

盘基网柄菌细胞黏附分子*cadA*/DdCAD-1在细胞分化及细胞命运决定中的作用

杨春霞 侯连生*

(华东师范大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 盘基网柄菌细胞黏附分子DdCAD-1是在细胞发育过程中最先表达的黏附分子, 为了研究DdCAD-1在盘基网柄菌细胞发育中的作用, 将*cadA*基因的突变株*cadA*⁻细胞用中性红染料染色, 发育成的蛞蝓体显示*cadA*⁻细胞的前柄细胞/前孢子细胞的分化出现明显的障碍, 外源表达的重组蛋白His₆-DdCAD-1与*cadA*⁻细胞作用一段时间后, 这种现象得到了改善。另外, *cadA*⁻细胞的孢子产率也有所降低, 外源重组蛋白也可以拯救该表现型。表达DdCAD-1的细胞与*cadA*⁻细胞共同发育所形成的嵌合体显示表达DdCAD-1的细胞占据在拔顶期结构的顶端及尾部, 而这些结构都在非孢子区, 最终会死亡。提示DdCAD-1对于细胞分化及细胞命运决定有重要意义。

关键词 细胞黏附分子; DdCAD-1; 细胞分化; 细胞命运决定

Dictyostelium discoideum Cell Adhesion Molecule *cadA*/DdCAD-1 Plays An Important Role in Cell Differentiation and Cell Fate Determination

Yang Chunxia, Hou Liansheng*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract Cell adhesion molecule *cadA*/DdCAD-1 is the first expressed adhesion molecule during the development of *Dictyostelium discoideum*, to investigate the role of DdCAD-1 in *D. discoideum* development, *cadA* mutant strain *cadA*⁻ cells were colored by Natural Red, slug structure show obviously aberrant cell differentiation. Exogenous recombinant protein His₆-DdCAD-1 rescued this phenomenon. Additionally, recombinant protein can also rescue the decreasing spore yield of *cadA*⁻ cells. When DdCAD-1 expressed cells were mixed with *cadA*⁻ cells, DdCAD-1 expressed cells occupied the tips and posterior region of the chimeric culmination structures, which do not belong to spore area and would die eventually. All these results suggest that DdCAD-1 plays a crucial role in cell differentiation and cell fate determination.

Key words cell adhesion molecule; DdCAD-1; cell differentiation; cell fate determination

引言

盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)是一种简单的真核微生物, 属于原生动物群。在营养丰富、有细菌为食物的土壤中, 以普通的单细胞形式

存在并以二分裂方式生长繁殖; 当食物耗尽时, 一群单细胞(10⁵)便会慢慢聚集在一起开始多细胞发育, 最终发育成一个由细长的柄支撑着孢子囊的多细胞结构。盘基网柄菌的整个过程可分为四个阶段: 细胞聚集(aggregation)阶段, 当食物耗尽时, 饥饿细胞便开始分泌cAMP, 使附近的细胞以细胞流样结构向cAMP中心移动; 细胞丘(mound)阶段, 细胞流向cAMP中心移动到一定程度之后, 在中心处聚集, 形成小山丘一样的细胞丘结构; 细胞到达细胞丘之

收稿日期: 2012-11-02 接受日期: 2012-11-26

国家自然科学基金(批准号: 30970316)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

Received: November 2, 2012 Accepted: November 26, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.30970316)

*Corresponding author. Tel: +86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

后,分布在细胞丘边缘的细胞不断向上延伸,在细胞丘顶端形成突起(tip),突起继续向上发育到一定高度后倒向基质,形成蛞蝓体(slug);蛞蝓体在迁移到一定程度后,其后端的前孢子细胞慢慢向前上方拔顶(culmination),最终形成孢子囊,蛞蝓体前方的前柄细胞则顺着前孢子区的一根“柄管”向下移动,最终发育成柄,支撑着孢子囊,形成子实体(fruiting body)。盘基网柄菌的发育过程历时时间短而且相对简单,这些年来,已经成为研究细胞-细胞黏附、细胞信号转导很好的模式生物^[1]。

在盘基网柄菌多细胞发育过程中,细胞表达几种不同类型的细胞黏附分子(cell adhesion molecules, CAMs)。早期盘基网柄菌的细胞黏附位点被分为两大类:EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸)敏感型和EDTA耐受型。EDTA是Ca²⁺和Mg²⁺螯合剂,其中EDTA敏感型黏附位点由Ca²⁺依赖的细胞黏附分子DdCAD-1介导;EDTA耐受型细胞黏附位点也就是Ca²⁺/Mg²⁺不依赖型结合位点由gp80(*csA*)^[2]和gp150(*tgrCI*)所介导^[3]。DdCAD-1由*cadA*基因编码,在细胞发育的起始表达。gp80由*csA*基因在细胞聚集的起始期表达,并在聚集的中期达到最大值^[4],当细胞到达松散的聚集状态之后,便开始表达另一种细胞黏附分子gp150,在盘基网柄菌的整个发育过程中,细胞黏附分子通过其特殊的表达方式及相互作用,共同调节着盘基网柄菌的生命过程^[5]。

DdCAD-1(*D. discoideum* calcium-dependent cell adhesion molecule-1)虽然是一个连接在细胞膜上的黏附分子,但是它并不含有信号肽或者跨膜结构域^[6]。它首先是在细胞质内合成,是一个可溶性蛋白,然后再被伸缩泡转移至细胞膜上^[7]。DdCAD-1作为一种分泌蛋白,本身并不会停留在细胞膜上,但使用DdCAD-1的抗体及荧光二抗,可以看到细胞表面会形成绿色荧光的帽子结构,即成帽现象(capping),说明DdCAD-1是通过细胞膜上的某种蛋白,结合于细胞膜上,行使其细胞黏附功能的。核磁共振分析DdCAD-1的结构显示,DdCAD-1包括两个结构域:N-端和C-端,两个结构域之间由一个短的肽段连接^[8]。N-端结构域有着同源结合的功能,C-端结构域负责将DdCAD-1结合在细胞膜上^[9]。Wong等^[10]用同源重组的方法突变了*cadA*基因,尽管*cadA*细胞可以完成盘基网柄菌的整个发育周期并最终形成子实体,

