续研究发现,在NRK细胞中无论是机械还是成孔毒素导致的损伤, Ca^{2+} 在膜修复中均发挥关键作用^[39]。越来越多的证据表明, Ca^{2+} 是启动膜修复的关键“信使”,损伤后胞外 Ca^{2+} 快速内流会造成细胞质中游离 Ca^{2+} 浓度迅速升高从而触发多种细胞反应,包括 Ca^{2+} 结合蛋白的响应、细胞骨架的重构以及胞内囊泡的内吞等^[5-6,14,40]。

随后的成像实验表明, Ca^{2+} 通过细胞膜缺损大量进入胞质导致局部 Ca^{2+} 浓度激增,大量 Ca^{2+} 同钙结合蛋白相结合,诱导下游相关蛋白(如膜联蛋白、钙敏感蛋白等)、细胞器或囊泡聚集在损伤部位,参与细胞膜修复。在结构上,钙结合蛋白往往含有能感知和结合 Ca^{2+} 的区域,如C2结构域或者EF-hand基序等。常见的 Ca^{2+} 结合蛋白主要有:膜联蛋白、突触结合蛋白(synaptotagmins)、dysferlin以及凋亡相关蛋白ALG2等^[3]。

膜联蛋白作为细胞内 Ca^{2+} 的感受器之一,除了

具有同磷脂结合的特性外,还可以通过调节细胞骨架重组和膜折叠来促进膜融合^[38]。在结构上,膜联蛋白含有高度保守的C-端,由四个(ANXA6含有八个)重复序列组成的ANXs核心结构域构成,同时在ANXs核心结构域上存在特有的II型 Ca^{2+} 结合位点^[41]。在不同模式生物中的研究发现,膜联蛋白能够在细胞膜损伤处发生聚集。比如,在斑马鱼肌纤维细胞中,激光损伤可以诱导AnxA6、AnxA2及AnxA1按照严格的时序性在伤口边缘处发生聚集;在小鼠的肌纤维细胞中,激光损伤同样可以招募AnxA1、AnxA2、AnxA5和AnxA6在伤口处聚集等^[42]。膜联蛋白作为 Ca^{2+} 和磷脂结合蛋白在损伤修复中的膜融合、重塑和封闭作用已经被充分证明,但是其参与膜修复的机制尚未完全清晰。目前的研究表明:膜联蛋白不仅可以通过降低膜张力来促进膜的自封闭,同时膜联蛋白也可以组装成多聚体结构来参与膜修复。比如:AnxA4可以促进受损细胞膜发生弯曲,将伤口边缘的细胞膜互相拉近,同时AnxA6诱导膜收缩,两者协同在加速伤口收缩中发挥重要作用^[43]。而AnxA5可以在富含磷脂酰丝氨酸的质膜上通过形成三聚体的方式自组装成二维的矩阵来稳定膜结构,进而促进膜修复^[44-45]。

突触结合蛋白由一个短N-端、一个跨膜结构域、一个可变连接域和两个C2结构域(C2A和C2B结构域)组成,该蛋白可以感知胞质 Ca^{2+} 并介导与细胞膜的相互作用^[1,3]。研究表明,突触结合蛋白-7可以感知损伤并导致大量内流的胞质 Ca^{2+} 通过调节膜融合蛋白SNARE复合物的形成介导膜融合,从而在膜修复中发挥重要作用^[22,46]。凋亡相关蛋白ALG2属于PEF(penta-EF-hand)蛋白家族,也能与 Ca^{2+} 结合。最近有研究发现,ALG2响应 Ca^{2+} 在伤口处发生聚集,并与ALIX共同招募ESCRT复合物在伤口处聚集,通过使受损细胞膜向外脱落介导膜修复^[24-26,47]。

跨膜蛋白dysferlin也是一类 Ca^{2+} 敏感蛋白,dysferlin位于胞质的N-端肽段,它含有七个串联的C2结构域,介导磷脂酰丝氨酸在质膜损伤部位的积累,并触发邻近巨噬细胞清除受损的膜区域^[48-49]。研究表明,当肌纤维出现损伤时,dysferlin可感知胞质高浓度 Ca^{2+} ,通过与膜联蛋白或其他膜蛋白相互作用,促进细胞内囊泡与质膜融合。Dysferlin的常染色体隐性突变会导致dysferlin蛋白功能丧失,引发肢带肢带型肌营养不良2B型(limb-girdle muscular dystrophy,

