

饥饿对盘基网柄菌细胞迁移特征及伪足性状的影响

郭晓慧¹ 赵敏^{2,1} 王晓燕¹ 赵三军¹ 高润池^{1,3} 高晶¹ 施利民^{1*}

(¹云南师范大学再生生物学实验室, 昆明 650500; ²美国加州大学戴维斯分校医学院再生治疗研究所皮肤科, California 98517, USA; ³美国约翰·霍普金斯大学医学院细胞生物学系, Maryland 21205, USA)

摘要 该实验通过研究饥饿条件下盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)的迁移特征及其伪足性状参数的变化情况, 揭示能量匮乏时细胞迁移特征与其伪足性状之间的相关性。结果显示, 与营养充足的对照组细胞相比, 饥饿处理后细胞运动速度和运动方向持续性显著增加, 饥饿3 h后运动速度达到最大, 为8.36 $\mu\text{m}/\text{min}$, 饥饿5 h后运动方向持续性最强。随饥饿时间的延长, 细胞平均每分钟形成的伪足数目显著增加, 饥饿3 h后细胞形成的伪足数目最多, 为5.18条/min, 裂生型伪足在饥饿5 h时形成比例最大, 达73.55%。细胞迁移特征与其伪足性状相关性分析的结果显示, 盘基网柄菌的迁移速度与伪足数目呈正相关, 而裂生型伪足的比例影响了细胞运动方向的持续性, 细胞伪足延伸时间、延伸面积、伪足长度受饥饿的影响程度较小。

关键词 盘基网柄菌; 饥饿; 迁移; 伪足

The Effect of Starvation on Migration and Pseudopod of *Dictyostelium discoideum*

Guo Xiaohui¹, Zhao Min^{2,1}, Wang Xiaoyan¹, Zhao Sanjun¹, Gao Runchi^{1,3}, Gao Jing¹, Shi Limin^{1*}

(¹Regeneration Biology Research Section, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China; ²Department of Dermatology and Department of Ophthalmology, Institute for Regenerative Cures, School of Medicine, University of California at Davis, California 98517, USA; ³Department of Cell Biology, Johns Hopkins University, School of Medicine, Maryland 21205, USA)

Abstract We studied the character of movement and pseudopodia of *Dictyostelium discoideum* to investigate the relationship between migration and pseudopod of *D. discoideum* under starvation. The results showed that the movement speed and direction persistent of cell increased significantly with the starved time. The cells moved with maximum speed (8.36 $\mu\text{m}/\text{min}$) and strongest persistent when they were starved for 3 h and 5 h, respectively. The average formation speed of pseudopod also increased significantly with the starved times and reached maximum speed (5.18 $\mu\text{m}/\text{min}$) when cells were starved after 3 h. The splitting pseudopodia were produced at maximum ratio at 73.55% by the cells that were starved for 5 h. The results of Pearson correlations indicated that the migration speed of cells related positively with formation speed of pseudopodia. The persistence of cell migration correlated positively with the ratio of splitting pseudopod. The cell migration was not influenced significantly by extension time, extension area and extension size of pseudopod.

Key words *Dictyostelium discoideum*; starvation; migration; pseudopod

收稿日期: 2012-11-08 接受日期: 2012-12-28

云南省高端科技人才引进项目(批准号: 2009CI127)、云南省应用基础研究青年项目(批准号: 2012FD021)和云南师范大学青年基金项目资助的课题

*通讯作者。Tel: 0871-65943723, E-mail: shilm281@yahoo.cn

Received: November 8, 2012 Accepted: December 28, 2012

This work was supported by the Yunnan High-end Talent Introduction (Grant No.2009CI127), Yunnan Basic Research for Young Project (Grant No.2012FD021) and Youth Foundation of Yunnan Normal University

*Corresponding author. Tel: +86-871-5943723, E-mail: shilm281@yahoo.cn

网络出版时间: 2013-03-28 17:24 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130328.1724.007.html

细胞是组成生命体的基本单位, 而细胞迁移对有机体完成各种生理活动起到关键作用, 如高等生物的胚胎形成、免疫反应、伤口修复^[1-2], 单细胞生物的觅食^[3]和求偶^[4]等活动均以细胞迁移为基础。异常的细胞迁移会引起各种疾病, 如癌细胞的侵袭或转移^[5]等。所以细胞迁移一直是医学、生命科学界研究的热点, 然而, 细胞迁移机制这一基本的科学问题至今尚未明确。

伪足是细胞表面的突起, 为细胞的运动器官。伪足的性状对细胞的迁移轨迹、方向及速度等特征具有至关重要的影响, 因此, 伪足性状是研究细胞迁移机制的重要切入点。目前, 有两个假说解释了伪足性状对细胞迁移的效应: 基于对细胞定向迁移机制研究结果的总结, 经典的信号中心模型^[6](Signal-Centered model)认为: 外源导航信号激活细胞内的信号通路, 诱使细胞形成新的伪足协助其朝向某个方向迁移; 新生的伪足中心模型^[7](Pseudopod-Centered model)则认为外源信号并不能促进形成新伪足, 相反, 细胞具有固定的伪足形成周期, 外源信号只能在固有的伪足形成周期上调节伪足形成的位置、方式、方向等特征, 使细胞定向迁移。然而, 这两个模型只能解释在有外源信号作用下, 伪足性状对细胞定向迁移的影响, 而无法回答在缺乏外源信号诱导时, 细胞伪足性状如何影响细胞的迁移能力^[8]。

