

桩蛋白调控盘基网柄菌多细胞发育和趋电性运动

蒋锐达¹ 王晓燕^{1,2} 付羽佳¹ 丁雪¹ 高润池^{1,2*}

(¹云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500; ²云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明 650500)

摘要 桩蛋白(paxillin)是一种多结构域接头蛋白,可募集细胞运动相关的结构和信号分子。它广泛存在于生物有机体中,参与胚胎发育、血管生成、肿瘤发生发展等生理病理事件,而这些生理病理事件的发生也与生物电信号息息相关。该研究以模式生物盘基网柄菌桩蛋白编码基因敲除突变株(*paxB*⁻)为对象,分别对突变株的多细胞发育和趋电性运动进行探究,结果发现,*paxB*基因缺失导致多细胞发育形成基部较大,而孢子囊结构较小的多细胞体,暗示了桩蛋白在盘基网柄菌多细胞发育形成尖端结构时的细胞定向运动过程中可能具有重要的功能。对*paxB*细胞的趋电性进行研究发现,在12 V/cm的直流电场刺激下,*paxB*细胞的趋电性指数降低到0.33±0.03,与野生型的趋电性指数0.83±0.01之间存在显著差异($P<0.001$),*paxB*细胞的平均轨迹速度为(6.20±0.05) μm/min,与野生型细胞平均轨迹速度(4.50±0.05) μm/min相比,其运动速度显著提升。蛋白质印迹和磷酸化位点分析实验发现,*paxB*发挥作用可能与ERK信号通路和丝氨酸脱磷酸化有关。该研究为揭示细胞响应电信号分子机制提供有力补充,还为探究胚胎发育、肿瘤转移等受生物电指导的生物学过程提供借鉴作用。

关键词 细胞运动; 趋电性; 桩蛋白; 盘基网柄菌

Paxillin Regulates Multicellular Development and Electrotaxis of *Dictyostelium discoideum*

JIANG Ruida¹, WANG Xiaoyan^{1,2}, FU Yujia¹, DING Xue¹, GAO Runchi^{1,2*}

(¹School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China;

²Key Laboratory of Yunnan Province for Biomass Energy and Environmental Biotechnology, Kunming 650500, China)

Abstract Paxillin is a multi-domain adaptor protein for cell migration through recruiting the structural and signaling molecules. It is widely present in biological organisms and participates in physiological and pathological events such as embryonic development, angiogenesis, and tumor development. The occurrence of these physiological and pathological events is closely related to bioelectrical signals. It is a common research method to explore the mechanism of electrical signals using the model organism *Dictyostelium discoideum*. In this study, the multicellular development phenotype and electrotaxis of the mutant strain *paxB*⁻ were investigated. The results showed that the deletion of *paxB* gene resulted in the formation of multicellular bodies with larger base and smaller sporangium structure, suggesting that *paxB* might play an important role in the directional movement of cells during the multicellular development of *Dictyostelium discoideum*. Subsequently, the electrotaxis of *paxB*⁻ cells was tested under a DC (directed current) EF (electric field) at 12 V/cm. The results showed that the electro-

收稿日期: 2024-10-11

接受日期: 2024-11-21

国家自然科学基金(批准号: 32260224)和云南省生物质能与环境生物技术重点实验室开放基金资助的课题

*通信作者。Tel: 0871-65940143, E-mail: runchigao@163.com

Received: October 11, 2024

Accepted: November 21, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32260224) and the Open Found of Key Laboratory of Yunnan Province for Biomass Energy and Environmental Biotechnology

*Corresponding author. Tel: +86-871-65940143, E-mail: runchigao@163.com

taxis index of *paxB*⁻ cells decreased to 0.33 ± 0.03 , which was significantly different from that of wild-type cells at 0.83 ± 0.01 . However, the average trajectory speed of *paxB*⁻ cells was $(6.20 \pm 0.05) \mu\text{m}/\text{min}$, which was significantly higher than that of wild-type cells at $(4.50 \pm 0.05) \mu\text{m}/\text{min}$. Western blot and phosphorylation site analysis showed that the roles of *paxB* might be related to ERK signaling pathway and the serine de-phosphorylation. This study provides a powerful supplement for revealing the molecular mechanism of cell response to electrical signals, and also provides a reference for exploring the biological processes guided by bioelectricity such as embryonic development and tumor metastasis.

Keywords cell migration; electrotaxis; paxillin; *Dictyostelium discoideum*

生物电信号广泛存在于多细胞有机体并参与重大的生理和病理活动,包括胚胎发育、伤口愈合^[1]、肿瘤发生发展^[2]等。研究发现,胚胎生物电主要分布在一些与细胞运动和分裂密切相关的发育活动发生区域,并在脊椎动物正常胚胎发育及其形态建成过程中发挥关键作用,人为手段破坏这些电信号将使正常发育过程出现障碍。同样,由于肿瘤发生初期,迅速的、不可控制的细胞增殖会引起细胞表面电荷显著改变,从而导致肿瘤组织相对于周围正常组织表现出极化,在增生区和非增生区出现电势差,形成肿瘤生物电场^[3]。肿瘤生物电场在肿瘤微环境中可促进肿瘤细胞的分裂和迁移,从而加快肿瘤细胞脱离原发灶,突破基底膜进入血液循环。体外研究发现,肿瘤细胞的恶性程度与细胞响应电场的能力呈正相关,即恶性程度越高的肿瘤细胞,受电场作用发生定向运动的能力越强,这种受电场作用发生定向迁移的行为也被称肿瘤细胞趋电性(electrotaxis)^[4]。因此,在分子水平改变细胞对生物电场的响应,也是一种预防和治疗重大疾病的潜在手段。