但是其发育过程的形态却发生了很大的改变。例如,*cadA*细胞形成的聚集体表面有指节状突起或者是一些长形的手指状结构,*cadA*最终发育成的子实体有着比野生型细胞更长的柄、更大的基盘以及更小的孢子囊,而且*cadA*在蛞蝓体阶段的细胞分化也出现了异常^[10]。

本文用*cadA*基因的突变株*cadA*细胞为实验材料,观察到了*cadA*细胞的分化异常及孢子产率降低,并且用外源表达的His₆-DdCAD-1与*cadA*细胞相互作用之后,拯救了*cadA*细胞分化异常及产率降低的现象。将表达DdCAD-1的细胞*cadA*(-631::*cadA-gfp*)与*cadA*细胞混合发育后,形成的拔顶期嵌合体结构显示,表达DdCAD-1的绿色细胞占据在拔顶期结构的顶端及尾部,而这些结构都在非孢子区,最终会死亡;*cadA*细胞则占据孢子区存活下来,说明表达DdCAD-1的细胞表现出一种“无私”的利他主义的行为,为了种群利益牺牲自己。这些现象都说明了DdCAD-1在盘基网柄菌的多细胞发育中特别是细胞分化和细胞命运决定着至关重要的作用。

1 材料与方法

1.1 菌株及细胞培养

盘基网柄菌实验室培养采用*Klebsiella aerogeno*细菌喂养法。*cadA*细胞是由野生型细胞KAx-3通过同源重组的方法突变获得^[10]。*cadA*(-631::*cadA-gfp*)是由631启动子连接的含有*cadA*和*gfp*基因的质粒转入*cadA*细胞,由于631启动子是盘基网柄菌的内源性启动子,所以该转化株相当于*cadA*细胞的拯救型细胞株。

对数期细胞的大量繁殖及收集首先需要接种细胞。在每个SM固体培养板上加入约300 μL的*Klebsiella aerogeno*菌液,将大约10个孢子与菌液混在一起,用无菌的三角玻璃推棒将孢子与菌液混和涂布至整个培养皿。平板置于24 °C恒温培养箱中正面放置培养。约44~48 h后,细胞会长至对数期。然后用平头铲轻轻刮取细胞(微显红色)悬浮于预冷的1/60 mol/L的PB缓冲液中,吹打细胞团。4 °C下冷冻离心机500×g离心10 min,弃上清,反复多次洗去细菌,直至上清液无色为止。

1.2 His₆-DdCAD-1蛋白的表达与纯化

1.2.1 His₆-DdCAD-1蛋白的表达 挑取已转化好的His₆-DdCAD-1/BL21(DE3)克隆^[7]至2 mL LB培养

基中, 37 °C、250 r/min摇过夜。次日取1 mL菌液加入100 mL LB中, 37 °C、250 r/min过夜扩大培养。将200 mL菌液加入1 L LB+IPTG(0.1%), 室温摇床上过夜诱导His₆-DdCAD-1表达。次日将所有的菌液离心, 去上清, 沉淀于-20 °C保存备用(LB用前加Ampicillin至100 mg/mL)。

1.2.2 His₆-DdCAD-1蛋白的纯化 将上一步骤中所得的沉淀加入lysis buffer(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L咪唑)及蛋白酶抑制剂cocktail, 放置冰上不断摇晃使其溶化。超声破碎细胞后离心留上清。上清中加入1 mL Ni-NTA琼脂糖珠子混匀, 在4 °C冷室中轻轻摇晃1 h。离心去上清, 留珠子备用。将珠子转进一次性聚丙烯酰胺交联柱, 用wash buffer(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L咪唑)洗3次, 每次10 mL, 再用500 μL Elution Buffer(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L咪唑)将蛋白洗脱出来并收集。纯化后的蛋白用PD-10 Desalting系统(GE Healthcare Life Science. CA)脱盐之后用BCA蛋白浓度测定试剂盒(Thermo Fisher Scientific Inc.)测其蛋白浓度。

1.3 中性红染色酸性前柄细胞

收集对数期生长的*cadA*细胞, 加入1 mL中性红染料(Sigma-Aldrich), 并加入磷酸缓冲液使最终体积达到10 mL。轻微摇动管子, 室温染色5 min。225×g离心3 min, 去除上清, 并用磷酸缓冲液洗细胞直至上清只有很淡的粉红色为止, 重悬细胞使其浓度为2.5×10⁸/mL。用微量移液器将100 μL细胞液在琼脂板上铺成一条5 cm的直线。将琼脂板放入湿盒中, 用锡箔纸覆盖, 在未覆盖锡箔纸的那一方开一盏白炽灯, 使蛞蝓体向一个方向运动, 这样便更容易测量蛞蝓体的长度。细胞发育至蛞蝓体之后, 用倒置显微镜观察并测量其前柄细胞在整个蛞蝓体中所占的比值。His₆-DdCAD-1蛋白拯救*cadA*细胞分化的实验则需要在染色前进行, 将收集到的对数期细胞用磷酸缓冲液稀释到2×10⁷/mL, 在摇床上220 r/min, 室温发育4 h之后, 加入不同浓度的外源His₆-DdCAD-1蛋白, 与*cadA*细胞在摇床上再孵育半小时。

1.4 细胞的孢子产率

收集的对数期细胞, 以2×10⁸/mL的浓度悬浮在PDF缓冲液中, 将500 μL细胞悬液滴加在琼脂板正中央, 轻轻铺匀成一个直径为4 cm的圆, 琼脂板放入湿盒中, 24 °C培养使其发育到子实体后, 用含

0.1% SDS的磷酸缓冲液收集并吹打子实体, 此时, 子实体的孢子囊便会在SDS的作用下破碎而将孢子释放出来。用血球计数板计数孢子数量, 孢子数量与原始细胞数量的比值即是孢子产率。同样, His₆-DdCAD-1蛋白的拯救实验在发育前按1.3中的方法进行。