LGMD2B), 从而使受损的肌细胞膜因无法有效修复而变性或坏死^[20]。

3.2 SNARE家族蛋白促进膜融合

前期研究结果发现, 膜修复同时涉及膜融合过程, 包括胞内囊泡之间及其与细胞膜之间的融合。在20世纪80年代末, 首次发现可溶性*N*-乙基马来酰亚胺敏感的融合蛋白附着蛋白受体(soluble *N*-ethyl-maleimide-sensitive factor attachment protein receptors, SNAREs)参与的膜融合现象^[50]。越来越多的研究发现, SNAREs家族蛋白的关键作用是特异性识别并介导运输小泡与靶膜的融合, 该作用涉及细胞生长、膜修复和突触传递等多个生理过程。SNAREs参与膜融合的核心由三种相互作用的蛋白构成: 突触融合蛋白(syntaxin, SYX)、可溶性NSF附着蛋白(soluble NSF attachment proteins, SNAPs)和囊泡相关膜蛋白(vesicle-associated membrane proteins, VAMPs)^[51]。根据其蛋白定位和功能, SNAREs蛋白也可分为两大类, 位于运输囊泡上的v-SNAREs(vesicle membrane SNAREs)和位于靶膜上的t-SNAREs(target membrane SNAREs)。v-SNAREs和t-SNAREs都具有一个螺旋结构域^[52], 其能从氨基端(NH₂ terminus)到羧基端(COOH terminus)以拉链的方式相互缠绕形成跨SNAREs复合体(trans-SNAREs complexes), 并通过该结构将运输小泡的膜与靶膜缔合在一起, 实现运输小泡特异性对接和融合^[3,51,53]。SNAREs复合体是稳定的四螺旋束结构, ATP水解酶NSF能使其解聚, 从而循环利用SNAREs组分^[54]。在海胆卵、胚胎以及哺乳动物Swiss 3T3细胞上利用蛋白酶梭菌神经毒素(clostridial neurotoxins)特异性地抑制SNAREs蛋白可以有效阻碍膜修复^[3]。近期在秀丽隐杆线虫中的一项研究工作也证实了SNAREs家族蛋白成员之一SYX-2(syntaxin-2)可能通过介导膜融合的方式参与在体膜修复^[36]。

3.3 ESCRT-III蛋白在膜断裂和封闭中的作用

ESCRT蛋白复合体是真核细胞介导多囊泡小体(multi-vesicular body, MVB)形成的分子机器, 同时还参与蛋白降解、细胞分裂、病毒出芽、细胞自噬、细胞膜修复及核膜重塑等多种生物学过程^[23]。2014年, JIMENEZ等^[47]在HeLa细胞中证实了ESCRT系统在细胞膜小伤口修复过程中的重要作用。他们利用活体成像发现多种损伤方式均可导致ESCRT家族相关蛋白在伤口处发生快速的聚集。利用扫描电镜他

们观察到损伤区域ESCRT-III标记的细胞出芽, 揭示了ESCRT-III以膜出芽的方式实现小伤口的膜修复。也有研究发现, ESCRT系统还可以通过介导MVB的形成来参与细胞膜修复, 最终内吞的PFTs、源于细胞膜表面的蛋白质及膜脂质等可在溶酶体中被降解或通过胞吐被重新利用^[55]。近期的一项工作发现: ESCRT介导的小伤口细胞膜修复机制可以帮助癌细胞逃避细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)的致命攻击, 而抑制ESCRT通路能够提高CTL对癌细胞的杀伤力, 这为肿瘤免疫治疗提供了一种潜在思路^[10]。存在一系列研究发现, ESCRT-III在局部大伤口中也发挥重要作用。当细胞膜受到损伤时, Ca²⁺大量内流, 膜联蛋白A7在伤口处发生聚集并锚定在受损的细胞膜上, 与Ca²⁺感应蛋白ALG2相互作用。ALG2促进ALIX、ESCRT-III和VPS-4复合物在受损细胞膜上积累, 进而导致细胞膜受损部分分裂和脱落^[24-25]。近期的研究发现, 无论是针刺(伤口尺寸为5~10 μm)还是激光(伤口尺寸为1~3 μm)损伤线虫表皮细胞膜均会导致VPS-32.1(ESCRT-III组分)以及VPS-4(AAA+ATP水解酶)向伤口处快速聚集, 并且特异性敲降皮肤中这两种蛋白的表达可以显著地抑制下游膜修复蛋白表皮融合蛋白1(epithelial fusion failure 1, EFF-1)和SYX-2在伤口处的富集^[36]。

