

直流电场刺激对盘基网柄菌细胞伪足的影响

丁雪 付羽佳 施利民 陈晓波 高润池*

(云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500)

摘要 受多种胞外信号影响的细胞定向运动对多细胞有机体的许多重大生理和病理过程十分重要。该实验旨在探究直流电场刺激对模式生物盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*)细胞伪足形成和动态行为的影响。通过对细胞进行不同时间的饥饿处理, 给不同极化程度的盘基网柄菌细胞施加不同强度的直流电场, 随后利用ImageJ/Quimp3软件定量分析细胞的趋电性和细胞的伪足数量、类型、空间分布以及新生伪足的伸展角度。结果显示, 盘基网柄菌细胞的运动能力与细胞饥饿诱导的极化程度和外源直流电场强度呈正相关。直流电场刺激不改变伪足的数量和类型, 但可以使细胞的伪足出现不对称空间分布, 同时会增加伪足的延伸速率。细胞极化是细胞运动的基础, 直流电场刺激指导细胞发生定向运动可能与新生伪足的伸展角度有关。该研究可为利用伪足形成治疗细胞定向运动缺陷引起的疾病提供理论参考。

关键词 盘基网柄菌; 趋电性; 伪足; 直流电场

Effect of Direct Current Electric Field Stimulation on Cell Pseudopods of *Dictyostelium discoideum*

DING Xue, FU Yujia, SHI Limin, CHEN Xiaobo, GAO Runchi*

(College of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

Abstract The directional movement of cells affected by a variety of extracellular signals is very important for many major physiological and pathological processes of multicellular organisms. The purpose of this study was to investigate the effect of direct current electric field stimulation on the pseudopod formation and dynamic behavior of model organism *Dictyostelium discoideum*. DC electric fields with different intensities were applied to *Dictyostelium discoideum* cells with different degrees of polarization. ImageJ/Quimp3 software was used to quantitatively analyze the electrotaxis of cells, the number, type, spatial distribution of pseudopods, and the extension angle of new pseudopods. It showed that the motility of *Dictyostelium discoideum* cells was anodely correlated with the degree of polarization induced by cell starvation and the intensity of exogenous DC electric field. DC electric field stimulation does not change the number and type of pseudopods, but it can make the pseudopods of the cells have asymmetric spatial distribution, at the same time, it will increase the extension rate of the pseudopods. Cell polarization is the basis of cell movement, and the directional movement of cells guided by DC electric field stimulation may be related to the extension angle of new pseudopods. This study can provide a theoretical reference for the treatment of diseases caused by cell directional movement defects by using pseudopod formation.

Keywords *Dictyostelium discoideum*; electrotaxis; pseudopods; direct current electric field

收稿日期: 2025-05-14

接受日期: 2025-08-08

国家自然科学基金(批准号: 32260224)和云南省科技厅科技计划(批准号: 202401AT070098)资助的课题

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

Received: May 14, 2025

Accepted: August 8, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32260224) and the Yunnan Provincial Science and Technology Department Plan (Grant No.202401AT070098)

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

细胞定向迁移是动物细胞的关键生物学行为之一,在胚胎发生、免疫防御、组织修复及肿瘤转移等生理病理过程中发挥关键作用。有研究表明,重组人III型胶原蛋白(recombinant human collagen type III, r-hCOL3)通过促进伪足形成和增强细胞运动性,显著改善细胞迁移能力^[1]。可见伪足的形成和伸展是细胞发生运动的前提和基础,随着伪足的定向延伸,细胞质心随之移动,推动整个细胞发生定向迁移,可以说伪足不仅是细胞运动的“驱动力”,更是细胞运动定向性的核心调控者^[2]。

有研究发现,伪足延伸的时空动态受Ras激活和分支F-肌动蛋白形成的协同调控^[3]。关于伪足的形成,研究者有不同的观点,比如,ANDREW和IN-SALL^[4]发现,伪足的形成很少从头合成,而通常是由现有伪足分裂产生的;而VAN HAASSTERT^[5]发现伪足既可依赖现有伪足分裂,也可以在一段时间内没有参与伪足延伸的细胞表面部分形成伪足,并提出这种双重调控模式使细胞能够快速响应复杂微环境信号。伪足伸展方向与速率受多个信号通路的调控,例如Rho GTPases^[6]、PI3K-Akt^[7]等,这些信号通路的交互作用使得细胞能够综合地响应外部各种物理和化学信号,进而调节伪足的伸展方向和速度^[8]。因此,深入解析细胞迁移的分子调控网络,对于揭示疾病发生机理及开发新型治疗策略具有重要理论价值与临床意义。