桩蛋白(paxillin, PXN)是一种细胞骨架蛋白,它作为黏着斑(focal adhesions, FAs)的重要成员和调节细胞运动的参与者,在神经系统发育、胚胎发育、血管发育、肿瘤发生发展等生理和病理过程中发挥重要作用^[5]。研究表明,桩蛋白是迄今为止发现的唯一能与癌基因结合的含酪氨酸的黏附调节蛋白,通过与黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)共同锚定于FAs,并作为整合素信号通路的接头蛋白将不同的细胞骨架和信号蛋白聚集,协调下游信号的传递^[6],从而实现对肿瘤细胞增殖、铺展、转移、侵袭过程的影响^[7-10]。桩蛋白不仅与多种肿瘤的恶性生物学特征有关^[11],还与细胞的形态学、运动力改变相关^[12]。研究表明,桩蛋白在人类恶性肿瘤中异常表达^[5]。在哺乳动物细胞中,桩蛋白的磷

酸化决定了其功能的发挥,尤其是一些保守的氨基酸残基的磷酸化直接调控细胞的迁移,例如, Y31和 Y118磷酸化、S178磷酸化,以及Raf-Mek-Erk依赖的S126和S130磷酸化。虽然关于桩蛋白在胚胎发育中作用的证据很少,但作为一个众所周知的整合素效应因子,桩蛋白通过促进FAK、p130cas蛋白和MAPKs的招募和磷酸化在胚胎发育中发挥着纤连蛋白受体转换器的作用^[12-14]。

为了探究桩蛋白在多细胞发育和生物电信号指导的细胞定向迁移方面的作用,该研究选用了模式生物盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)作为实验材料,其原因是该生物具有特殊的生命周期,它在土壤富含细菌或酵母菌时,以单细胞形式生活,在环境条件恶劣或食物缺乏时,数以亿计的单细胞可以聚集并分化形成多细胞体,同时,在多细胞发育的细胞堆时期产生生物电信号。尽管盘基网柄菌的多细胞发育相对简单,然而其涉及到的一系列信号分子的调控却与高等生物十分相似,在高等生物发育过程中能找到这些信号蛋白的同源体。此外,盘基网柄菌单细胞可以响应电信号,并发生定向迁移^[15]。因此,对模式生物盘基网柄菌中的桩蛋白功能进行研究可以为探究高等多细胞生物体的生命活动提供借鉴作用。本研究对模式生物盘基网柄菌细胞*paxB*(paxillin B)基因缺失突变株的多细胞发育和趋电性运动进行探究,结果发现,盘基网柄菌细胞中*paxB*基因不仅与多细胞发育有关,而且在细胞趋电性运动中发挥了关键性作用,这些结果可为探究胚胎发育和肿瘤转移机制提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 野生型盘基网柄菌细胞(AX2)、*paxB*敲除突变株(标记为*paxB*⁻)由日本NBRP

Nenkin(National BioResource Project Cellular slime molds)惠赠。

1.1.2 培养基和缓冲液 HL5培养基、发育缓冲液(development buffer, DB)、10× Steinberg's溶液的配制方法参考文献[16]。

1.1.3 抗体 ERK1/2、PKC抗体、Myosin-RLC抗体均购自CST公司; GAPDH抗体购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞无菌培养 细胞无菌培养主要参考文献[16]。

1.2.2 多细胞发育实验 多细胞发育实验方法主要参考文献[16]。简述如下, 将无菌培养的细胞用DB缓冲液洗2次, 取约 5×10^7 个细胞铺展到1.5% DB琼脂固体平板上(约 6.5×10^5 个/cm²), 22 °C静置, 并在0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h等时间点用体视显微镜观察并拍照记录。

1.2.3 细胞运动定量分析 细胞运动定量分析主要参考文献[16]和[17], 简述如下: 细胞随机运动和趋电性运动均需要将细胞在DB缓冲液中饥饿处理3 h。趋电性实验将给细胞施加强度为12 V/cm的直流电场, 而随机运动需要切断直流电场, 其他处理相同。对细胞运动的定量分析使用ImageJ软件, 并对细胞运动的方向性指数(directedness)、方向持续性指数(persistency)、轨迹速度(track speed)和位移速度(displacement speed) 4个参数进行量化, 每组实验至少重复3次, 每次实验统计30~50个细胞。

1.2.4 蛋白质印迹检测目的蛋白的表达情况 蛋白质印迹实验过程主要参考文献[16], 简述如下: 收集经过DB缓冲液饥饿处理3 h的AX2和*paxB*细胞, 将细胞置于大容量加电小室(40 mm×40 mm)中施加12 V/cm的直流电场, 并分别收集加电刺激1 min、5 min、10 min后的细胞, 裂解液处理, 获得蛋白质样品。使用SDS-PAGE胶对蛋白样品进行垂直电泳(110 V电泳20 min, 150 V电泳85 min)后, 用滤纸、PVDF膜和SDS-PAGE胶制备“三明治”转膜系统, 4 °C、40 V电压下转膜16 h。随后分别用1:1 000稀释的一抗在4 °C环境下孵育过夜, TBST洗膜后再用1:5 000稀释的二抗在室温条件下孵育1 h, 经显影液处理后, 用凝胶成像系统进行显影和分析, 每组实验至少重复3次, 蛋白质条带的定量分析使用ImageJ软件的灰度分析功能。

1.2.5 盘基网柄菌桩蛋白PaxB与人类桩蛋白Paxα的线性序列比对 通过在NCBI网站上获得人类的桩蛋白Paxα(paxillin α)的蛋白序列(ID: 5829)和盘基网柄菌PaxB蛋白的序列(ID: 8619466), 用DNAMAN软件比对两种蛋白质的线性序列。

1.2.6 统计分析 所有实验至少进行3次重复, 利用SPSS软件对所得数据进行统计学分析, 数据用均值±标准误(mean±SEM)表示。采用独立样本*t*检验进行统计学分析。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001。