1.5 固体琼脂板上的嵌合体发育及共聚焦显微镜的观察

收集对数期*cadA*⁻(-631::*cadA-gfp*)细胞和*cadA*⁻细胞, 将15% *cadA*⁻(-631::*cadA-gfp*)绿色细胞和85%无色*cadA*⁻细胞以5×10⁷/mL浓度混合在一起, 在琼脂糖板上做发育。待细胞发育到拔顶阶段, 用Carl Zeiss LSM 510共聚焦显微镜观察活体细胞的子实体发育情况。

2 结果

2.1 His₆-DdCAD-1蛋白的表达与纯化

实验结果显示, 用Elution buffer洗脱出来的目的蛋白, His₆-DdCAD-1相对较纯而且量也较大, 将浓度较高的1、2、3管收集在一起并测量其蛋白浓度, 经测量, His₆-DdCAD-1的最终浓度为4.83 mg/mL。

2.2 中性红染料染色显示*cadA*细胞的前柄细胞和前孢子细胞的分化出现障碍

中性红染料是一种碱性吩嗪染料, 它可以染色前柄细胞中的酸性溶酶体小泡, 从而使前柄细胞显深红色, 而前孢子细胞中的酸性溶酶体相对较少, 经过染色之后也只能显示浅红色。因此, 中性红染料可以反应出细胞分化状态。从图2A中可以看出, 野

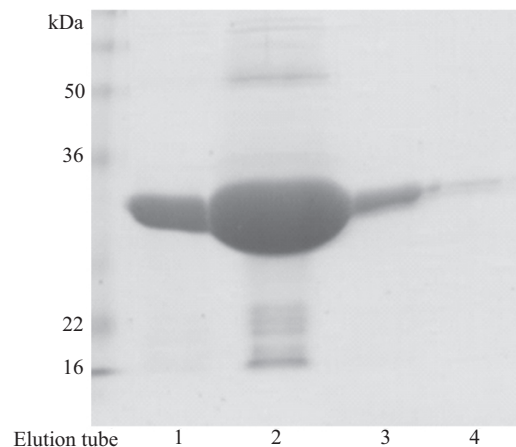


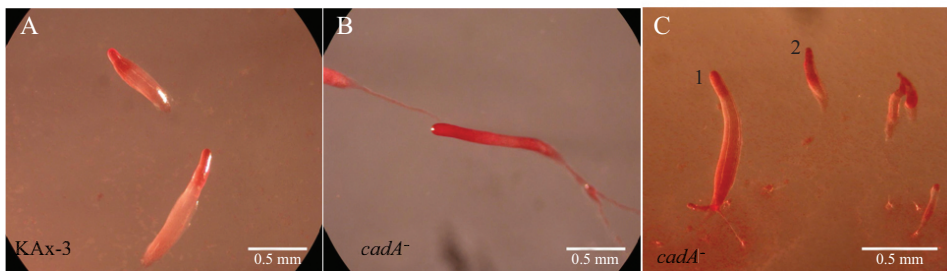
图1 His₆-DdCAD-1蛋白的表达与纯化
Fig.1 Expression and purification of His₆-DdCAD-1

生型细胞的前柄细胞和前孢子细胞分化较为正常, 红色的前柄细胞占整个蛞蝓体的比例为1/3至1/4, 而突变型的*cadA*细胞其深红色前柄细胞几乎弥漫于整个蛞蝓体(图2B), 或者存在于前后两端(图2C1), 还有的占整个蛞蝓体的3/4(图2C2)。

2.3 外源表达的重组His₆-DdCAD-1蛋白拯救*cadA*细胞分化表现型

研究证实, DdCAD-1在细胞发育4 h左右在细胞膜的表达量最高^[6,11], 因此, 我们把发育4 h的*cadA*细胞与外源表达的重组His₆-DdCAD-1孵育一段

时间, 来验证*cadA*细胞的蛞蝓体分化异常是否由DdCAD-1的缺失导致。当外源的His₆-DdCAD-1与*cadA*细胞共同孵育一段时间以后, 缓冲液洗去多余的蛋白, 收集*cadA*细胞, 用DdCAD-1抗体做Western blot检测*cadA*细胞, 结果显示, 外源的DdCAD-1蛋白已经连接在*cadA*细胞膜上(图3)。将已经连接上His₆-DdCAD-1蛋白的*cadA*细胞用中性红染色然后在琼脂板上发育, 显微镜观察显示, 用不同浓度的外源DdCAD-1作用于*cadA*细胞后, *cadA*细胞分化表现出接近野生型细胞的分化状态(图4)。

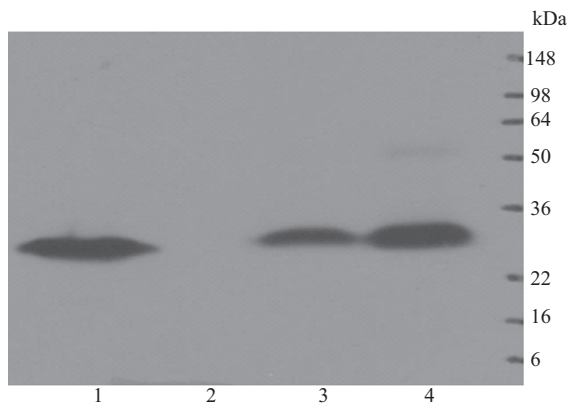


A: 在野生型KAx-3细胞中, 红色前柄细胞占整个蛞蝓体的1/3至1/4左右; B、C: *cadA*细胞出现分化异常, 红色细胞占据蛞蝓体的前后端或弥散于整个蛞蝓体。

A: in wide type KAx-3 cells, red prestalk cells occupied 1/3 to 1/4 of the slug; B,C: *cadA* cells show abnormal differentiation pattern. Red cells distributed at anterior and posterior region or scattered in whole slug.