3.4 四次跨膜蛋白(tetraspanins)在质膜损伤修复中的作用

四跨膜蛋白(tetraspanins)是一类高度保守的四次跨膜蛋白家族, 普遍存在于从酵母到人类的真核生物中, 在哺乳动物中有33种, 在果蝇中有37种, 在秀丽隐杆线虫中有21种^[56-58]。在结构上, 四次跨膜蛋白(20~50 kDa)由胞内N和C末端肽链, EC1(小)和EC2(大)细胞外环, 四个跨膜(TMs)区域以及TM2和TM3之间的胞内环组成^[56-57,59-60]。其跨膜结构域常含有极性氨基酸(比如天冬酰胺、谷氨酸和谷氨酰胺)残基, 这些极性残基可以彼此或同其他氨基酸残基形成强的氢键, 从而稳定跨膜结构域(TM)的三级结构^[60]。C末端胞质尾可以同细胞骨架蛋白以及胞质内信号蛋白进行结合。EC2包含一个保守区域, 参与同源二聚化作用, 以及一个可变区, 在伴侣蛋白的筛选中起关键作用。此外, 可变序列还包含一个保守的“GCC motif”以及高度保守的半胱氨酸残基, 其间形成的二硫键是维持EC2结构所必需的^[56]。

四跨膜蛋白被称为质膜“主要组织者”, 其常以

同源二聚体或异源二聚体的形式互相作用,同时招募多种其他蛋白质及脂类分子,包括黏附分子、受体、酶、信号分子、胆固醇及鞘磷脂等,共同在膜上形成动态的功能性结构域(tetraspanin enriched microdomain, TEM)^[61],在迁移体形成、细胞迁移、侵袭、细胞黏附、信号转导、血管形态发生及重塑、病毒感染和肿瘤发生等过程中发挥关键作用^[56-59,61-65]。早期的研究表明,突变或RNAi敲降*tsp-15*功能会导致秀丽隐杆线虫表皮细胞膜完整性丧失并伴随着水泡的表型。因此,TSP-15作为线虫tetraspanin家族蛋白成员之一,是维持质膜完整性所必需的^[66]。近期体内的研究表明,TSP-15不仅在成年线虫表皮中表达,而且能够对针刺、激光、单线氧化学损伤、遗传突变所导致的损伤等多种细胞膜损伤方式作出响应,并在伤口处发生明显聚集。TSP-15向伤口处的聚集受到RAB-5、VPS-32.1和VPS-4的调控。同时,TSP-15的聚集能够进一步招募重要的膜修复蛋白SYX-2富集于细胞膜缺损处,从而帮助细胞膜修复确保损伤后膜结构的完整性^[67]。在体外实验结果中发现,当细胞膜受到激光、去污剂、细胞焦亡和自然杀伤细胞引起的损伤后,Tspan4会迅速地在伤口边缘处富集并进一步组装形成微米级宏结构域(TEM),以较大刚性的类环状结构限制伤口的进一步扩张,以实现膜损伤的有效修复,从而保证细胞生存^[68]。

4 线虫表皮细胞介绍及膜修复研究

4.1 线虫及其表皮细胞简介

尽管在海胆卵细胞、非洲爪蟾卵细胞、斑马鱼、果蝇胚胎及小鼠等模型中对细胞膜修复的过程和机制已经有很多基础性的发现^[69-70],但是目前缺少体内简易可重复的、高通量的实验体系用于细胞膜修复的研究^[11]。线虫作为模式生物其主要的优势是:(1) 体型小,饲喂简单,生命周期短;(2) 雌雄同体自交繁衍、后代数量大,便于基因编辑;(3) 通体透明便于活体成像;(4) 遗传学背景强大,便于进行正向或反向遗传学筛选等^[71-72]。此外,成年线虫的表皮细胞hyp7是由139个表皮细胞在发育过程中融合而成的^[73],本质上来说是一个巨大的单细胞。尽管结构上线虫表皮与高等动物有所不同,但在响应损伤和修复过程中相似,包括先天免疫系统的激活及伤口重塑以恢复细胞膜选择渗透性屏障的作用^[35,74-75]。因此,线虫hyp7可以成为活体内研究损伤响应和单细胞膜修复

良好的生物模型^[74]。

4.2 线虫表皮细胞膜损伤修复研究

越来越多的研究利用线虫强大的遗传学优势和便捷、快速、高分辨率的活体显微成像技术,在细胞膜损伤早期应激、信号转导以及伤口快速愈合等方面作了很多工作^[76-78]。

4.2.1 Ca^{2+} 信号在线虫表皮膜修复中的功能 线虫表皮细胞如何感知损伤并启动下游反应来完成修复呢?研究者利用一种 Ca^{2+} sensor “GCaMP3”来追踪线虫表皮内 Ca^{2+} 的传播^[35]。在对线虫表皮细胞进行针刺或者激光损伤的研究中发现,损伤会引起细胞质中 Ca^{2+} 浓度的快速上升。RNAi筛选结果发现,细胞膜上的 Ca^{2+} 通道基因*glt-2*(TRPM通道)或内质网膜上的ITR-1(IP3受体)均显著抑制受伤后 Ca^{2+} 的表达,表明细胞外源以及细胞内储存的 Ca^{2+} 均有助于损伤后细胞质 Ca^{2+} 含量的升高。进一步的基因鉴定发现,Gaq EGL-30及其效应子PLC- β EGL-8是表皮 Ca^{2+} 信号转导所必需的,并且是通过ITR-1来发挥作用的^[35]。