能量供应匮乏可导致细胞自然极化, 此时细胞迁移特性最能反映缺乏外源性导航信号时细胞随机迁移过程中细胞的运动特征和伪足性状之间的关系。1935年发现的生活在土壤中的社会阿米巴——盘基网柄菌^[9](*Dictyostelium discoideum*)是研究细胞迁移的最佳模式生物。在外加环腺苷酸(cAMP)或者其自身产生的cAMP作用下盘基网柄菌发生极化, 细胞延伸伪足分化出明显的前端和尾端, 细胞具有极性, 也就具有了迁移的前提条件^[10]。饥饿后, 盘基网柄菌分泌的cAMP含量升高, 激活细胞内极化信号通路: cAMP和PLA2^[11]信号通路, 伪足的性状随着极化通路的激活也会受到影响^[3]。具有运动能力的盘基网柄菌延伸两种类型的伪足: 原生型(*de novo*)和裂生型(*splitting pseudopod*)^[12], 不同类型的伪足对细胞运动特征有着不同的作用, 细胞趋化性的研究结果显示原生型伪足参与细胞运动方向的改变, 裂生型伪足维持细胞原来的运动方向^[3]。但是, 没有外源性诱导信号存在时, 细胞伪足对细胞维持运动特征

所起的作用未见有报道。

本研究以盘基网柄菌为研究对象, 对细胞进行不同持续时间的饥饿处理, 探讨没有外加诱导信号作用下, 细胞经过自然极化后的迁移模式及伪足性状, 并分析细胞的伪足性状与细胞迁移特征之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 野生型盘基网柄菌AX₂, 由美国加州大学戴维斯分校再生医学实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂 HL5(1 L)培养基配方: 10 g Tryptone(胰蛋白胨, Sigma公司)、5 g Yeast extract(酵母抽提粉, Sigma公司)、0.965 g KH₂PO₄、0.485 g Na₂HPO₄、10 g Glucose(葡萄糖, Sigma公司)、0.03 g链霉素, pH6.5, 121 °C高温灭菌30 min, 待冷却可置于4 °C冰箱低温储存。DB(development buffer)配方: 5 mmol/L Na₂HPO₄、5 mmol/L KH₂PO₄、1 mmol/L CaCl₂、2 mmol/L MgCl₂, pH6.5, 4 °C冰箱低温储存。

1.2 方法

1.2.1 盘基网柄菌的培养 选用野生型盘基网柄菌(AX₂)进行培养。具体培养过程如下: 取于-70 °C超低温冰箱中保存的菌株, 立即放入37 °C的温水中, 使其快速溶解复苏, 将菌液均匀地散布在装有10 mL HL5的培养皿中, 置22 °C的恒温培养箱静置30 min; 待存活的细胞贴壁, 弃去培养基, 重新加10 mL HL5培养基, 放回22 °C的恒温培养箱中培养, 每隔两天更换一次培养基; 细胞生长到对数期即可以用于实验、传代培养、菌种保藏。

1.2.2 实验细胞处理 当盘基网柄菌生长到对数期, 更换培养基, 反复吹打培养皿底部使细胞悬浮, 取1 mL细胞悬浮液, 用DB缓冲液稀释10倍, 静置10 min, 待细胞贴壁, 吸去缓冲液, 加入新鲜的DB反复冲洗2-3次, 直至不含有残留的HL5培养基, 重新加入10 mL DB缓冲液, 静置细胞, 使其进入饥饿状态。其中, 以在HL5培养基中培养的细胞作为对照组, 其余细胞分别饥饿1, 3, 5, 7 h作为实验组。

1.2.3 图像采集 取处理后的细胞, 将其密度稀释为 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$, 取1 mL置于自制的图像采集小室(类似于细胞的趋电性小室^[13]), 待细胞全部贴壁, 用Nikon倒置显微镜(Nikon Eclipse Ti-E, 产自日本尼康公司)采集图像。用10倍物镜下每间隔1 min采集细胞运动

轨迹图像,持续拍摄15 min;采集细胞的伪足图像时,根据文献报道盘基网柄菌伪足的延伸时间在15 s左右^[4],图像的拍摄间隔最好是1 s或者2 s,由于拍摄时间较长,在不影响统计结果的情况下,选择2 s/帧,在相衬模块下使用20倍物镜持续拍摄15 min。

1.2.4 图像分析 ImageJ 1.04(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)中的 MTrackJ细胞轨迹追踪插件可用于分析盘基网柄菌细胞的运动轨迹。该插件可获取细胞运动轨迹图以及细胞在二维空间的迁移情况,将所得细胞在每帧图上的空间位置数据输入Chemotaxis Tool插件,获取Tiff格式的细胞运动轨迹图、Avi格式的细胞轨迹图像、细胞空间位移距离Excel表,由此计算细胞轨迹速度、位移速度、细胞运动持续性并且观察细胞的分散范围。