生物电信号作为指导细胞定向迁移的关键因子,是生物体内来自离子通道、离子泵和电突触的内源性电流的集合,由带电粒子跨膜流动产生。研究表明,生物电在指导细胞定向运动导致的伤口愈合中发挥主导作用^[9]。近年来的许多研究也表明电场在指导细胞定向运动的疾病治疗策略中潜力巨大,然而,人们对电信号如何引起细胞发生定向运动的分子机制并不清楚。盘基网柄菌是一种模式生物,具有典型真核细胞特征^[10],它被广泛用于研究分化、信号转导、吞噬作用、胞质分裂和细胞运动等基本方面^[11]。特别在研究肌动蛋白细胞骨架及非肌肉细胞的趋化运动方面,提供了丰富的实验材料和理论支持^[12]。本研究以盘基网柄菌为研究对象,探究饥饿诱导的细胞极化[0 h(营养状态)、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h]与运动能力的关系,以及不同程度的细胞极化对胞外直流电场的响应。最后对电信号指导细胞伪足的生成和性质进行定量分析,确定细胞响应

电信号发生定向运动过程中伪足的变化情况,为揭示细胞响应电信号的分子机制提供有力补充,同时为利用伪足形成治疗细胞定向运动缺陷引起的疾病提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 细胞和培养基

野生型盘基网柄菌细胞(AX2)的培养步骤如下。HL5培养基:40 g葡萄糖、40 g示蛋白胨、20 g酵母粉、3.86 g磷酸氢二钠、1.94 g磷酸二氢钾、0.12 g硫酸链霉素,蒸馏水定容至4 L, pH6.5; 121 °C高温蒸汽灭菌30 min。发育缓冲液(developmental buffer, DB)如下。先配制10×磷酸盐缓冲液母液:12.695 g磷酸氢二钠、6.803 g磷酸二氢钾,蒸馏水定容至1 L;使用时配制1×DB:100 mL 10×磷酸盐缓冲液、0.2 mL 1 mol/L氯化钙、1 mL 2 mol/L硫酸镁,双蒸水定容至1 L。10×Steinberg's溶液:580 mmol/L氯化钠、6.7 mmol/L氯化钾、4.4 mmol/L硝酸钙、13 mmol/L硫酸镁、46 mmol/L三羟甲基氨基甲烷,蒸馏水定容至1 L, pH7.5~7.7;使用时用蒸馏水稀释10倍。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将-80 °C冻存的盘基网柄菌细胞于22 °C恒温条件下解冻,接种至盛有10 mL新鲜HL5培养基的培养皿中,22 °C条件下使细胞过夜恢复后,弃去原有培养基,加入10 mL新鲜HL5培养基,利用微量移液枪反复吹打使细胞均匀悬浮。为确保实验一致性,细胞需连续传代培养至少3次(传代间隔24 h,密度控制在 2×10^7 /mL)并到指数生长期,方可进行后续实验(方法见参考文献[13])。

1.2.2 饥饿细胞处理 取对数生长期的细胞(1.5×10^5 /mL)接种至24孔板,4 °C过夜培养。弃去24孔板中的HL5培养基,用1×DB缓冲液清洗细胞3次,以彻底去除残留的HL5培养基。随后将细胞浸泡在1×DB缓冲液中使其饥饿处理。根据实验需求,取不同饥饿处理时间点(0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)的细胞进行趋电性实验。

1.2.3 细胞趋电性研究 将饥饿处理后的细胞用1 mL 1×DB缓冲液吹悬浮,吸取5 μL细胞悬液接种至加电小室中,静置贴壁5 min以确保细胞充分附着。覆盖盖玻片,向小室内注入1×DB缓冲液。采用盐桥(琼脂-氯化钾溶液)连接电刺激小室两端,通过直流电