图2 野生型KAx-3细胞和突变型*cadA*细胞分化情况

Fig.2 Differentiation pattern of wide type KAx-3 cells and mutant strain *cadA* cells



*cadA*细胞与外源表达的His₆-DdCAD-1孵育后, 用DdCAD-1抗体检测*cadA*细胞膜上结合的DdCAD-1量。泳道1: KAx-3细胞; 泳道2: *cadA*细胞; 泳道3: *cadA*细胞+1 mg/mL His₆-DdCAD-1; 泳道4: *cadA*细胞+2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1。

After incubating *cadA* cells with His₆-DdCAD-1, the amount of His₆-DdCAD-1 bound on *cadA* cell membrane was detected by DdCAD-1 antibody. Lane 1: KAx-3; Lane 2: *cadA* cells; Lane 3: *cadA* cells + 1 mg/mL His₆-DdCAD-1; Lane 4: *cadA* cells + 2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1.

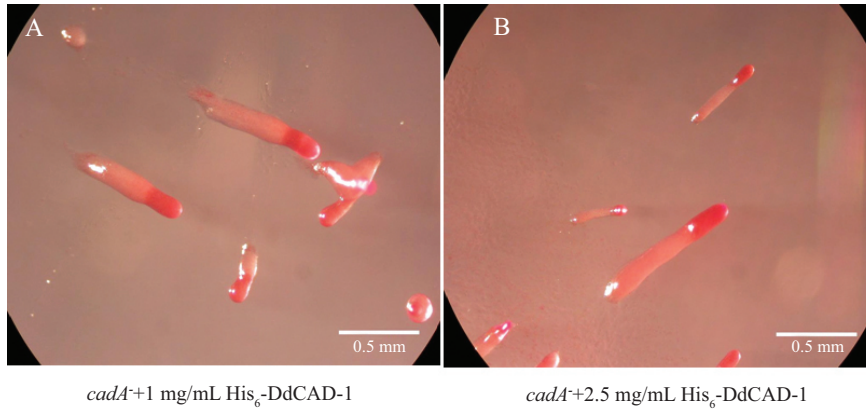
图3 外源His₆-DdCAD-1可以连接在*cadA*细胞上

Fig.3 Exogenous His₆-DdCAD-1 can bind to *cadA* cells

最后将各种类型(野生型、突变性、外源蛋白拯救型)细胞蛞蝓体时的照片经过Image J软件处理, 分别测量其前柄细胞的长度x及蛞蝓体全长y, $R=x/y$ 即表示前柄细胞在整个蛞蝓体中所占的比值, 结果为大于200个蛞蝓体的R值统计结果(图5, 如果深红色的前柄细胞几乎弥漫于整个蛞蝓体, 或者占据蛞蝓体前后两端, 说明细胞没有分化, R用0.9表示)。从结果可以很明显看出, 野生型细胞分化正常($R=1/3$)的占75%, 突变型则只有30%, 经过外源DdCAD-1蛋白处理之后, 分化正常的蛞蝓体已经达到了50%~70%。

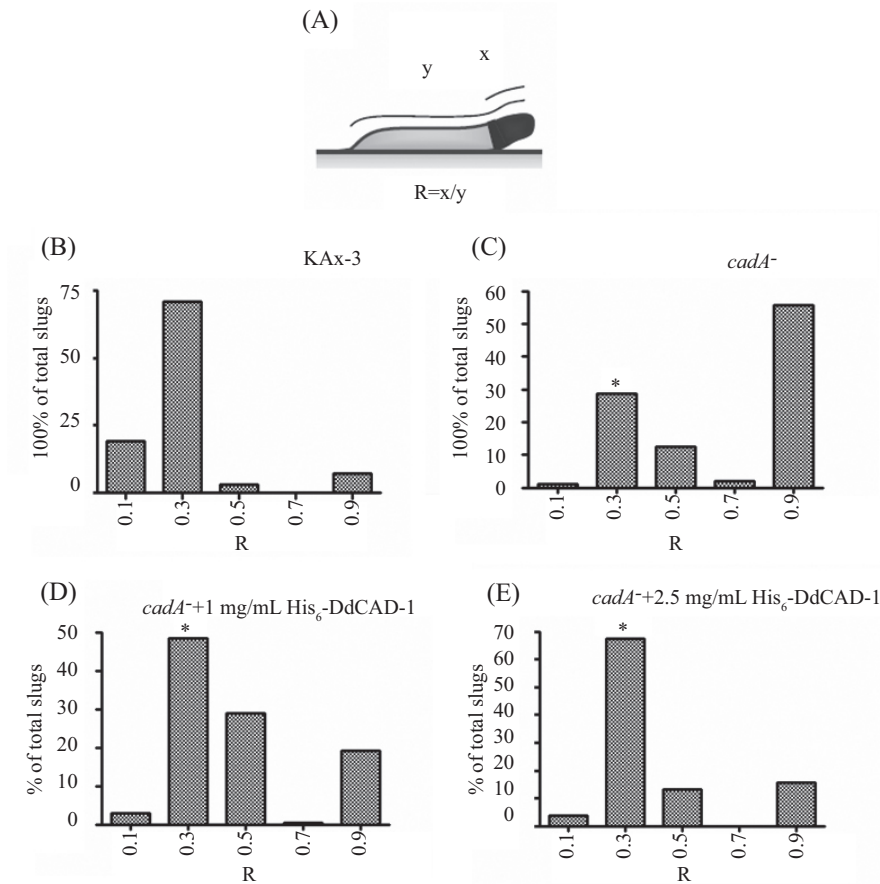
2.4 外源表达的重组His₆-DdCAD-1蛋白拯救*cadA*细胞的孢子产率

之前的研究发现, 盘基网柄菌细胞被敲除黏附分子DdCAD-1之后, 不但其分化出现异常, 而且其最终产生的孢子数量也出现下降^[10], 因此, 我们也用外源表达的His₆-DdCAD-1检测其能否拯救*cadA*细胞的孢子产率。结果发现, 当*cadA*细胞用His₆-DdCAD-1



A: *cadA*⁺细胞用1mg/mL His₆-DdCAD-1孵育后蛞蝓体分化情况; B: *cadA*⁺细胞用 2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1孵育后蛞蝓体分化情况。
A: slug differentiation pattern in *cadA*⁺ cells with 1 mg/mL His₆-DdCAD-1; B: slug differentiation pattern in *cadA*⁺ cells with 2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1.