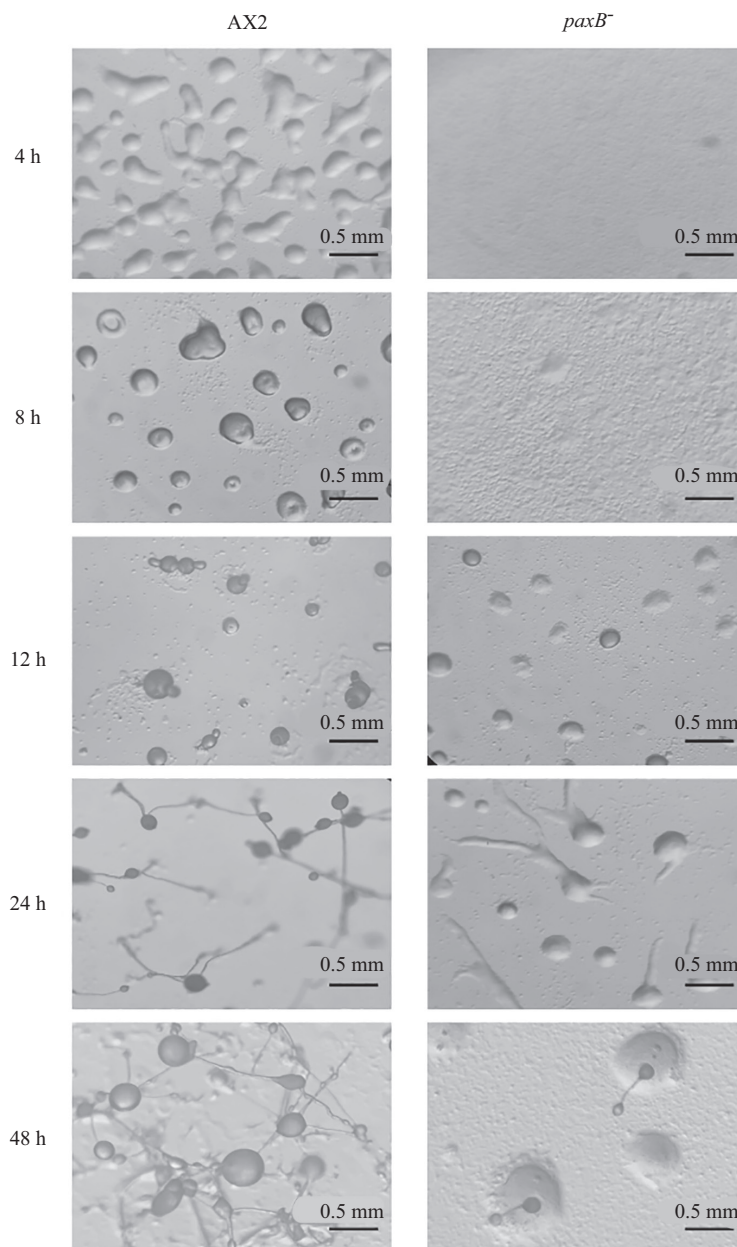
2 结果与分析

2.1 *paxB*在多细胞发育阶段的细胞迁移中发挥作用

为了探究*paxB*在多细胞发育中的作用, 本研究将盘基网柄菌野生型细胞AX2和*paxB*突变株细胞铺展于无营养的DB琼脂固体平板上, 通过观察二者在DB琼脂平板上的变化, 发现AX2细胞饥饿约4 h后发生极化并开始朝某些“中心”聚集, 6~8 h形成细胞堆、12~16 h形成蛞蝓体、22~24 h形成具有孢子囊结构的多细胞体, 从而完成从单细胞到多细胞的发育过程(图1)。而*paxB*突变株的多细胞发育与野生型细胞有所不同, 尽管细胞在饥饿4 h后开始发生极化, 但在8 h后才开始聚集, 约12 h形成细胞堆, 直到24 h仍未形成孢子囊结构的多细胞体(图1)。将时间延长至48 h以上, 一些较大的细胞堆才形成多细胞结构, 但孢子囊相比野生型较小, 且绝大部分的细胞聚集在柄的底部, 另外一些相对较小的细胞堆却不能形成孢子囊, 而且在琼脂表面, 仍能看到有许多的细胞尚未发生聚集而独立游离存在。该现象说明桩蛋白在盘基网柄菌多细胞发育的后期发挥了重要作用。桩蛋白的存在, 保证了多细胞发育中细胞的分化与迁移, 以及细胞与细胞间、细胞与基质间联系的建立。然而, *paxB*的缺失导致细胞向尖端的迁移受到严重抑制, 这也暗示了*paxB*在盘基网柄菌多细胞发育形成尖端结构的细胞定向运动过程中发挥了重要功能。

2.2 *paxB*突变株随机运动能力增强

基于*paxB*突变株在多细胞发育过程中出现的表型, 本研究进一步对*paxB*突变株的随机运动进行了探究。将野生型细胞AX2和*paxB*突变株进行饥饿处理3 h后, 实时录像记录细胞在30 min内的运动轨迹, 利用ImageJ软件分析发现, 野生型细胞AX2在随机运动情况下, 细胞的方向性指数为 0.03 ± 0.03 , 方向持续性指数



将饥饿处理的初始浓度为 1×10^{10} 个/L(约 6.5×10^5 个/ cm^2)的AX2细胞或*paxB*⁻突变株细胞分别铺到缺乏营养的DB琼脂平板上,并在特定时间点用体视显微镜拍照记录。

AX2 or *paxB*⁻ cells were plated at the beginning of starvation at a concentration of 1×10^{10} cell/L on non-nutrient DB agar ($\sim 6.5 \times 10^5$ cell/ cm^2). Images were taken at indicated time points with stereomicroscope.