使用ImageJ嵌套的Quimp 3软件(<http://go.warwick.ac.uk/bretschneider/quimp>)自动分析细胞的伪足性状^[15]。Quimp 3软件是在Quimp2^[16]伪足分析软件的基础上发展起来的,其使用原理与其有一定的相似性:以0~150个节点勾勒出细胞的轮廓,每一个节点可以记录细胞边界在时间和空间上的变化,通过比较节点位置的改变,统计伪足各性状参数变化。主要需分析的性状包括伪足延伸时间、频率和延伸方向等,该软件还可以自动区分伪足的类型以及伪足的命运。Quimp 3减少了以往使用者手动操作的繁琐,并且该软件的分析结果,与手动分析结果相比较一致性高达96%,所以本软件的分析结果真实可靠。

1.2.5 统计分析 细胞运动轨迹实验数据通过3个平行实验获得,每次实验设置6个平行组。分析细胞伪足性状的细胞,通过随机选择的方法获得,每组实验分析的细胞至少来自4个独立的视频。通过单因素方差分析(ANOVA)比较不同实验条件下细胞迁移特征及伪足性状的差异,使用Pearson相关分析不同饥饿时间下细胞迁移特征与伪足性状的关系。单因素方差分析、Pearson相关分析均在SPSS 16.0(SPSS Inc., Chicago, USA)中进行,所有的参数值均以 $\text{mean} \pm \text{S.D.}$ 表示,统计学的显著性水平及极显著水平分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 饥饿处理对细胞迁移特征的影响

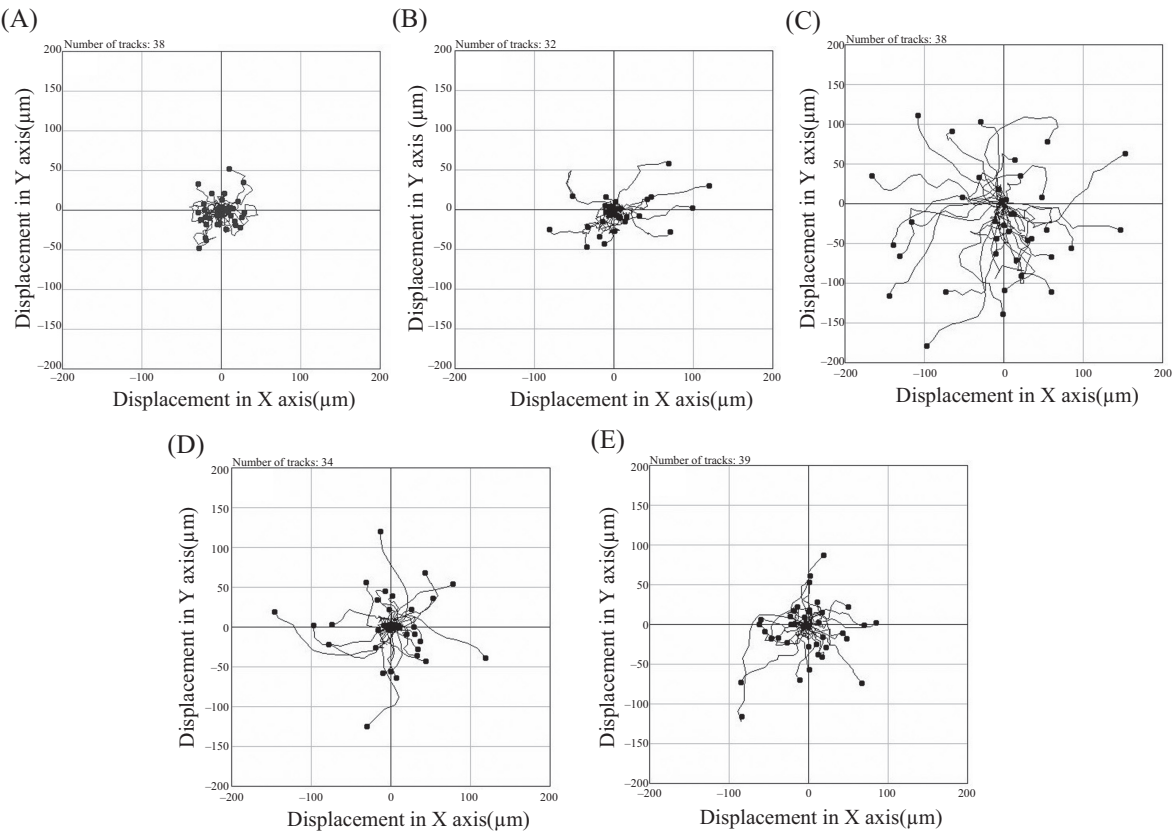
营养供给充足情况下,盘基网柄菌细胞(对照组)轨迹速度(trajec-tory speed)为 $4.05 \mu\text{m}/\text{min}$,运动区