4.2.2 表皮细胞膜损伤诱导的先天免疫反应 在自然环境中,线虫经常会遭到皮肤穿透性病原体带来的损伤。比如圆锥掘氏梅里霉(*Drechmeria coniospora*)能够产生黏附在线虫角质层上的入侵孢子,穿透线虫角质层并将菌丝延伸到表皮细胞中,从而对表皮细胞造成损伤^[79]。此类真菌侵染所造成的损伤会特异性诱导大量抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)的产生,包括依赖p38 MAPK通路的类神经肽和依赖于TGF- β 通路的caenacin^[46]。同样,针刺或激光导致的线虫表皮损伤同样也可以激活线虫表皮细胞的免疫反应,并诱导依赖于p38 MAPK通路的抗菌肽表达。相对于野生型线虫,在p38 MAPK突变体中,损伤表皮可以有效地降低线虫存活率^[80]。在线虫中,损伤表皮会触发免疫反应和修复反应,但尚不清楚这两者是如何协调的。近期一项工作表明,微管动力学协调了损伤修复所需的细胞骨架变化以及伴随激活的先天免疫。损伤线虫表皮细胞会招募微管和末端结合蛋白EB1/EBP-2在伤口周围的募集和肌动蛋白环的形成,而且微管动力学是肌动蛋白环募集和闭合以及免疫反应关键信号蛋白SLC6/SNF-12向损伤部位运输所必需的^[81]。

4.2.3 表皮损伤引起肌动蛋白丝(F-actin)聚集,促进伤口愈合 同其他模式生物类似,线虫表皮细胞的损伤会引起肌动蛋白在伤口处的快速聚集,形成围

绕在伤口处的肌动蛋白环(actin ring), 肌动蛋白环的形成是线虫损伤后修复和生存所必需的^[36]。同样, 在其他模式生物(比如果蝇胚胎、非洲爪蟾卵母细胞)中, 质膜损伤会促进肌动球蛋白索(actomyosin cables)的形成, 以“purse-string”的方式来闭合伤口^[82]。然而, 与果蝇胚胎损伤中形成的肌动球蛋白索不同, 线虫肌动蛋白环由Rho GTP水解酶CDC-42和Arp2/3蛋白复合体成分ARX-2所依赖的肌动蛋白直接聚合(direct actin polymerization)在伤口处的形成, 受到Rho GTP水解酶(RHO-1)以及非肌肉肌球蛋白NMY-1/2(non-muscle myosin-1/2, NMY-1/2)的负调控^[35]。H₂O₂在此过程中也会影响CDC-42的活性^[83]。损伤引起H₂O₂局部瞬时爆发式浓度增加, 而H₂O₂通过调控CDC-42的聚集来招募下游WSP-1(WASP homolog 1)以促进以肌动蛋白多聚化为基础的伤口愈合^[83]。同时, 研究表明, 蛋白激酶DAPK-1点突变不仅可以使表皮抗菌肽(AMPs)的表达水平升高, 而且可以加速肌动蛋白环的形成及角质层的生成^[84]。利用Ca²⁺螯合剂BAPTA-AM以及*gtl-2*突变体的实验发现损伤所诱导的抗菌肽(AMPs)表达不受影响, 而肌动蛋白多聚化受到显著抑制, 这表明损伤诱导的抗菌肽(AMPs)表达水平升高等先天免疫反应可能对Ca²⁺信号不敏感, 而肌动蛋白多聚化受Ca²⁺信号的调控^[35]。

4.2.4 损伤诱导线粒体ROS(mtROS)水平升高及片段化 线粒体除了作为细胞内能量生成的关键细胞器外, 还可以通过改变自身形态、Ca²⁺稳态、自噬、自由基产生、能量代谢等来参与一系列生命活动。2014年研究者发现线虫表皮损伤可显著地诱导损伤周围区域线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)超氧化物传感器mito::cpYFP的激活, 表明损伤后线粒体中产生的mtROS水平升高^[75]。mtROS水平的升高依赖于线粒体膜Ca²⁺通道MCU-1介导的线粒体Ca²⁺摄入。随后研究发现成纤维细胞、骨骼肌细胞的损伤均会导致细胞内mtROS水平的升高^[75]。

研究发现, 含量升高的mtROS可以通过调控RHO-1的氧化还原敏感基序(redoxsensitive motif)抑制其Rho GTP水解酶活性, 从而促进伤口处肌动蛋白环的形成并加速伤口愈合^[85]。但由于mtROS的强氧化性质, 过量的mtROS可能会导致细胞产生氧化应激, 从而抑制正常的损伤修复过程。因此活性氧通常会转化为更稳定的分子(如H₂O₂), 以维持体内