图1 AX2和*paxB*⁻细胞在DB琼脂平板上的多细胞发育表型

Fig.1 Developmental phenotypes of AX2 and *paxB*⁻ cells on the DB agar

为 0.26 ± 0.01 , 平均轨迹速度为 $(2.16 \pm 0.05) \mu\text{m}/\text{min}$, 平均位移速度为 $(0.55 \pm 0.03) \mu\text{m}/\text{min}$; *paxB*⁻突变株在随机运动情况下, 细胞的方向性指数为 0.01 ± 0.04 , 方向持续性指数为 0.28 ± 0.01 , 平均轨迹速度为 $(3.36 \pm 0.04) \mu\text{m}/\text{min}$, 平均位移速度为 $(0.91 \pm 0.03) \mu\text{m}/\text{min}$ (图2)。随机运动统计数据表明, *paxB*⁻突变株的平均轨迹速度显著高于野生型细胞AX2, 说明*paxB*在盘基网柄菌细胞运动中发

挥抑制作用。

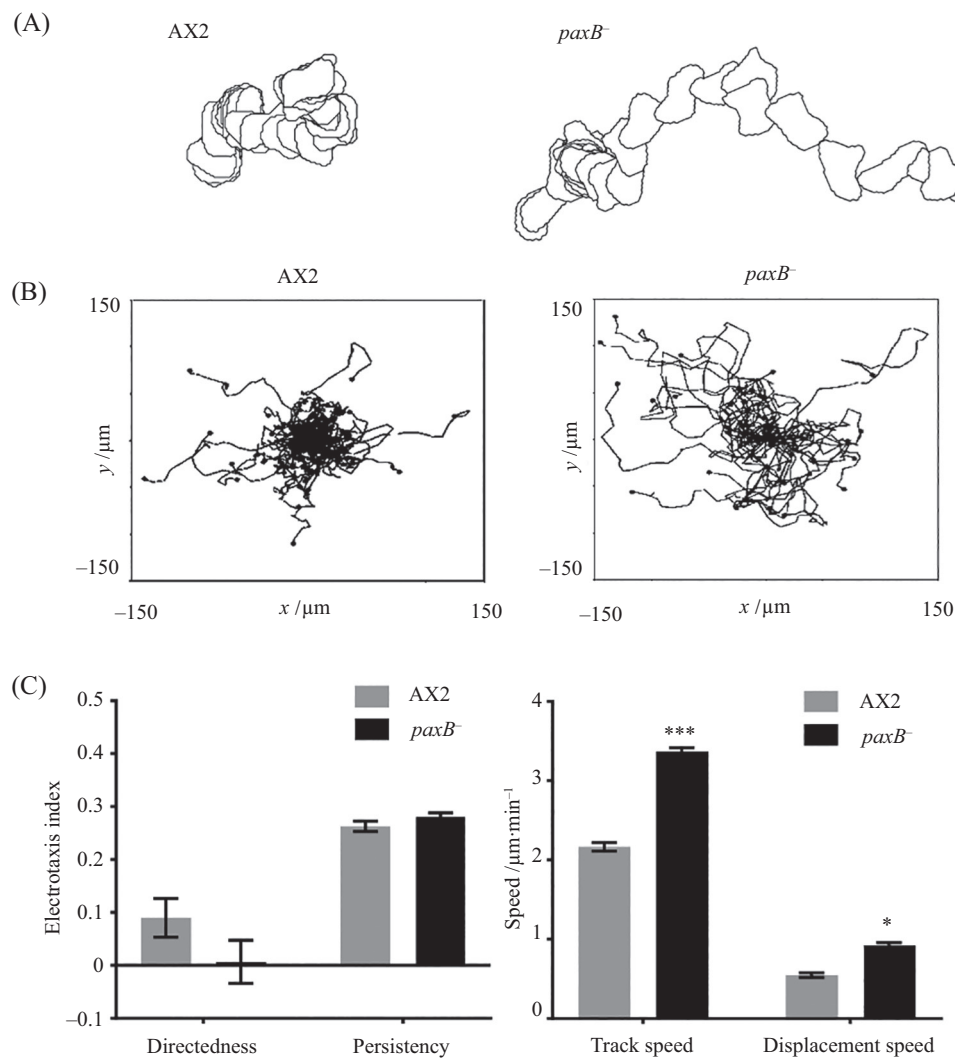
2.3 *paxB*⁻突变株趋电性运动减弱

为了进一步探究*paxB*对细胞响应电场的作用, 本研究将饥饿极化后的*paxB*⁻突变株细胞置于直流电场中, 并定量分析*paxB*⁻突变株细胞的运动特征, 结果发现在场强为12 V/cm的直流电场刺激下, *paxB*⁻的趋电性指数为 0.33 ± 0.03 , 与野生型细胞的趋

电性指数 0.83 ± 0.01 相比差异极显著(图3)($P < 0.001$)。方向持续性指数也有所下降, 即野生型细胞的方向持续性指数为 0.41 ± 0.01 , 而 *paxB* 细胞的方向持续性指数为 0.32 ± 0.01 , 二者之间也存在差异($P < 0.05$)。然而, *paxB* 细胞在直流电场中的平均轨迹速度反而显著增加了, 统计结果显示, *paxB* 的平均轨迹速度为 $(6.20 \pm 0.05) \mu\text{m}/\text{min}$, 而野生型细胞的平均轨迹速度只有 $(4.50 \pm 0.05) \mu\text{m}/\text{min}$, 但是位移速度差异不显著。以上结果表明, *paxB* 基因在盘基网柄菌细胞感知和传递电信号过程中发挥重要作用, 可以用于研究肿瘤细胞对肿瘤生物电场的响应机制及应对策略。

2.4 *paxB* 缺失导致 ERK 蛋白高表达

研究证实 ERK(extracellular signal-regulated kinase)信号通路与细胞趋电性迁移息息相关, 本研究对 *paxB* 细胞株中的 ERK1/2 的磷酸化水平进行了检测(图4)。结果发现, *paxB* 细胞株中的 ERK1 和 ERK2 的磷酸化水平明显比野生型细胞中的磷酸化水平高, 受直流电刺激 1 min 后, ERK1 和 ERK2 的磷酸化水平有下降趋势, 但经电信号刺激 5 min 后, 二者的磷酸化水平又上升到最高, 即便再延长直流电刺激时间到 10 min, ERK1 和 ERK2 的磷酸化水平仍几乎保持不变, 说明细胞响应电场是一个适应的过程。