域半径 $50 \mu\text{m}$ (图1A),细胞轨迹转弯次数多。饥饿1 h之后运动速度(即轨迹速度)增加到 $4.31 \mu\text{m}/\text{min}$,个别细胞运动轨迹平直,没有或者很少转弯。饥饿3 h运动速度达到最大值 $8.36 \mu\text{m}/\text{min}$,此时细胞分散程度最大,细胞运动区域半径接近 $200 \mu\text{m}$ (图1C)。随饥饿时间延长,饥饿5 h时细胞运动速度相对饥饿3 h运动速度减小为 $5.81 \mu\text{m}/\text{min}$ 。饥饿不同时间下细胞位移速度(displacement speed)变化趋势与运动速度的变化趋势相一致(图2)。细胞运动方向的持续性(persistency=trajectory speed/displacement speed)也受到了饥饿时间长短的影响(图3),随饥饿时间的延长运动方向持续性增加,经过5 h的饥饿后细胞的运动方向持续性最强,饥饿时间持续到7 h后运动方向持续性反而减弱。不同饥饿时间下的细胞运动速度和运动方向单因素方差分析的结果显示,对照组细胞与饥饿1 h后细胞运动速度($P=0.18$)和方向持续性($P=0.60$)没有显著差异,与其余实验组在运动速度和运动方向上均有极显著差异($P < 0.01$)。各实验组之间的对比结果,细胞饥饿1 h后的运动速度仅与饥饿7 h后的运动速度没有显著差异($P=0.41$),饥饿3 h后与饥饿5 h后运动方向持续性没有显著性差异($P=0.46$),其余各组间的运动速度和方向持续性的比较均有极显著差异($P < 0.01$)。

2.2 不同饥饿时间下伪足性状参数的比较

伪足形成的数量及延伸时间、面积等是细胞伪足最基本的性状,对不同饥饿时间下的各性状参数比较,总体结果显示:伪足的延伸帧数(形成周期)不受饥饿时间的影响,饥饿3 h后和饥饿5 h后细胞伪足的长度、延伸面积、平均单细胞形成的伪足总数量、裂生型伪足的比例与对照组有显著差异,其余饥饿时间下的伪足性状与对照组没有差异。饥饿处理5 h后形成的伪足平均长度达 $8.04 \mu\text{m}$,是处理组中的最大值,但是由于饥饿3 h的细胞伪足延伸速度最快,所以饥饿3 h单个伪足在其生长周期内延伸的面积最大,为 $16.20 \mu\text{m}^2$ (表1)。

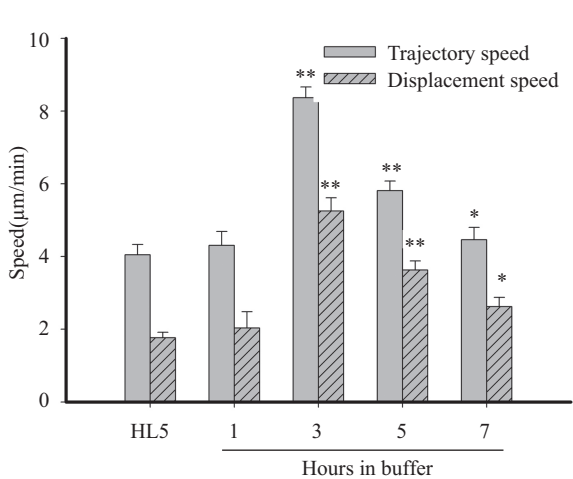
基于15 min内细胞生成的伪足总数计算平均每分钟伪足的形成速度:对照组盘基网柄菌平均每分钟延伸出3.31个伪足,饥饿1 h后,减少为3.18个,饥饿3, 5, 7 h后,细胞形成伪足的速度分别为5.18条/min、4.27条/min、3.82条/min。细胞形成伪足的速度只有饥饿3 h和5 h的实验处理组与对照组细胞之间存在显著差异($P < 0.05$,图5)。在实验组内,饥饿1 h、3 h



A: 细胞在HL5培养基中的运动轨迹; B-E: 细胞在DB中饥饿1, 3, 5, 7 h后的运动轨迹。
A: the migration trajectory of cell in HL5; B-E: the migration trajectory of starved cell in DB buffer for 1, 3, 5, 7 h, respectively.

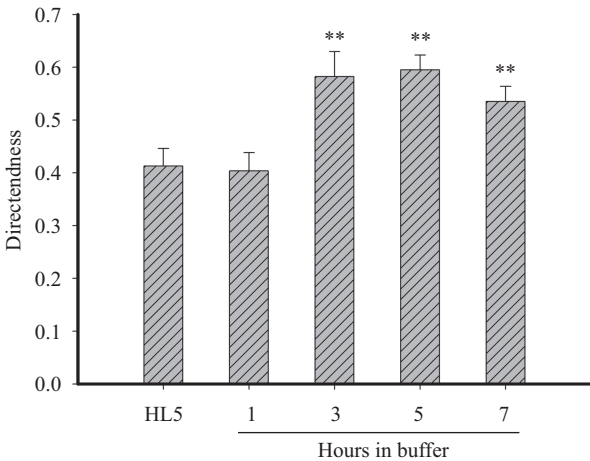
图1 不同饥饿时间下细胞运动轨迹图

Fig.1 The cell trajectory in different starvation time



实验组与对照组之间的差异显著性结果, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
The significant level of statistics comes from comparison between the control group and experimental group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图2 不同饥饿时间下的细胞运动速度和位移速度的比较
Fig.2 The track speed and displacement speed in different starvation time



实验组与对照组之间的差异显著性结果, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
The significant level of statistics comes from comparison between the control group and experimental group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