图4 外源His₆-DdCAD-1蛋白拯救*cadA*⁻细胞的分化状态
Fig.4 Exogenous His₆-DdCAD-1 rescued *cadA*⁻ cells differentiation pattern



Image软件分析野生型KAx-3细胞, *cadA*⁻细胞, 以及外源His₆-DdCAD-1蛋白拯救*cadA*⁻细胞的蛞蝓体分化情况。A: 前柄细胞占整个蛞蝓体长度的比值R表示蛞蝓体分化情况; B: KAx-3细胞; C: *cadA*⁻细胞; D: *cadA*⁻细胞+1 mg/mL His₆-DdCAD-1; E: *cadA*⁻细胞+2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1(*n*>200, *t* test, **P*<0.01)。

Image J software measured and calculated the differentiation pattern in slugs of KAx-3 cells, *cadA*⁻ cells and His₆-DdCAD-1 rescued *cadA*⁻ cells. A: slug differentiation pattern was represented by R value; B: KAx-3 cells; C: *cadA*⁻ cells; D: *cadA*⁻ cells + 1 mg/mL His₆-DdCAD-1; E: *cadA*⁻ cells + 2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1(*n*>200, *t* test, **P*<0.01).

图5 各种细胞分化结果统计图表
Fig.5 Statistical results of cells' differentiation pattern

处理之后, *cadA* 细胞的孢子产率确实有所提升(图6)。

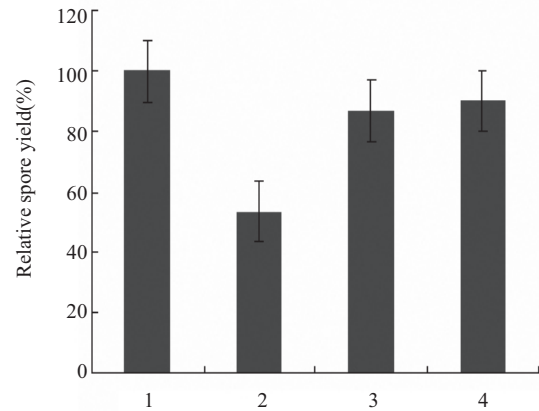
2.5 表达DdCAD-1的GFP细胞与*cadA*细胞的嵌合体发育

为了进一步了解黏附分子DdCAD-1的特性, 我们将表达DdCAD-1-GFP的绿色细胞*cadA*⁻(-631::*cadA-gfp*)与*cadA*细胞混合在一起做嵌合体发育, 然后用激光共聚焦显微镜观察两种细胞在嵌合体发育中的分布情况。结果(图7)显示, 表达DdCAD-1的细胞大多存在于拔顶期结构的顶端及尾部的基盘中, 这些结构都是由前柄细胞发育形成的, 最终死亡, 中间黑色区域的*cadA*细胞将发育成孢子细胞存活下来, 说明DdCAD-1与细胞发育的命运决定有一定的关系。

3 讨论

3.1 盘基网柄菌细胞分化理论

细胞黏附分子介导的细胞-细胞间相互作用是细胞发育过程中非常重要的过程, 许多研究已经证明了黏附分子是重要的形态调控分子以及调节细胞行为如细胞分化等其他重要的生物过程的信号分子^[12]。当盘基网柄菌细胞发育到蛞蝓体时, 出现了明显的细胞分化, 前1/4是前柄细胞(红色), 后3/4是前孢子细胞(蓝色)。当细胞继续发育成子实体时, 前柄细胞最终发育成柄死亡, 前孢子细胞最后发育成孢子而存活下

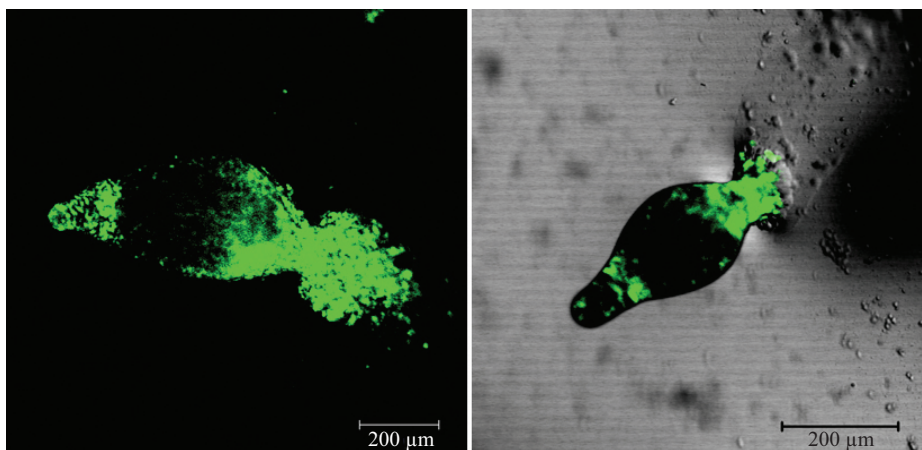


外源His₆-DdCAD-1蛋白与*cadA*细胞共同孵育, 在细胞发育完成, 形成成熟子实体后, 收集并释放孢子, 将最后发育成的孢子数和原来细胞总数的比值作为孢子产率, 以KAX-3的孢子产率为标准, 计算其他细胞相对于KAX-3细胞的孢子产率。1: KAX-3细胞; 2: *cadA*细胞; 3: *cadA*细胞+1 mg/mL His₆-DdCAD-1; 4: *cadA*细胞+2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1。结果为6组数据的平均值。

Incubate *cadA*⁻ cells with His₆-DdCAD-1 protein, collected and released spores when cells finished the developmental cycle and formed fruiting bodies, compared to KAX-3, the relative spore yield was measured by calculating the ratio of spores number to total cell number before development. 1: KAX-3 cells; 2: *cadA*⁻ cells; 3: *cadA*⁻ cells + 1 mg/mL His₆-DdCAD-1; 4: *cadA*⁻ cells + 2.5 mg/mL His₆-DdCAD-1. Data represent the mean ± S.D., n=6.