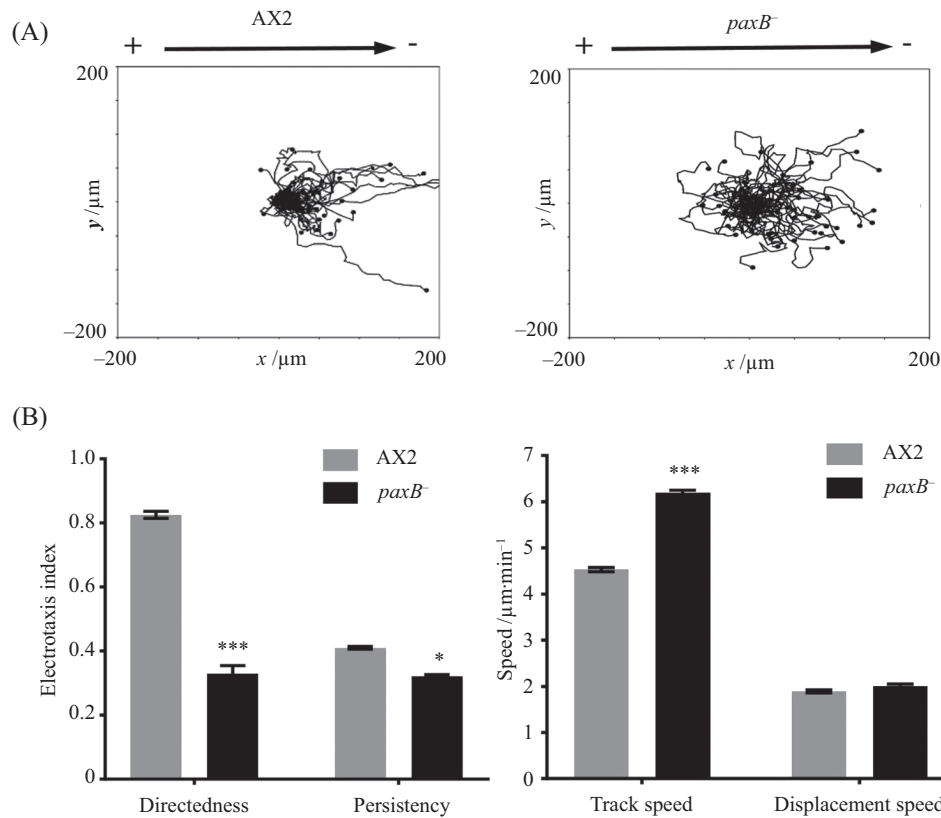


A: 随机运动的AX2和*paxB*突变株细胞30 min内的轮廓叠加图。B: AX2和*paxB*突变株细胞随机迁移的轨迹图。每个细胞的起始位置被定义为0, 每一条曲线代表一个细胞的运动轨迹。C: 细胞迁移定量分析。*t*检验分析野生型和*paxB*突变株细胞之间的数据差异性, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: profile analysis of AX2 and *paxB*⁻ mutant cells under random migration. B: migration trajectories plots of AX2 and *paxB*⁻ in which the start point of each cell is set as zero. Each curve represents the migration trajectory of a single cell. C: quantitative analysis of cell migration. Significant differences are calculated from the data of wild-type cells and *paxB*⁻ mutant cells by *t*-test. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

图2 AX2和*paxB*突变株细胞的随机运动特征

Fig.2 The characterizes of AX2 and *paxB*⁻ in random migration



A: AX2和*paxB*⁻细胞在12 V/cm电场中运动的轨迹图, 每个细胞的起始位置被定义为0, 每条线代表一个细胞运动轨迹。B: AX2和*paxB*⁻细胞趋电性运动的定量分析统计图。*t*检验分析野生型和*paxB*⁻突变株细胞之间的数据差异性, **P*<0.05, ****P*<0.001。

A: migration trajectory plot of AX2 and *paxB*⁻ cells under a DC EF at 12 V/cm in which the start point of each cell is set as zero. Each curve represents the migration trajectory of a single cell. B: quantification analyses of electrotaxis of AX2 and *paxB*⁻ cells. Significant differences are calculated from the data of wild-type cells and *paxB*⁻ mutant cells by *t*-test. **P*<0.05, ****P*<0.001.

图3 AX2和*paxB*⁻细胞的趋电性

Fig.3 Electrotaxis of AX2 and *paxB*⁻ cells

肌球蛋白是依赖于微丝运动的分子马达, 在变形细胞运动过程中, 肌球蛋白位于细胞迁移方向的末端, 通过调控细胞收缩使细胞发生迁移。蛋白质印迹实验表明(图4), 在不受电信号刺激时, 野生型细胞AX2中的RLC(regulatory light chain)磷酸化水平较低, 随着电信号的刺激, 其表达量会突然增加, 但却不是时间依赖的; 而在*paxB*⁻细胞中, 不受电信号刺激时的RLC磷酸化水平已经与接受电信号刺激时几乎一致, 随着电信号的刺激, 其表达量却不会发生改变。这暗示了细胞运动时尾部的收缩或解除黏连受肌球蛋白和桩蛋白的调控, 二者之间存在互补机制。

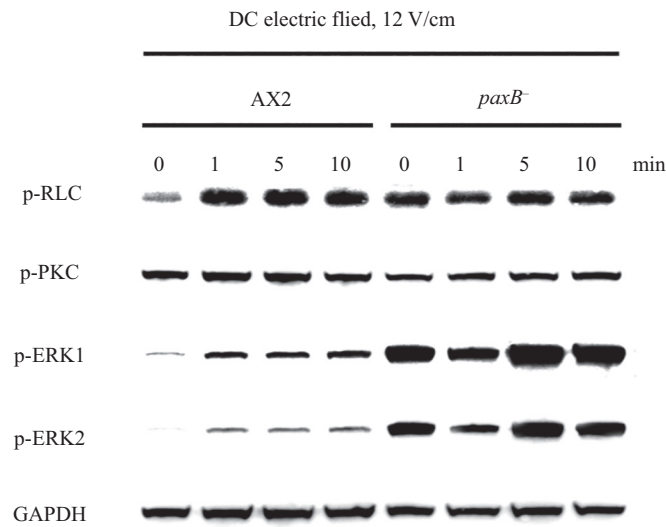
蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是Ca²⁺和磷脂酰丝氨酸依赖性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 具有广泛的作用底物, 并参与许多的生理过程, 如细胞分泌、肌肉收缩等、细胞增殖、细胞分化等。在静息细胞中,