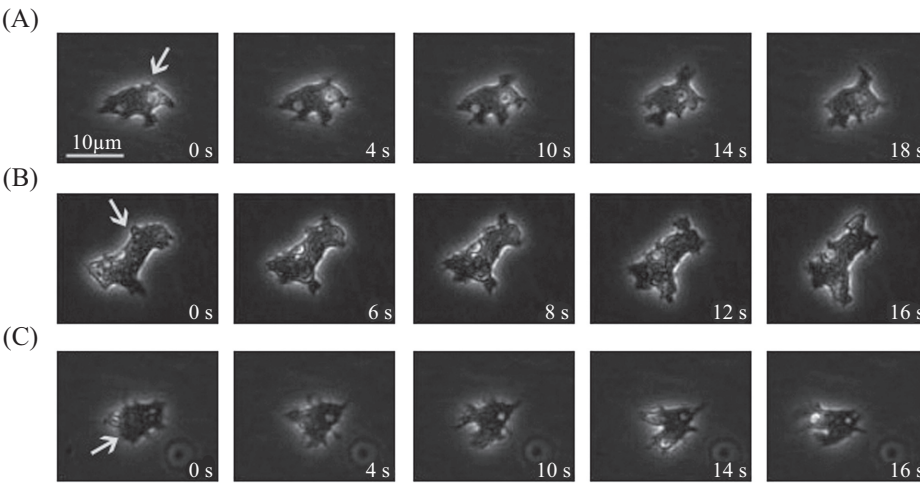
图3 不同饥饿时间下细胞运动方向持续性的比较
Fig.3 The comparison on direction persistent of cell movement in different starvation time

表1 不同饥饿时间下盘基网柄菌细胞伪足性状参数的比较

Table 1 The comparison on pseudopod parameters of *Dictyostelium* cells in different starvation time

参数 Parameters	数量 Counts	大小(μm) Size(μm)	延伸帧数 Frames	延伸面积(μm ²) Gained area(μm ²)	裂生比例(%) Fraction(%)	裂生方式(%) Fraction pattern(%)			
						Step	Hop	Y-split	Frist split
HL5	49.60	7.08±0.87	11.74±2.14	14.23±2.08	59.88	26.37	25.74	11.35	40.19
DB 1 h	49.27	6.99±0.83	12.69±2.20	14.47±2.33	59.54	30.51	21.12	11.91	36.46
DB 3 h	77.68**	7.77±1.42*	10.42±3.36	16.20±2.70**	66.67*	34.46	22.11	15.04	28.40
DB 5 h	61.05*	8.04±1.50**	11.00±3.23	15.17±2.57*	73.55**	36.69	32.14	15.35	24.82
DB 7 h	52.35	7.21±0.98	12.12±2.41	14.63±2.32	66.19	29.56	22.50	15.60	29.56

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

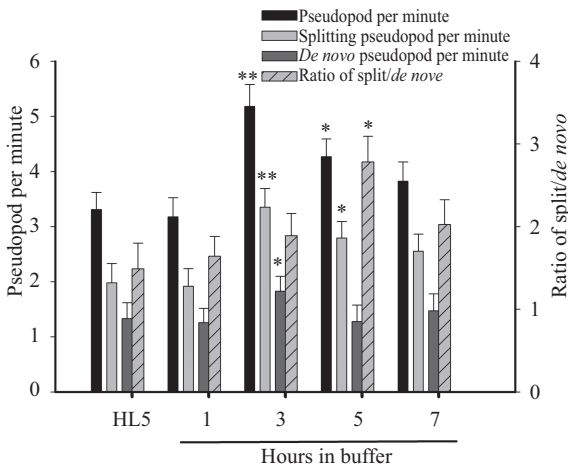


A: 原生型; B: 单侧裂生; C: Y型裂生。箭头所示为伪足延伸位置。

A: *de novo*; B: one way split; C: Y-split. The arrow showed position of pseudopod extension.

图4 伪足延伸类型

Fig.4 The models of pseudopod extension



实验组与对照组之间的差异显著性结果, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

The significant level of statistics comes from comparison between the control group and experimental group. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图5 不同饥饿时间下细胞形成伪足的速度及裂生型与原生型伪足的比例的比较

Fig.5 The comparison on rate of pseudopod formation and the ratio of split/*de novo* in different starvation time

两者有显著差异($P<0.05$)。盘基网柄菌延伸出的伪足根据其形成方式分为原生型和裂生型, 基于两种伪足的不同功能, 所以有必要分别统计不同饥饿时间下两类伪足形成速度: 饥饿3 h为原生型伪足和裂生型伪足形成速度最快时间点分别为1.83条/min、3.35条/min, 饥饿3 h的原生型伪足的形成速度与对照组和其他各实验组均有显著的差异($P<0.05$, 图5), 而其余实验组与对照组及各实验组之间原生型伪足的形成速度没有差异; 细胞饥饿3 h后裂生型伪足的形成速度与对照组比较亦有极显著的差异($P<0.01$)。虽然饥饿5 h后裂生型伪足形成速度下降为2.79条/min ($P<0.05$, 图5), 但是平均每分钟形成裂生型伪足的速度是原生型伪足速度的2.78倍, 与对照组有显著差异($P<0.05$, 图5), 实验组的组间比较结果显示饥饿5 h裂生型伪足与原生型伪足的比例与其余各组均有差异($P<0.05$), 其余各实验组组间的比较没有差异, 且

与对照组亦没有差异。饥饿5 h后裂生型伪足形成比例较大, 所以细胞运动方向持续性没有受运动速度减小的影响, 依然持续增加。饥饿7 h细胞伪足各参数值较饥饿5 h呈下降的状态, 但是没有显著的差异性。