正常的mtROS水平^[75]。为了响应外界环境变化, 线粒体可以迅速地调整自身形态。研究表明, 无论是激光还是针刺损伤线虫表皮细胞均可以引起邻近损伤处的细胞内线粒体片段化, 直至损伤24小时线粒体形态才会重新恢复网络化^[86]。进一步通过全基因组测序结果发现, 线粒体片段化会诱导CYP450s基因表达上调, 从而增加mtROS水平。随后有研究发现钙敏感的Rho GTP水解酶MIRO-1能够调控损伤后线粒体形态, 为探究损伤诱导线粒体片段化的分子机制提供了新的思路^[86]。

4.2.5 膜融合蛋白在膜修复中的作用 细胞膜修复过程复杂, 需要多种膜修复蛋白协同参与, 并根据损伤特性时序性实现精准的定位并发挥功能。为了系统性地研究线虫表皮细胞hyp7膜修复机制, 研究者利用单线虫RNA测序进行损伤后转录组学分析, 发现线虫表皮细胞损伤后大量细胞膜相关基因表达上调, 其中参与线虫早期胚胎发育时膜融合蛋白编码基因*eff-1*和介导细胞内囊泡与细胞质膜融合的SNAREs蛋白syntaxin-2的编码基因*syx-2*等表达水平均显著提高^[36](图2)。EFF-1不仅能够介导线虫胚胎发育时期细胞间的融合, 而且能够在激光损伤轴突膜上富集并介导受损膜的融合^[87]。线虫表皮细胞膜损伤会引起SYX-2和EFF-1先后在伤口处聚集, 这是膜修复和线虫损伤后存活所必需的^[77-88]。随后实验发现, SYX-2和EFF-1在伤口处的富集受到肌动蛋白和转运必需内体分选复合体ESCRT III的调控; 而且SYX-2与EFF-1的C-端发生互作, 促进EFF-1在损伤细胞膜上的聚集, 最终共同完成细胞膜修复过程以恢复细胞膜结构完整性^[36]。

5 总结与展望

及时且完美的膜修复是保障受损细胞甚至组织恢复正常功能的前提。探索细胞膜修复的分子机制对于治疗损伤引发的相关疾病具有重要的指导意义。比如开发骨骼肌细胞膜修复的治疗手段将有可能使因高强度运动等原因导致的骨骼肌损伤的患者恢复运动能力; 开发神经细胞修复的治疗手段可以有效减少患者感知和运动上的障碍。因此, 在创伤治愈科研领域的未来中, 细胞膜修复的机制研究必然会被相关基础和临床医学科研工作者所关注。

随着显微成像、基因工程、分子生物学和细胞生物学等领域内技术的发展, 科学家对细胞膜感

结构, 是否与高等动物的瘢痕在成分和形成机制上类似, 是否可以在线虫中深入对这种结构的成分和形成的机制进行探究, 探明以上问题, 从而发现线虫同高等动物或人类瘢痕的异同点。研究者逐渐意识到, 借助线虫结构简单、强大的遗传筛选优势和活体成像的便利性, 可以使探索如瘢痕的形成等这些可能需要多种组织细胞参与的生物学过程的机制变得更有可能性, 从而为今后研究相关科学问题并研发治疗相关疾病的技术提供新的思路。

——致谢

至此尤为感谢导师徐素宏在整个写作过程的悉心指导及博士后孟曦男的认真修改, 同时也感谢实验室各位成员的热情帮助。

参考文献 (References)