源分别施加 3 V/cm、6 V/cm、9 V/cm 及 12 V/cm 的电场强度, 以不加电场的样本作为对照组。使用配备 CCD 相机的倒置显微镜(Nikon 公司)实时观测细胞迁移行为。将细胞调至视野中央(约 200 个细胞/视野), 随后以 10 倍物镜进行拍摄, 频率为 1 min/帧, 连续采集 30 min 的图像。每组实验至少重复 3 次, 统计细胞总数为 150 个。

1.2.4 伪足分析 将饥饿 4 h 的 AX2 细胞种植在趋电小室中, 并对小室分别施加 3 V/cm、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm 电压以及不施加电场作为对照组, 利用徕卡显微镜 LEICA DMI8 3D(LEICA DFC9000 GT 相机, LAS X 3D 成像系统)实时录像系统, 在 40 倍物镜下对细胞的形态变化进行捕捉, 频率为 2 s/帧, 持续时间 5 min, 每组实验至少重复 3 次, 统计细胞数为 10 个。将所得数据使用 ImageJ/Quimp3 软件对伪足进行详细分析, 方法可参考文献[14]。

1.3 数据分析

使用图像处理和分析软件 ImageJ/Quimp3 对伪足进行详细分析, 深入探究盘基网柄菌趋电性机制。Quimp3 是一个专门用于运动细胞伪足分析的工具, 能够自动检测并追踪细胞伪足的动态变化。该软件将细胞的轮廓以节点的方式描绘, 通过比较节点在地点和时间上的位置, 来获得节点包含位置、局部曲率和运动速度等信息。通过这种方式, Quimp3 不仅能够量化伪足的伸展尺寸、表面积和寿命, 还能分析伪足的伸展频率、方向性以及伪足在细胞中的生命周期等定量数据。此外, Quimp3 还能够基于伪足的形成过程, 将其分为原生型伪足和裂生型伪足两种类型, 进而进一步了解这些不同类型伪足在细胞运动中的作用和机制。通过该软件的分析, 使我们从更微观的角度来分析影响细胞趋电性的原因与机制, 进而深入理解盘基网柄菌如何通过伪足的变化实现对电场的感知与响应。

其中伪足大小是指伪足从起始位置到终止位置的距离, 可以通过以下公式计算: $s = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2}$ 。其中 x_1 、 y_1 为伪足延伸开始时的位置坐标, x_2 、 y_2 为伪足延伸结束时的位置坐标。伪足的大小反映了伪足在细胞表面上所占的空间, 可以提供有关伪足扩展程度和形态的信息。伪足延伸时间是指伪足从开始延伸到结束延伸所经历的时间。假设伪足在第 t_1 帧开始延伸, 第 t_2 帧结束延伸, 则伪足的延伸时间 t 可以通过以下公式计算:

$t = (t_2 - t_1) \times 2$ 。其中, t_1 和 t_2 分别为伪足延伸开始和结束的帧时间。此公式中的因子“2”是为了考虑每帧图像的时间间隔, 以确保计算得到的延伸时间单位与实际时间相符。伪足延伸速率描述的是伪足在延伸过程中的速度, 即单位时间内伪足扩展的距离, 其计算公式为: $R = \frac{s}{t}$, 其中, s 为伪足的大小, t 为伪足的延伸时间。伪足延伸速率反映了细胞在运动过程中伪足的活跃程度, 速率较高通常意味着细胞对电场的响应较为迅速, 或者细胞内的动力学机制较为高效。本研究采用 SPSS Statistics 26.0 软件进行统计学分析。所有实验数据均经过正态性检验, 符合正态分布的计量资料以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对于两组间比较, 选用 t 检验, 设定显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 饥饿时间梯度与电压梯度对细胞的协同作用