裂生型伪足的形成方式可分为Y-split(伪足在延伸的过程中分裂为两个大小几乎相等的伪足, 随着延伸的继续, 其中一个伪足收缩另一个伪足继续延伸, 或者两个同步收缩或延伸)、One way split(正在延伸的伪足在没有完全缩回前, 在其一侧延伸出一个新的伪足)两类(图4), 以其形成的空间顺序进一步的详细划分又可分为以下四种: Step(母本伪足左右两侧间歇形成两个裂生型的伪足, 第二个伪足定义为step)、Hop(母本伪足在同一侧连续形成的两个裂生型的伪足, 则第二个称为Hop)、Y-split(在母本伪足处同时形成两个大小几乎相等的裂生伪足)、Frist split(由母本伪足延伸出的第一个裂生型的伪足), 与对照组相比较, 四种类型的伪足在不同的饥饿时间下所占比例大幅度地改变(表1), 并且显示出此消彼长的趋势(图6), 随饥饿时间的延长Hop、Frist split形成比例逐渐减小, Step、Y-split形成比例增加, Step和Y-split的变化曲线与细胞运动方向持续性变化曲线相一致(图6)。表明饥饿处理后, 细胞内部极化信号的激活不仅对裂生型伪足的数量和速度产生一定的影响, 亦影响其形成方式。

饥饿的细胞向外界环境中分泌cAMP, 盘基网柄菌细胞对其浓度梯度差异反应异常灵敏, 为了检测饥饿处理的时间是否形成cAMP脉冲诱导细胞

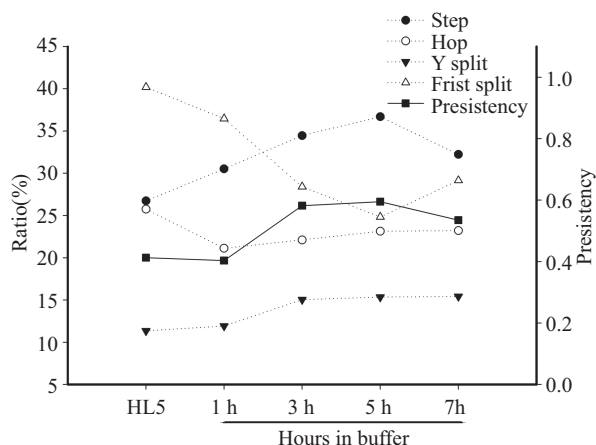
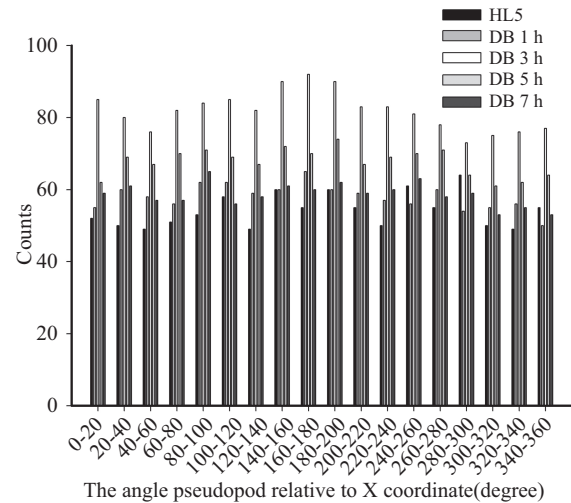


图6 不同饥饿时间下不同类型裂生型伪足所占的比例

Fig.6 The ratio of different type of splitting pseudopod in different starvation time



统计分析各实验条件下20个左右的细胞所延伸出的全部伪足与X坐标轴的夹角。

We have analysis the angle of all pseudopodia with X coordinate each experimental conditions around twenty cells.