- [1] ZHEN Y, RADULOVIC M, VIETRI M, et al. Sealing holes in cellular membranes [J]. *EMBO J*, 2021, 40(7): e106922.
- [2] AMMENDOLIA D A, BEMENT W M, BRUMELL J H. Plasma membrane integrity: implications for health and disease [J]. *BMC Biol*, 2021, 19(1): 71.
- [3] COOPER S T, MCNEIL P L. Membrane repair: mechanisms and pathophysiology [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(4): 1205-40.
- [4] ANDREWS N W, PEREZ F. The plasma membrane repair shop: fixing the damage [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 45: 1.
- [5] ANDREWS N W, ALMEIDA P E, CORROTTE M. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(12): 734-42.
- [6] ANDREWS N W, CORROTTE M. Plasma membrane repair [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R392-7.
- [7] MCNEIL P L, KHAKEE R. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage [J]. *Am J Pathol*, 1992, 140(5): 1097-109.
- [8] MACINTYRE D L, REID W D, MCKENZIE D C. Delayed muscle soreness. The inflammatory response to muscle injury and its clinical implications [J]. *Sports Med*, 1995, 20(1): 24-40.
- [9] MCNEIL P L. Cellular and molecular adaptations to injurious mechanical stress [J]. *Trends Cell Biol*, 1993, 3(9): 302-7.
- [10] RITTER A T, SHTENGEL G, XU C S, et al. ESCRT-mediated membrane repair protects tumor-derived cells against T cell attack [J]. *Science*, 2022, 376(6591): 377-82.
- [11] TANG S K Y, MARSHALL W F. Self-repairing cells: how single cells heal membrane ruptures and restore lost structures [J]. *Science*, 2017, 356(6342): 1022-5.
- [12] GOZEN I, DOMMERSNES P. Pore dynamics in lipid membranes [J]. *Eur Phys J Spec Top*, 2014, 223(9): 1813-29.
- [13] HOFFMAN J F. On red blood cells, hemolysis and resealed ghosts [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1992, 326: 1-15.
- [14] MCNEIL P L, KIRCHHAUSEN T. An emergency response team for membrane repair [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6): 499-505.
- [15] IDONE V, TAM C, GOSS J W, et al. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca^{2+} -dependent endocytosis [J]. *J Cell Biol*, 2008, 180(5): 905-14.
- [16] CORROTTE M, ALMEIDA P E, TAM C, et al. Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers [J]. *eLife*, 2013, 2: e00926.
- [17] BI G Q, ALDERTON J M, STEINHARDT R A. Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing [J]. *J Cell Biol*, 1995, 131(6): 1747-58.
- [18] MCNEIL P L, VOGEL S S, MIYAKE K, et al. Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113(11): 1891-902.
- [19] SREETAMA S C, TAKANO T, NEDERGAARD M, et al. Injured astrocytes are repaired by Synaptotagmin XI-regulated lysosome exocytosis [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(4): 596-607.
- [20] BANSAL D, MIYAKE K, VOGEL S S, et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy [J]. *Nature*, 2003, 423(6936): 168-72.
- [21] REDPATH G M I, WOOLGER N, PIPER A K, et al. Calpain cleavage within dysferlin exon 40a releases a synaptotagmin-like module for membrane repair [J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(19): 3037-48.
- [22] REDDY A, CALER E V, ANDREWS N W. Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes [J]. *Cell*, 2001, 106(2): 157-69.
- [23] VIETRI M, RADULOVIC M, STENMARK H. The many functions of ESCRTs [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(1): 25-42.
- [24] SCHEFFER L L, SREETAMA S C, SHARMA N, et al. Mechanism of Ca^{2+} -triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5646.
- [25] SØNDER S L, BOYE T L, TÖLLE R, et al. Annexin A7 is required for ESCRT III-mediated plasma membrane repair [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 6726.
- [26] KATOH K, SUZUKI H, TERASAWA Y, et al. The penta-EF-hand protein ALG-2 interacts directly with the ESCRT-I component TSG101, and Ca^{2+} -dependently co-localizes to aberrant endosomes with dominant-negative AAA ATPase SKD1/Vps4B [J]. *Biochem J*, 2005, 391(Pt 3): 677-85.
- [27] TERASAKI M, MIYAKE K, MCNEIL P L. Large plasma membrane disruptions are rapidly resealed by Ca^{2+} -dependent vesicle-vesicle fusion events [J]. *J Cell Biol*, 1997, 139(1): 63-74.
- [28] MIYAKE K, MCNEIL P L. Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption [J]. *J Cell Biol*, 1995, 131(6): 1737-45.
- [29] TAM C, IDONE V, DEVLIN C, et al. Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair [J]. *J Cell Biol*, 2010, 189(6): 1027-38.
- [30] SINHA B, KOSTER D, RUEZ R, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae [J]. *Cell*, 2011, 144(3): 402-13.
- [31] BENINK H A, BEMENT W M. Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds [J]. *J Cell Biol*, 2005, 168(3): 429-39.
- [32] NAKAMURA M, DOMINGUEZ A N M, DECKER J R, et al. Into the breach: how cells cope with wounds [J]. *Open Biol*, 2018, 8(10): 180135.
- [33] MANDATO C A, BEMENT W M. Contraction and polymeriza-