PKC以非活性形式存在于细胞质中, 当细胞接受外界信号刺激时, PKC与Ca²⁺结合并转位到质膜上被活化。本研究发现(图4), 野生型细胞和突变株细胞中的PKC已经被活化, 其原因可能是这两种细胞都已经接受了3 h左右的饥饿刺激, 导致PKC的活化, 当增加电信号刺激时, 细胞中PKC的磷酸化水平变化不大。

2.5 电场刺激对盘基网柄菌PaxB磷酸化位点的影响

为了探究桩蛋白调控细胞运动与磷酸化的关系, 本项研究首先基于基因组分析了盘基网柄菌的基因*paxB*与哺乳动物桩蛋白的同源性。利用DNA-MAN软件对的人类的桩蛋白Paxα和盘基网柄菌PaxB蛋白进行序列比对, 结果如图5所示, Paxα蛋白包含557个氨基酸, N-端主要由富含亮氨酸的5个LD模体组成; C-端包含4个呈串联结构的富含半胱氨酸的LIM结构域。盘基网柄菌PaxB蛋白结构包含569个

(A)



(B)

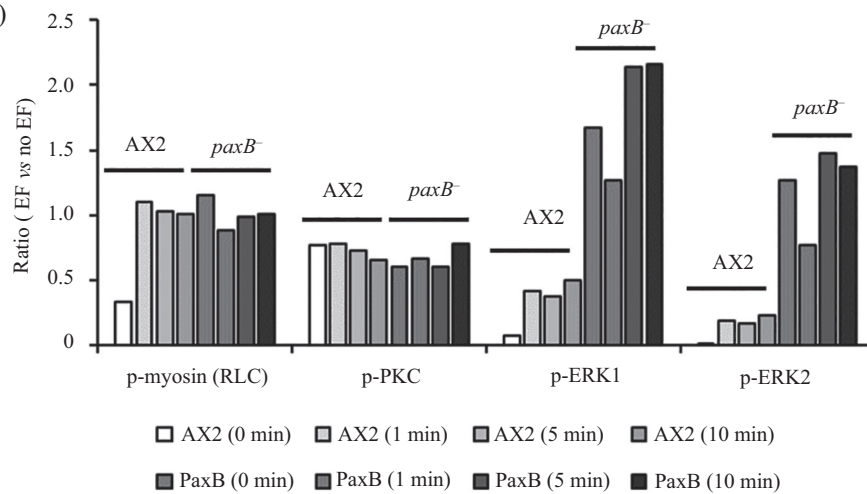


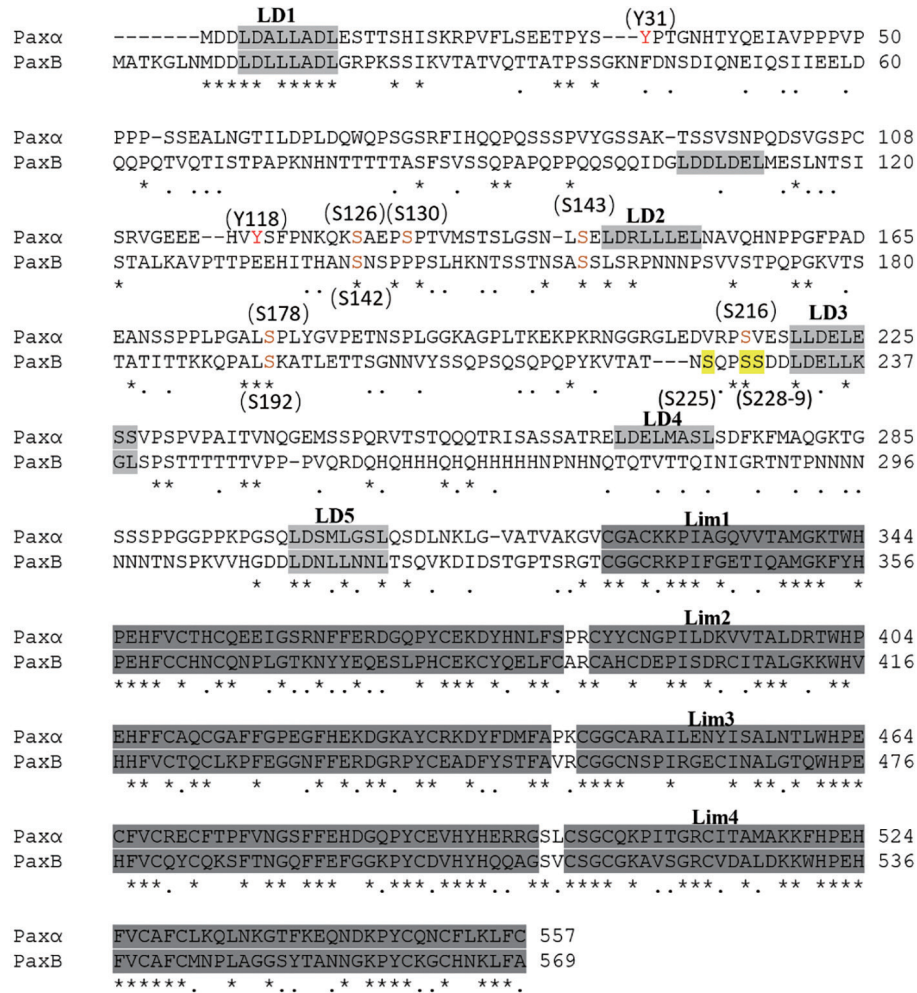
图4 直流电场刺激下AX2和*paxB*⁻突变株细胞的ERK1/2、RLC和PKC磷酸化水平的Western blot分析
Fig.4 Western blot analysis of phosphorylation of ERK1/2, RLC and PKC in AX2 and *paxB*⁻ cells under an DC EF