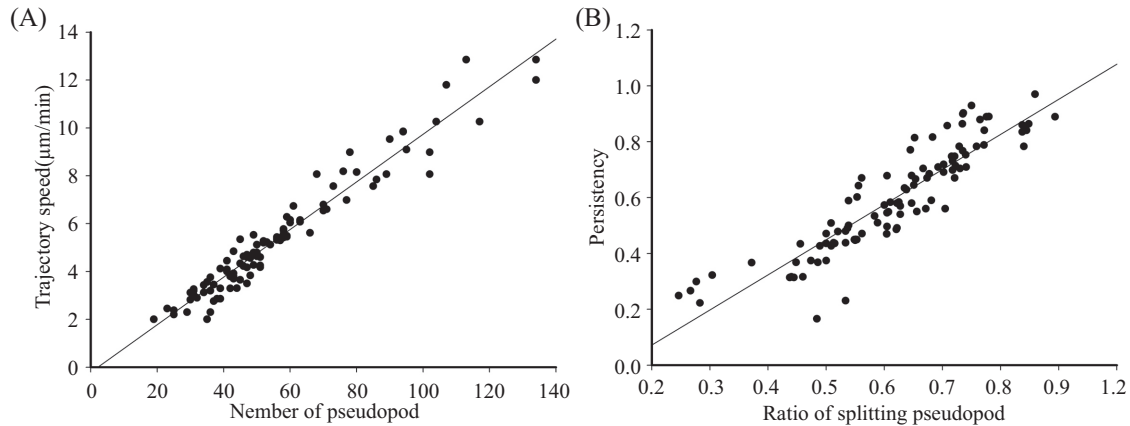
图7 细胞延伸出的伪足与X坐标轴的夹角

Fig.7 The angle of pseudopod relative to x coordinate

朝特定点迁移, 所以检测细胞的伪足延伸方向是否存在定向性。以20°为间隔, 将细胞伪足与X轴之间的夹角划分为18个象限, 通过卡方检验分析伪足沿不同方向延伸的频次的差异, 结果表明, 细胞伪足沿不同方向延伸的频次在对照组中($\chi^2=6.96$, $v=17$, $P=0.98$)以及实验组饥饿处理1 h($\chi^2=3.62$, $v=17$, $P=1.00$)、3 h($\chi^2=6.10$, $v=17$, $P=0.99$)、5 h($\chi^2=3.54$, $v=17$, $P=1.00$)、7 h($\chi^2=3.00$, $v=17$, $P=1.00$)均没有显著性差异, 说明不存在外源性信号的诱导时, 细胞伪足的延伸方向是随机的(图7), 即饥饿对细胞伪足的延伸方向没有影响, 细胞分泌到外界环境中的cAMP是均匀的, 其浓度未对细胞的运动方向产生影响。

2.3 盘基网柄菌运动特征与伪足性状相关性分析

细胞的运动速度和方向持续性与伪足的参数性状的相关性分析结果显示: 盘基网柄菌细胞的运动速度与伪足的生成数目呈显著正相关($\text{trajectory speed} = -0.20 + 0.10 \text{ number of pseudopod}$, $r=0.90$, $F=440.45$, $P<0.01$, 图8A), 而与伪足延伸周期($r=0.28$, $F=3.01$, $P=0.10$)、伪足的长度($r=0.05$, $F=0.36$, $P=0.85$)、单个伪足在生长期间的延伸面积($r=0.06$, $F=0.01$, $P=0.98$)无显著相关性。细胞运动方向的持续性与细胞裂生型伪足数量呈正相关($\text{persistence} = -0.18 + 1.26 \text{ ratio of splitting pseudopod}$, $r=0.97$, $F=1\,608.46$, $P<0.01$, 图8B), 而与伪足延伸



A: 细胞运动速度与伪足总数的散点图; B: 运动方向持续性与裂生型伪足比例的散点图。

A: the scatter diagram of track speed and the number of pseudopod; B: the scatter diagram of directendness and ratio of splitting pseudopod.

图8 盘基网柄菌细胞迁移特性与其伪足性状参数的相关性分析

Fig.8 Correlation analysis of cell migration characteristics and pseudopodia character parameter

周期($r=0.17$, $F=0.53$, $P=0.49$)、伪足的长度($r=0.20$, $F=0.71$, $P=0.41$)、单个伪足在生长期间的延伸面积($r=0.06$, $F=0.07$, $P=0.80$)无显著相关性。

3 讨论

本实验在饥饿环境下研究细胞的伪足形成与细胞迁移特征的关系, 揭示不存在外源性诱导信号时, 细胞如何通过自我调节伪足性状, 进而影响细胞的迁移能力, 增强细胞运动方向持续性和速度使其寻找到食物源, 分析细胞迁移特征与伪足性状的相关性, 同时为以盘基网柄菌为模式生物以伪足中心模型为基础的细胞趋化性和趋电性研究, 打下一定的基础。

饥饿环境下的细胞迁移是一种寻找食物的自我保护行为, 在其寻找食物的过程中, 要具有一定的搜寻策略才能保障其在自身所剩能量有限的情况下最快搜寻到食物, 所以相对于营养状态细胞, 经过饥饿处理的细胞, 在内源性极化信号作用下运动速度和轨迹将发生改变。在细胞饥饿的初期(饥饿1 h), 细胞的运动速度和运动方向的持续性与营养状态下没有显著性差异, 推测是由于细胞饥饿1 h后, 细胞外的cAMP浓度较低, 细胞极化信号系统未被激活, 因此并未出现明显的觅食趋势; 饥饿3 h之后, 细胞的运动速度和运动方向持续性显著增加, 并且运动速度达到最大, 推测饥饿3 h后, 盘基网柄菌极化信号系统处于最活跃的时期, 细胞开始活跃寻找食物; 饥饿5 h之后, 细胞能量供应不足, 无法继续

维持活跃的运动力, 故细胞的运动速度较饥饿3 h减慢, 但是此时运动方向持续性依然在增加, 说明当运动速度受到限制时, 盘基网柄菌细胞选择通过减少转弯, 来扩大搜寻范围; 饥饿7 h后细胞的运动速度和方向持续性较饥饿5 h的细胞均减小, 但是与对照组相比较依然有显著差异, 出现这种现象的原因可能是由于饥饿时间过长, 细胞分泌的cAMP量有所下降, 影响了伪足的延伸, 并且在盘基网柄菌多细胞发育阶段, 饥饿6 h后细胞将进入多细胞发育细胞丘(Mound)阶段, 此阶段的细胞没有运动性, 本实验中的细胞密度较小, 分泌的cAMP量无法诱导细胞进入多细胞发育阶段, 长时间饥饿势必影响细胞的生理状态。对于细胞的觅食行为, Li等^[17]在没有营养的琼脂糖介质中观察饥饿条件下细胞的运动轨迹, 研究结果表明盘基网柄菌运动速度在不同的饥饿时间下没有显著性差异, 没有体现出能量供应对细胞迁移的影响。显然, 我们的结果与此结论有很大的不同, 造成不同的原因可能是由于实验条件设置引起: Li等^[17]是在固体琼脂培养基中进行观察, 而本实验是在液体培养基中观察细胞的运动, 运动介质的不同使细胞面临不同的迁移阻力, 因此造成实验结果的差异。