- tion cooperate to assemble and close actomyosin rings around *Xenopus* oocyte wounds [J]. *J Cell Biol*, 2001, 154(4): 785-97.
- [34] ABREU-BLANCO M T, VERBOON J M, PARKHURST S M. Cell wound repair in *Drosophila* occurs through three distinct phases of membrane and cytoskeletal remodeling [J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(3): 455-64.
- [35] XU S, CHISHOLM A D. A Gq - Ca^{2+} signaling pathway promotes actin-mediated epidermal wound closure in *C. elegans* [J]. *Curr Biol*, 2011, 21(23): 1960-7.
- [36] MENG X, YANG Q, YU X, et al. Actin polymerization and ESCRT trigger recruitment of the fusogens Syntaxin-2 and EFF-1 to promote membrane repair in *C. elegans* [J]. *Dev Cell*, 2020, 54(5): 624-38, e625.
- [37] BLAZEK A D, PALEO B J, WEISLEDER N. Plasma membrane repair: a central process for maintaining cellular homeostasis [J]. *Physiology*, 2015, 30(6): 438-48.
- [38] BOUCHER E, MANDATO C A. Plasma membrane and cytoskeleton dynamics during single-cell wound healing [J]. *Mol Cell Res*, 2015, 1853(10): 2649-61.
- [39] CORROTTE M, CASTRO-GOMES T, KOUSHIK A B, et al. Approaches for plasma membrane wounding and assessment of lysosome-mediated repair responses [J]. *Methods Cell Biol*, 2015, 126: 139-58.
- [40] MOE A M, GOLDING A E, BEMENT W M. Cell healing: calcium, repair and regeneration [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 45: 10-5.
- [41] GERKE V, MOSS S E. Annexins: from structure to function [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 331-71.
- [42] ROOSTALU U, STRAHLE U. *In vivo* imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma [J]. *Dev Cell*, 2012, 22(3): 515-29.
- [43] BOYE T L, MAEDA K, PEZESHKIAN W, et al. Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1623.
- [44] BOUTER A, GOUNOU C, BERAT R, et al. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair [J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 270.
- [45] LIN Y C, CHIPOT C, SCHEURING S. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 230.
- [46] RAO S K, HUYNH C, PROUX-GILLARDEAUX V, et al. Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(19): 204719.
- [47] JIMENEZ A J, MAIURI P, LAFAURIE-JANVORE J, et al. ESCRT machinery is required for plasma membrane repair [J]. *Science*, 2014, 343(6174): 986.
- [48] VAINZOF M, ANDERSON L V B, MCNALLY E M, et al. Dysferlin protein analysis in limb-girdle muscular dystrophies [J]. *J Mol Neurosci*, 2001, 17(1): 71-80.
- [49] MIDDEL V, ZHOU L, TAKAMIYA M, et al. Dysferlin-mediated phosphatidylserine sorting engages macrophages in sarcolemma repair [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12875.
- [50] JAHN R, SCHELLER R H. SNAREs: engines for membrane fusion [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 631-43.
- [51] WEIS W I, SCHELLER R H. Membrane fusion-SNARE the rod, coil the complex [J]. *Nature*, 1998, 395(6700): 328-9.
- [52] RIZO J, ROSENMUND C. Synaptic vesicle fusion [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15(7): 665-74.
- [53] JAHN R, SCHELLER R H. SNAREs-engines for membrane fusion [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(9): 631-43.
- [54] YOON T Y, MUNSON M. SNARE complex assembly and disassembly [J]. *Curr Biol*, 2018, 28(8): R397-R401.
- [55] CORROTTE M, FERNANDES M C, TAM C, et al. Toxin pores endocytosed during plasma membrane repair traffic into the lumen of mvbs for degradation [J]. *Traffic*, 2012, 13(3): 483-94.
- [56] HEMLER M E. Specific tetraspanin functions [J]. *J Cell Biol*, 2001, 155(7): 1103-7.
- [57] CHARRIN S, JOUANNET S, BOUCHEIX C, et al. Tetraspanins at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2014, 127(17): 3641-8.
- [58] LIU Z Y, SHI H R, NZESSI A K, et al. Tetraspanins TSP-12 and TSP-14 function redundantly to regulate the trafficking of the type II BMP receptor in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(6): 2968-77.
- [59] HEMLER M E. Tetraspanin functions and associated microdomains [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(10): 801-11.
- [60] STIPP C S, KOLESNIKOVA T V, HEMLER M E. Functional domains in tetraspanin proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2003, 28(2): 106-12.
- [61] YANEZ-MO M, BARREIRO O, GORDON-ALONSO M, et al. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes [J]. *Trends Cell Biol*, 2009, 19(9): 434-46.
- [62] ANDREU Z, YANEZ-MO M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 442.
- [63] TERMINI C M, GILLETTE J M. Tetraspanins function as regulators of cellular signaling [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2017, 5: 34.
- [64] SAIZ M L, ROCHA-PERUGINI V, SANCHEZ-MADRID F. Tetraspanins as organizers of antigen-presenting cell function [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1074.
- [65] HUANG Y W, ZUCKER B, ZHANG S J, et al. Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(8): 991.
- [66] MORIBE H, YOCHIM J, YAMADA H, et al. Tetraspanin protein (TSP-15) integrity is required for epidermal integrity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(22): 5209-20.
- [67] WANG Y, YANG Q, MENG X, et al. Recruitment of tetraspanin TSP-15 to epidermal wounds promotes plasma membrane repair in *C. elegans* [J]. *Dev Cell*, 2022, 57(13): 1630-42, e4.
- [68] HUANG Y, ZHANG X, WANG H W, et al. Assembly of Tetraspanin-enriched macrodomains contains membrane damage to facilitate repair [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(6): 825-32.
- [69] BEMENT W M, MANDATO C A, KIRSCH M N. Wound-induced assembly and closure of an actomyosin purse string in *Xenopus* oocytes [J]. *Curr Biol*, 1999, 9(11): 579-87.
- [70] MCNEIL P L, MIYAKE K, VOGEL S S. The endomembrane requirement for cell surface repair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(8): 4592-7.
- [71] CHISHOLM A D, HSIAO T I. The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. I: development, patterning, and growth [J]. *Wires Dev Biol*, 2012, 1(6): 861-78.
- [72] CHISHOLM A D, XU S H. The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles [J]. *Wires Dev Biol*, 2012, 1(6): 879-902.
- [73] MOHLER W A, SIMSKE J S, WILLIAMS-MASSON E M, et al. Dynamics and ultrastructure of developmental cell fusions