图6 外源His₆-DdCAD-1拯救*cadA*细胞的相对孢子产率

Fig.6 Exogenous His₆-DdCAD-1 rescue relative spore yield of *cadA* cells



15% *cadA*⁻(-631::*cadA-gfp*)与85% *cadA*细胞共同发育形成的嵌合体, 绿色部分是表达DdCAD-1-GFP的*cadA*⁻(-631::*cadA-gfp*)细胞, 黑色区域为*cadA*细胞。

Chimeras were developed by 15% *cadA*⁻(-631::*cadA-gfp*) cells and 85% *cadA* cells, green part represents *cadA*⁻(-631::*cadA-gfp*) cells expressed DdCAD-1-GFP and black area represents *cadA*⁻ cells.

图7 表达DdCAD-1的绿色细胞占据在拔顶期嵌合体的顶端及尾部

Fig.7 DdCAD-1 expressed green cells occupied the tip and posterior region of culmination structure of chimeras

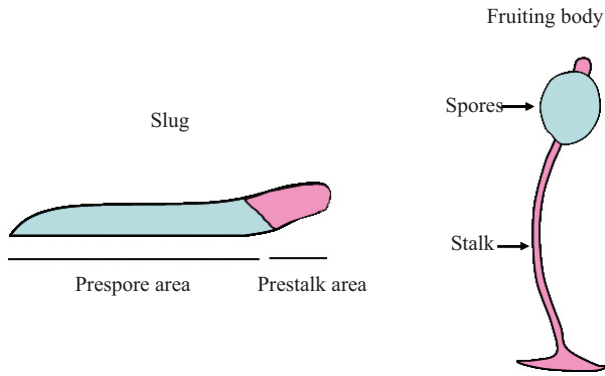


图8 盘基网柄菌前柄细胞和前孢子细胞分化示意图
Fig.8 Schematic drawing of prestalk and prespore cells differentiation pattern

来(图8)。至于这种前端-后端分化的机制,有人提出可能是由细胞的黏附性不同所引发的^[13]。有报道说,前柄细胞和前孢子细胞起初在聚集体里是以随机的方式分布的,后来细胞黏附性的类型发生了特异性的变化才导致了细胞分化^[14]。然而,也有人提出位置决定了细胞分化(position-dependent differentiation)的理论^[15]。细胞的位置信息塑造了一种类似坐标系中该细胞的价值状态,从而决定了细胞分化。最近的研究发现,盘基网柄菌细胞聚集过程中,细胞的分化是以受饥饿时所处的细胞周期位置为基础的^[16]。处于外围的细胞(受饥饿时处于S期或G₂早期)大多分化为前柄细胞;而处于内部的细胞(受饥饿时处于G₂中期或晚期)则分化为前孢子细胞^[17]。

3.2 DdCAD-1对细胞分化的影响

在这篇文章中,我们用中性红染料染色*cadA*⁻细胞,发现破坏*cadA*基因导致了蛞蝓体中不正常的细胞分化,被中性红染料染成深红色的前柄细胞并不是像野生型细胞一样占整个蛞蝓体的1/3至1/4,而是占据蛞蝓体的3/4以上,还有的分布在蛞蝓体的前后两端,或者弥漫于整个蛞蝓体。这与Wong等^[10]用前孢子细胞强启动子*cotB*驱动的*gfp*基因转入*cadA*⁻细胞从而使前孢子细胞被GFP标记成绿色所观察到的情况是一致的。

研究证实,DdCAD-1在盘基网柄菌发育的起始存在于细胞质中,在细胞饥饿之后的3~4 h后被转运至细胞膜上发挥黏附分子的功能^[6,11]。因此,为了进一步证明*cadA*⁻细胞的蛞蝓体分化异常是由DdCAD-1缺失所导致,我们用外源表达的重组His₆-

DdCAD-1蛋白与发育4 h的*cadA*⁻细胞孵育之后,再检测其蛞蝓体的分化状态。结果显示,DdCAD-1与*cadA*⁻细胞作用以后,*cadA*⁻细胞的异常分化得到拯救,加大外源DdCAD-1的用量,其拯救细胞分化的效果也更加明显。同样的效果也出现在DdCAD-1对*cadA*⁻细胞的孢子产率的作用上。经His₆-DdCAD-1处理过的*cadA*⁻细胞,其孢子产率有所提升。事实上,*cadA*⁻细胞的孢子产率降低与其蛞蝓体的分化异常是相关的,正是由于*cadA*⁻细胞的蛞蝓体分化异常,前柄细胞占据了更多的蛞蝓体后,最终发育成的柄细胞量就会相对增加,导致了孢子产率的降低。

那么DdCAD-1为什么会前柄细胞和前孢子细胞的分化产生这样的影响呢?我们分析可能是因为DdCAD-1的缺失使得细胞黏附力发生改变,在细胞分化过程中,前孢子细胞比前柄细胞有更强的结合力^[10]。突变DdCAD-1导致了细胞的黏附性降低,那么需要更强黏附力的前孢子细胞在蛞蝓体中所占的比例就会降低,这与我们观察到的结果是一致的。另外,DdCAD-1对细胞分化的影响也可能不是直接的,因为在盘基网柄菌的发育过程中,有一系列的黏附分子被表达,这些黏附分子共同调节盘基网柄菌的细胞发育。早期的研究已经发现,DdCAD-1在发育早期的细胞流阶段,主要分布在细胞膜突起处的板状伪足(lamellipodia)和丝状伪足(filopodia)上,但是到细胞发育的后期,DdCAD-1便会重新分布,从原来的细胞连接处到达细胞流的外膜上,细胞连接处则由另一个黏附分子gp80所代替^[18]。而且,gp80在*cadA*⁻细胞中的表达量比野生型细胞更多且更早,说明*cadA*基因的缺失能够刺激gp80的过早的高水平表达,gp80的合成可以被cAMP脉冲信号不断扩大^[19]。所以,失去DdCAD-1可能一定程度上加强了cAMP信号并刺激了gp80的高水平表达,从而影响细胞分化。当然,DdCAD-1的Ca²⁺结合性也会造成另外一种可能性,即DdCAD-1参与了Ca²⁺动态平衡的调节,胞质内DdCAD-1可以结合Ca²⁺,那么失去DdCAD-1的*cadA*⁻细胞可能在胞质内有更多的自由Ca²⁺,而细胞内高水平的自由Ca²⁺与前柄细胞分化相关^[20],所以*cadA*⁻细胞的异常细胞分化也有可能是自由Ca²⁺的增加所造成的。