饥饿引起内部极化信号激活, 细胞运动方向不受外源性信号诱导的情况下细胞伪足延伸方向和伪足形成位置是随机的, 内源性极化信号的激活对伪足延伸方向没有影响。而伪足形成数量、延伸长度、延伸面积以及形成类型受细胞极化程度的影响, 饥

饿3 h、5 h时伪足延伸的数量、长度、延伸面积以及类型与对照组相比较有差异, 说明饥饿3 h、5 h是极化信号活跃作用时间, 饥饿7 h伪足各项性状与对照组没有差异, 究其原因饥饿时间过长, 细胞分泌的cAMP量下降, 肌动蛋白的聚合能力减弱, 影响伪足的延伸。

细胞伪足延伸的时间、伪足长度以及延伸面积虽然不同程度地受到了饥饿的影响, 但是与细胞的运动速度和运动方向的持续性没有相关性。在没有外源性诱导信号存在的情况下, 伪足形成的数量决定了细胞的运动速度, 伪足数目越多, 细胞迁移的越快, 分散区域越广泛, 更加有利于细胞寻找到食物; 裂生型伪足的比例则决定了细胞运动方向的持续性, 在对裂生型伪足细致分类研究后, 发现随着饥饿时间的延长Step、Y-split伪足类型所占比例与细胞运动方向持续性变化曲线相一致, 而Hop、First split类型的伪足形成比例与细胞运动方向持续性曲线走势相反, 说明在裂生型伪足类型中Step、Y-split的比例在运动方向持续性中起到关键性的决定作用。

在分析的结果中发现一个有趣的现象, 除饥饿3 h的盘基网柄菌细胞之外, 其余不同饥饿时间处理后的细胞形成原生型伪足的速度与对照组无显著差异, 即使在这些饥饿时间下细胞的运动速度显著增加, 原生型伪足形成速度并没有增加, 说明极化信号的激活并没有抑制细胞形成原生型伪足。但是, van Haastert等^[3]的研究结果显示, 激活极化信号抑制原生型伪足的形成, 增加裂生型伪足的数量, 我们的结果显示在不存在外源性诱导信号下, 细胞形成原生型伪足的速度相对稳定, 相应的细胞的运动速度随裂生型伪足的比例增加而加快, 说明不存在外源性诱导信号时, 裂生型的伪足不仅维持细胞运动方向的持续性, 而且在细胞运动速度增加上起到关键的作用。

参考文献 (References)

- 1 Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392(6676): 565-8.
- 2 Franz CM, Jones GE, Ridley AJ. Cell migration in development and disease. *Dev Cell* 2002; 2(2): 153-8.
- 3 van Haastert PJ, Bosgraaf L. Food searching strategy of amoeboid cells by starvation induced run length extension. *PLoS One* 2009; 4(8): e6814.
- 4 Locascio A, Nieto MA. Cell movements during vertebrate development: Integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(4): 464-9.
- 5 Yamaguchi H, Wyckoff J, Condeelis J. Cell migration in tumors. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 559-64.
- 6 Firtel RA, Chung CY. The molecular genetics of chemotaxis: Sensing and responding to chemoattractant gradients. *Bioessays* 2000; 22(7): 603-15.
- 7 Bosgraaf L, van Haastert PJ. Navigation of chemotactic cells by parallel signaling to pseudopod persistence and orientation. *PLoS One* 2009; 4(8): e6842.
- 8 Neilson MP, Veltman DM, van Haastert PJ, Webb SD, Mackenzie JA, Insall RH. Chemotaxis: A feedback-based computational model robustly predicts multiple aspects of real cell behaviour. *PLoS Biol* 2011; 9(5): e1000618.
- 9 Annesley SJ, Fisher PR. Dictyostelium discoideum—a model for many reasons. *Mol Cell Biochem* 2009; 329(1/2): 73-91.
- 10 Weiner OD, Neilsen PO, Prestwich GD, Kirschner MW, Cantley LC, Bourne HR. A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol* 2002; 4(7): 509-13.
- 11 Veltman DM, Keizer-Gunnik I, van Haastert PJ. Four key signaling pathways mediating chemotaxis in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Biol* 2008; 180(4): 747-53.
- 12 Andrew N, Insall RH. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions. *Nat Cell Biol* 2007; 9(2): 193-200.
- 13 McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 943-78.
- 14 van Haastert PJ. A model for a correlated random walk based on the ordered extension of pseudopodia. *PLoS Comput Biol* 2010; 6(8): pii: e1000874.
- 15 Bosgraaf L, van Haastert PJ. Quimp3, an automated pseudopod-tracking algorithm. *Cell Adh Migr* 2010; 4(1): 46-55.
- 16 Bosgraaf L, van Haastert PJ, Bretschneider T. Analysis of cell movement by simultaneous quantification of local membrane displacement and fluorescent intensities using Quimp2. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66(3): 156-65.
- 17 Li L, Norrelykke SF, Cox EC. Persistent cell motion in the absence of external signals: A search strategy for eukaryotic cells. *PLoS One* 2008; 3(5): e2093.

1 Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998;