氨基酸, 其中含有4个保守的LD结构域(LD1、LD2、LD3和LD5)和4个高度保守的LIM结构域(Lim1、Lim2、Lim3和Lim4), 其中, LD模体主要发挥识别作用, 能够与多种信号分子(如激酶和G蛋白)结合, LIM结构域则定位于肌动蛋白细胞骨架上, 功能上与许多其他蛋白质发挥相互作用。然而, PaxB缺乏脊椎动物中高度磷酸化的酪氨酸残基 Y31和 Y118^[18], 这两个位点分别是黏着斑激酶和 Src激酶的结合靶点, 但 PaxB中存在一些保守的丝氨酸磷酸化位点, 例如 S192(哺乳动物中是 S178, 为 Jun激酶的磷酸化位点, 并在细胞迁移中发挥重要作用)和 S160(哺乳动物中是 S143, 是 ERK潜在的磷酸化位点)。令人意外的是, 通过蛋白质组学分析发现, 在使用场强为 12 V/cm的

直流电场刺激盘基网柄菌细胞后, 并未检测到 PaxB 的保守位点的磷酸化, 但 LD3保守结构域附近的3个丝氨酸位点(S225、S228和S229)都发生了去磷酸化, 与不加电刺激的对照组相比, 它们的去磷酸化比值分别为0.936、0.817和0.923。以上差异表明, 尽管盘基网柄菌中的桩蛋白与人类桩蛋白基因存在同源性, 但不仅发挥作用的磷酸化位点差异较大, 而且蛋白质折叠形成的高级结构也会影响其发挥功能。

3 讨论

在脊椎动物发育过程中, 桩蛋白酪氨酸残基的磷酸化受胚胎发育的调节, 并在控制细胞和组织细胞结构重排中发挥重要作用。研究发现, 在鸡胚发育过程



“*”表示位点氨基酸残基相同。“.”表示该位点的氨基酸残基不同。

“*” indicates that the amino acid residues at the site are the same. “.” indicates that the amino acid residues at the site are different.

图5 盘基网柄菌与人的桩蛋白线性序列比较

Fig.5 Alignment of *Dictyostelium discoideum* PaxB and human Paxα

中, 尽管桩蛋白的总体水平基本保持不变, 但其磷酸化酪氨酸含量显著降低, 在早期胚胎中, 大约20%的桩蛋白磷酸化发生在酪氨酸残基上, 相反, 桩蛋白的酪氨酸磷酸化在成年鸡中检测不到, 在大鼠胚胎中也发现了类似的含磷酸酪氨酸的蛋白质谱^[19]。机理研究表明, 桩蛋白通过控制黏连蛋白的动力学、细胞迁移和扩散来调节胚胎发育事件, 其重要证据就是桩蛋白缺失在小鼠胚胎中是致死的^[13]。盘基网柄菌细胞尽管没有明确的类整合素黏附分子, 但含有许多似乎负责细胞基质黏附的黏附受体。在盘基网柄菌多细胞发育阶段, 细胞一旦开始分泌各自的细胞外基质, *paxB*的功能就变得更为重要。在后期阶段, 细胞通过细胞-细胞和细胞底物的相互作用在彼此的下方和上方移动, 而*paxB*的缺失导致盘基网柄菌后期发育严重缺陷, 表明*paxB*在多细胞发育过程中发挥重要作用。

哺乳动物细胞中, 桩蛋白是细胞极化迁移所必需的, 敲低桩蛋白表达的细胞的运动能力减弱, 而本研究发现, 盘基网柄菌细胞中桩蛋白在细胞极化迁移中似乎并不重要。在细胞响应胞外电信号过程中, 桩蛋白的作用又尤为保守, 例如, 本研究中*paxB*突变株在12 V/cm作用下, 细胞的趋电性显著减弱, 而在角化细胞的趋电性迁移中, 研究者也发现敲低桩蛋白的表达的细胞株趋电性显著减弱^[20], 说明在调控细胞运动能力方面, 桩蛋白的作用可能因物种不同而存在一些差异。

桩蛋白作为一种多功能、多结构域的接头蛋白, 在哺乳动物细胞的黏着斑中发挥重要的脚手架作用, 并通过磷酸化特定的Tyr和Ser残基募集参与细胞运动和迁移的结构和信号分子。在肿瘤细胞中, 研究者们观察到抑制桩蛋白Y118磷酸化可以抑制肿瘤细

胞侵袭伪足的形成^[21]。然而,一些因子或信号却也能引起桩蛋白的脱磷酸化,例如促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、EGF、胰岛素(insulin)、IGF-1和氧化亚氮(nitric oxide)等,但桩蛋白的脱磷酸化是否有相反作用却尚未证实^[11]。

模式生物盘基网柄菌中不存在哺乳动物中桩蛋白的保守位点Y31和Y118,因为盘基网柄菌属不含有明显的黏着斑激酶或Src相关激酶的同源物^[18]。但PaxB也有一些保守的丝氨酸位磷酸化点,例如,S192(*paxA*中是S178,是哺乳动物细胞中JNK潜在磷酸化位点)、S142和S146(*paxA*中分别是S126和S130,是Raf-Mek-Erk依赖的磷酸化位点)等,盘基网柄菌中的研究表明,将S192突变并不影响细胞和蛞蝓体的迁移^[18],说明这些磷酸化位点与细胞黏附和运动关联性不大,但蛋白质功能的发挥还要综合考虑其高级结构。本项研究表明,直流电场刺激仅仅引起盘基网柄菌细胞桩蛋白LD3保守结构域附近的3个丝氨酸位点发生脱磷酸化,然而,这些脱磷酸是否与盘基网柄菌细胞趋电性运动的改变息息相关,还需要进一步的实验验证。根据ERK1/2在细胞趋电性运动中的关键性,即ERK1调控盘基网柄菌的运动能力^[22],ERK2调控细胞对电场的响应^[23],该研究中*paxB*突变株高表达ERK1和ERK2可能是导致其运动能力增强而趋电性运动减弱的关键原因,但具体的调控蛋白需要进一步探究和证明。