- in the *Caenorhabditis elegans* hypodermis [J]. *Curr Biol*, 1998, 8(19): 1087-90.
- [74] CHISHOLM A D. Epidermal wound healing in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Adv Wound Care*, 2015, 4(4): 264-71.
- [75] XU S H, CHISHOLM A D. *C. elegans* epidermal wounding induces a mitochondrial ROS burst that promotes wound repair [J]. *Dev Cell*, 2014, 31(1): 48-60.
- [76] XU S H, CHISHOLM A D. Methods for skin wounding and assays for wound responses in *C. elegans* [J]. *J Vis Exp*, 2014, 3(94): 51959.
- [77] WIJAYA C S, MENG X, YANG Q, et al. protocol to induce wounding and measure membrane repair in *Caenorhabditis elegans* epidermis [J]. *STAR Protoc*, 2020, 1(3): 100175.
- [78] CHUANG M, HSIAO T I, TONG A, et al. DAPK interacts with Patronin and the microtubule cytoskeleton in epidermal development and wound repair [J]. *eLife*, 2016, 5: e15833.
- [79] JANSSEN H B. Adhesion of conidia of *drechmeria-coniospora* to *Caenorhabditis elegans* wild-type and mutants [J]. *J Nematol*, 1994, 26(4): 430-5.
- [80] PUJOL N, CYPOWYJ S, ZIEGLER K, et al. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis [J]. *Curr Biol*, 2008, 18(7): 481-9.
- [81] TAFFONI C, OMI S, HUBER C, et al. Microtubule plus-end dynamics link wound repair to the innate immune response [J]. *eLife*, 2020, 9: e45047.
- [82] WOOD W, JACINTO A, GROSE R, et al. Wound healing recapitulates morphogenesis in *Drosophila embryos* [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(11): 907-12.
- [83] XU J X, MENG X A, YANG Q X, et al. Redox-sensitive CDC-42 clustering promotes wound closure in *C. elegans* [J]. *Cell Rep*, 2021, 37(8): 110040.
- [84] TONG A, LYNN G, NGO V, et al. Negative regulation of *Caenorhabditis elegans* epidermal damage responses by death-associated protein kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(5): 1457-61.
- [85] HORN A, VAN DER MEULEN J H, DEFOUR A, et al. Mitochondrial redox signaling enables repair of injured skeletal muscle cells [J]. *Sci Signal*, 2017, 10(495): eaaj1978.
- [86] FU H Y, ZHOU H D, YU X H, et al. Wounding triggers MIRO-1 dependent mitochondrial fragmentation that accelerates epidermal wound closure through oxidative signaling [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1050.
- [87] BASU A, DEY S, PURI D, et al. let-7 miRNA controls CED-7 homotypic adhesion and EFF-1-mediated axonal self-fusion to restore touch sensation following injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(47): E10206-15.
- [88] TRAN S L, PUHAR A, NGO-CAMUS M, et al. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of *Bacillus cereus* [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e22876.
- [89] MASCHARAK S, DESJARDINS-PARK H E, LONGAKER M T. Fibroblast heterogeneity in wound healing: hurdles to clinical translation [J]. *Trends Mol Med*, 2020, 26(12): 1101-6.
- [90] CORREA-GALLEGOS D, JIANG D S, CHRIST S, et al. Patch repair of deep wounds by mobilized fascia [J]. *Nature*, 2019, 576(7786): 287.
- [91] MASCHARAK S, DESJARDINS-PARK H E, DAVITT M F, et al. Preventing Engrailed-1 activation in fibroblasts yields wound regeneration without scarring [J]. *Science*, 2021, 372(6540): 362.