3.3 DdCAD-1对细胞命运决定的意义

除此之外,我们还发现,将表达DdCAD-1的细胞与*cadA*⁻细胞混合发育后,形成的嵌合体显示表达

DdCAD-1的细胞占据在拔顶期结构的顶端及尾部,这两部分都是由蛞蝓体的前柄区发育而来,最终发育成柄死亡, *cadA*细胞则分布在孢子区存活下来。近期的研究也发现,将野生型细胞与*cadA*细胞在琼脂板上做嵌合体发育时, DdCAD-1突变的细胞会发育成孢子,野生型细胞却发育成柄死掉^[21]。这与我们观察到的现象是一致的,都说明了细胞缺失了DdCAD-1之后,会表现出一种“背叛”行为,占据多细胞体的有利部位生存下来,相反,野生型细胞则“无私”许多。其实, DdCAD-1的这种“利他”行为其实是一种在实验室产生的“人为”现象,因为如果在自然环境(如土壤)中将野生型细胞与*cadA*细胞混合发育,形成的嵌合体中主要由野生型细胞发育成孢子, *cadA*细胞发育成柄^[21]。所以说,从长期的进化角度看,这种无私的利他基因其实是自私的。有研究表明,这种现象是源于一种叫亲缘选择的机制^[22],即携带有某种特殊基因的个体可以识别其他携带有相同基因的个体,在生物群体中就会共同作用,抵抗别的不带有该基因的个体,在长期的自然选择中生存下去。在社会生物学中,人们将这种基因称作绿胡须基因^[23-24]。

其实,盘基网柄菌中不止*cadA*一种有绿胡须效应的基因,早在2003年, Queller等^[25]就在盘基网柄菌中发现了第一个绿胡须基因*csA*,编码另一个细胞黏附分子gp80。事实上,除了*csA*和*cadA*,自然中还有许多类似的基因,如*Gp-9*,该基因含有等位基因片段*B*和*b*,表达一种与气味识别功能有关的蛋白,使工蚁识别多后型火红蚁(*Solenopsis invicta*)的蚁后^[26], Bb工蚁攻击或杀死BB蚁后而不是Bb蚁后,说明*Gp-9^b*可以识别携带或者不携带这种等位基因的蚁后。酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的絮凝基因*FLO1*表达一种细胞表面蛋白FLO1^[27],该蛋白可以与甘露寡糖链相互作用形成凝集素样结合(lectin-like bonds),引发细胞-细胞黏附形成凝絮状产物。通过这种凝絮状物质,表达*FLO1*的细胞能够与其他*FLO1*表达细胞共同合作形成多细胞聚集体,从而保护酵母免受环境的压力。

总之,我们的实验结果充分说明了DdCAD-1不仅对盘基网柄菌发育过程中细胞分化起着重要作用,也对细胞命运决定有一定的影响,虽然细胞的命运决定还受其他一些因素如细胞的营养状况^[28]所决定,但无疑细胞的黏附性对盘基网柄菌的多细胞发

育起着至关重要的作用。但是为什么DdCAD-1在琼脂板上表现出利他主义而在自然环境中的表现完全相反,目前的推论也只是认为可能和基质的不同及黏附性影响细胞进入聚集体的能力有关^[25],具体的机制仍需进一步研究。

参考文献 (References)

- 1 田莉,陈颖盈,梁静静,侯连生. 盘基网柄菌发育期间gp150蛋白与蛋白激酶A相关性的研究. 中国细胞生物学学报(Tian Li, Chen Yingying, Liang Jingjing, Hou Liansheng. Correlational study on gp150 and protein kinase A during *Dictyostelium discoideum* development. Chinese Journal of Cell Biology) 2012; 34(7): 645-51.
- 2 Harris TJ, Siu CH. Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes. *Bioessays* 2002; 24(11): 996-1003.
- 3 王大磊,侯连生. 盘基网柄菌中gp150分子相互作用蛋白质的分离及分析. 中国细胞生物学学报(Wang Dalei, Hou Liansheng. Screening and analyzing of gp150-interacting proteins of *Dictyostelium discoideum*. Chinese Journal of Cell Biology) 2010; 32(3): 45-50.
- 4 Murray B, Niman H, Loomis W. Monoclonal antibody recognizing gp80, a membrane glycoprotein implicated in intercellular adhesion of *Dictyostelium discoideum*. *Mol Cell Biol* 1983; 3(5): 863-70.
- 5 Siu CH, Sriskanthadevan S, Wang J, Hou L, Chen G, Xu X, et al. Regulation of spatiotemporal expression of cell-cell adhesion molecules during development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Growth Differ* 2011; 53(4): 518-27.
- 6 Wong EFS, Brar SK, Sesaki H, Yang C, Siu CH. Molecular cloning and characterization of DdCAD-1, a Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule, in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1996; 271(27): 16399-408.
- 7 Sriskanthadevan S, Lee T, Lin Z, Yang D, Siu CH. Cell adhesion molecule DdCAD-1 is imported into contractile vacuoles by membrane invagination in a Ca²⁺- and conformation-dependent manner. *J Biol Chem* 2009; 284(52): 36377-86.
- 8 Lin Z, Huang H, Siu CH, Yang D. (1)H, (13)C and (15)N resonance assignments of Ca(2+)-free DdCAD-1: A Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion molecule. *J Biomol NMR* 2004; 30(3): 375-6.
- 9 Lin Z, Sriskanthadevan S, Huang H, Siu CH, Yang D. Solution structures of the adhesion molecule DdCAD-1 reveal new insights into Ca²⁺-dependent cell-cell adhesion. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13(11): 1016-22.
- 10 Wong E, Yang C, Wang J, Fuller D, Loomis WF, Siu CH. Disruption of the gene encoding the cell adhesion molecule DdCAD-1 leads to aberrant cell sorting and cell-type proportioning during *Dictyostelium* development. *Development* 2002; 129(16): 3839-50.
- 11 Brar SK, Siu C. Characterization of the cell adhesion molecule gp24 in *Dictyostelium discoideum*. Mediation of cell-cell adhesion via a Ca²⁺-dependent mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268(33): 24902-9.
- 12 付卓敏,侯连生. 盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)细胞的分化及其调控. 细胞生物学杂志(Fu Zhuomin, Hou Liansheng.