4 结论

桩蛋白在盘基网柄菌多细胞发育中发挥重要作用,并通过ERK信号通路调控细胞响应胞外电信号,从而指导细胞定向运动。

参考文献 (References)

- [1] FARBER P L, ISOLDI F C, FERREIRA L M. Electric factors in wound healing [J]. *Adv Wound Care*, 2021, 10(8): 461-76.
- [2] RYAN C N M, DOULGEROGLOU M N, ZEUGOLIS D I. Electric field stimulation for tissue engineering applications [J]. *BMC Biomed Eng*, 2021, 3(1): 1.
- [3] LI L, ZHANG K, LU C, et al. Correction: Caveolin-1-mediated STAT3 activation determines electrotaxis of human lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(46): 28291.
- [4] HUANG C W, CHEN H Y, YEN M H, et al. Gene expression of human lung cancer cell line CL1-5 in response to a direct current electric field [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25928.
- [5] LIU W, HUANG X, LUO W, et al. The role of paxillin aberrant expression in cancer and its potential as a target for cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8245.
- [6] 杨东梅, 于红刚. Paxillin在消化系统恶性肿瘤发生发展中的研究进展[J]. 疑难病杂志(YANG D M, YU H G. The research progress of Paxillin in digestive system malignant tumors [J]. *Chinese Journal of Difficult and Complicated Cases*), 2018, 17(4): 424-7,32.
- [7] PASQUIN S, SHARMA M, GAUCHAT J F. Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism [J]. *Cytokine*, 2016, 82: 122-4.
- [8] HU Y L, LU S, SZETO K W, et al. FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 6024.
- [9] KAWADA I, HASINA R, LENNON F E, et al. Paxillin mutations affect focal adhesions and lead to altered mitochondrial dynamics: relevance to lung cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(7): 679-91.
- [10] 金雯, 王波, 杨梅, 等. 桩蛋白表达对裸鼠肝癌细胞增殖的影响[J]. 新乡医学院学报(JIN W, WANG B, YANG M, et al. Effect of paxillin expression on proliferation of hepatocellular carcinoma cells in nude mice [J]. *Journal of Xinxiang Medical University*), 2019, 36(3): 224-7,33.
- [11] 许文集, 陈玉丽, 庄则豪. Paxillin及其在肿瘤转移中的作用[J]. 医学综述(XU W J, CHEN Y L, ZHUANG Z H. Paxillin and its role in tumor metastasis [J]. *Medical Recapitulation*), 2007(3): 198-200.
- [12] HAGEL M, GEORGE E L, KIM A, et al. The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(3): 901-15.
- [13] LOPEZ-COLOME A M, LEE-RIVERA I, BENAVIDES-HIDALGO R, et al. Paxillin: a crossroad in pathological cell migration [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 50.
- [14] MOIK D, BOTTCHE A, MAKHINA T, et al. Mutations in the paxillin-binding site of integrin-linked kinase (ILK) destabilize the pseudokinase domain and cause embryonic lethality in mice [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(26): 18863-71.
- [15] GAO R, ZHAO S, JIANG X, et al. A large-scale screen reveals genes that mediate electrotaxis in *Dictyostelium discoideum* [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(378): ra50.
- [16] 蒋锐达, 王家家, 赵三军, 等. gbpC和gbpD基因在盘基网柄菌细胞趋化性和趋电性运动中的差异研究[J]. 生物化学与生物物理进展(JIANG R D, WANG J J, ZHAO S J, et al. gbpC and gbpD have differential effects on chemotaxis and electrotaxis in *Dictyostelium* [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2022, 49(8): 1520-9.
- [17] 葛晓雪, 蒋锐达, 王晓燕, 等. 磷脂酰肌醇3激酶通过Akt和ERK抑制盘基网柄菌细胞的趋电性[J]. 生物化学与生物物理进展(GE X X, JIANG R D, WANG X Y, et al. Phosphatidylinositol 3-kinases play a suppressive role in electrotaxis of *Dictyostelium* cells through Akt and ERK [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*), 2024, 51(3): 685-95.
- [18] BUKHAROVA T, WEIJER G, BOSGRAAF L, et al. Paxillin is required for cell-substrate adhesion, cell sorting and slug migration during *Dictyostelium* development [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 18): 4295-310.
- [19] TURNER C E. Paxillin is a major phosphotyrosine-containing protein during embryonic development [J]. *J Cell Biol*, 1991,

- 115(1): 201-7.
- [20] LIU L, LIU X, CHEN Y, et al. Paxillin/HDAC6 regulates microtubule acetylation to promote directional migration of keratinocytes driven by electric fields [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2023, 1871(2): 119628.
- [21] 张巍, 王春晖, 许丹, 等. FAK/Paxillin信号通路参与调节乳腺癌细胞侵袭伪足形成[J]. *临床军医杂志*(ZHANG W, WANG C H, XU D, et al. Effects of FAK/paxillin signal pathway on invadopodia formation of breast cancer cells [J]. *Clinical Journal of Medical Officers*), 2015, 43(5): 536-9.
- [22] 葛晓雪, 蒋锐达, 王晓燕, 等. 基于CRISPR-Cas9介导敲除盘基网柄菌 *erkA* 基因的方法建立和 *erkA* 趋电性研究 [J]. *云南师范大学学报(自然科学版)*(GE X X, JIANG R D, WANG X Y, et al. Establishment of *erkA* gene knockout system in *Dictyostelium discoideum* based on CRISPR/Cas9 and exploration of *erkA* in electrotaxis [J]. *Journal of Yunnan Normal University, Natural Sciences Edition*), 2023, 43(3): 45-51.
- [23] HU M, LI H, ZHU K, et al. Electric field modulation of ERK dynamics shows dependency on waveform and timing [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 3167.