- Chinese Journal of Cell Biology) 2002; 24(5): 289-93.
- 13 Steinberg MS, Gilbert SF, Townes and Holtfreter (1955): Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 2004; 301(9): 701-6.
- 14 Nicol A, Rappel W, Levine H, Loomis WF. Cell-sorting in aggregates of *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* 1999; 112(Pt 22): 3923-9.
- 15 Krefft M, Voet L, Gregg JH, Mairhofer H, Williams KL. Evidence that positional information is used to establish the prestalk-prespore pattern in *Dictyostelium discoideum* aggregates. *EMBO J* 1984; 3(1): 201.
- 16 Weening KE, Wijk IV, Thompson CR, Kessin RH, Podgorski GJ, Schaap P. Contrasting activities of the aggregative and late PDSA promoters in *Dictyostelium* development. *Dev Biol* 2003; 255(2): 373-82.
- 17 Weijer CJ, Duschl G, David CN. Dependence of cell-type proportioning and sorting on cell cycle phase in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci* 1984; 70(1): 133-45.
- 18 Sesaki H, Siu CH. Novel redistribution of the Ca^{2+} -dependent cell adhesion molecule DdCAD-1 during development of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* 1996; 177(2): 504-16.
- 19 Desbarats L, Lam TY, Wong L, Siu C. Identification of a unique cAMP-response element in the gene encoding the cell adhesion molecule gp80 in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* 1992; 267(27): 19655-64.
- 20 Azhar M, Manogaran P, Kennady P, Pande G, Nanjundiah V. A Ca^{2+} -dependent early functional heterogeneity in amoebae of *Dictyostelium discoideum*, revealed by flow cytometry. *Exp Cell Res* 1996; 227(2): 344-51.
- 21 Srisanthadevan S, Zhu Y, Manoharan K, Yang C, Siu CH. The cell adhesion molecule DdCAD-1 regulates morphogenesis through differential spatiotemporal expression in *Dictyostelium discoideum*. *Development* 2011; 138(12): 2487-97.
- 22 Hirose S, Benabentos R, Ho HI, Kuspa A, Shaulsky G. Self-recognition in social amoebae is mediated by allelic pairs of tiger genes. *Science* 2011; 333(6041): 467-70.
- 23 West SA, Gardner A, Griffin AS. Altruism. *Curr Biol* 2006; 16(13): R482-3.
- 24 West SA, Griffin AS, Gardner A, Diggle SP. Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(8): 597-607.
- 25 Queller DC, Ponte E, Bozzaro S, Strassmann JE. Single-gene greenbeard effects in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science* 2003; 299(5603): 105-6.
- 26 Keller L, Ross KG. Selfish genes: A green beard in the red fire ant. *Nature* 1998; 394(6693): 573-5.
- 27 Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C, *et al.* FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* 2008; 135(4): 726-37.
- 28 Kuzdzal-Fick JJ, Queller DC, Strassmann JE. An invitation to die: Initiators of sociality in a social amoeba become selfish spores. *Biol Lett* 2010; 6(6): 800-2.

(接144页)

- 6 Bloemen MC, van der Veer WM, Ulrich MM, van Zuijlen PP, Niessen FB, Middelkoop E. Prevention and curative management of hypertrophic scar formation. *Burns* 2009; 35(4): 463-75.
- 7 Gabriel V. Hypertrophic scar. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2011; 22(2): 301-10.
- 8 Wang J, Dodd C, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Invest* 2008; 88(12): 1278-90.
- 9 Zunwen L, Shizhen Z, Dewu L, Yungui M, Pu N. Effect of tetrandrine on the TGF- β -induced smad signal transduction pathway in human hypertrophic scar fibroblasts *in vitro*. *Burns* 2012; 38(3): 404-13.
- 10 He S, Yang Y, Liu X, Huang W, Zhang X, Yang S, *et al.* Compound *Astragalus* and *Salvia miltiorrhiza* extract inhibits cell proliferation, invasion and collagen synthesis in keloid fibroblasts by mediating transforming growth factor- β /Smad pathway. *Br J Dermatol* 2012; 166(3): 564-74.
- 11 Messadi DV, Doung HS, Zhang Q, Kelly AP, Tuan TL, Reichenberger E, *et al.* Activation of NF- κ B signal pathways in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res* 2004; 296(3): 125-33.
- 12 Zhu G, Cai J, Zhang J, Zhao Y, Xu B. Abnormal nuclear factor (NF)- κ B signal pathway and aspirin inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF- κ B activation in keloid fibroblasts. *Dermatol Surg* 2007; 33(6): 697-708.
- 13 Gong J, Guo S, Li HB, Yuan SY, Shang Y, Yao SL. BML-111, a lipoxin receptor agonist, protects haemorrhagic shock-induced acute lung injury in rats. *Resuscitation*. 2012; 83(7): 907-12.
- 14 Zhou XY, Li YS, Wu P, Wang HM, Cai ZY, Xu FY, *et al.* Lipoxin A4 inhibited hepatocyte growth factor-induced invasion of human hepatoma cells. *Hepatol Res* 2009; 39(9): 921-30.