2.1.1 细胞运动能力与饥饿时间呈正相关 盘基网柄菌细胞生命周期中, 当环境中营养物质缺乏时, 一些“中心”细胞会优先向环境中分泌 cAMP, 周围的细胞感知 cAMP 浓度后, 自身也开始分泌, 同时将发生朝向高浓度 cAMP 的“中心”迁移。本研究观察了不同饥饿时间(0 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)的野生型盘基网柄菌细胞形态, 结果如图 1A 所示, 饥饿处理早期的细胞呈近球形, 并没有明显的“头部”和“尾部”, 然而, 随着细胞饥饿时间的延长, 细胞的形态发生显著变化, 尤其在饥饿 4 h 和 5 h 后, 细胞的“长条形”形态更为明显, 表明细胞已经发生了极化。

对不同饥饿时间的 150 个细胞的运动能力进行定量分析, 结果如图 1B 所示, 营养状态(0 h)、饥饿 1 h 和饥饿 2 h 的细胞运动能力都很弱, 尤其在饥饿的早期阶段, 细胞的运动能力反而不如营养细胞, 究其原因可能是细胞对新环境的适应是一个由内而外的过程。此外, 这些细胞具有较低的位移速度表明细胞几乎就在原地附近运动, 而随着细胞的不断极化, 细胞不仅展示出运动能力增强, 细胞的运动范围也逐渐扩大, 细胞在饥饿 4 h 后的平均轨迹速度和平均位移速度分别为 $(6.48 \pm 0.36) \mu\text{m}/\text{min}$ 和 $(2.54 \pm 0.28) \mu\text{m}/\text{min}$, 饥饿 5 h 后的细胞平均轨迹速度和平均位移速度分别为 $(6.32 \pm 0.35) \mu\text{m}/\text{min}$ 和 $(2.56 \pm 0.28) \mu\text{m}/\text{min}$ 。研究还发现, 饥饿 5 h 的细胞已经开始聚集, 且对胞外直流电信号的响应开始下降, 其原因可能是细胞在缺乏营养时, 更倾向于完成多细胞子实体的发育, 这

个阶段中细胞对胞外除cAMP信号之外的其他信号反应较弱,是一种细胞的本能选择。

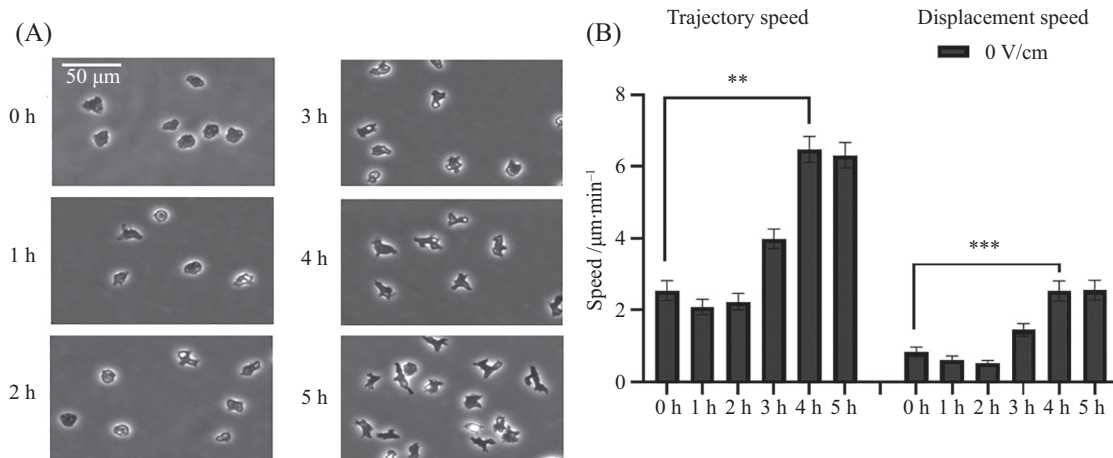
2.1.2 电场强度依赖的趋电性运动 基于细胞运动能力与饥饿处理时长的关系,本研究将利用饥饿处理3 h和4 h的细胞作为研究对象,探究电场强度对细胞定向迁移的影响,为此,对5个不同电压强度[无电场环境(NO EF, 0 V/cm)、3 V/cm、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm]下饥饿3 h和4 h的150个细胞的定向运动进行了分析,结果发现,饥饿3 h或是4 h的细胞都能够响应电场发生朝向电场负极的趋电性运动,并且都是以电压依赖的运动方式(图2)。对细胞的趋电性运动进行定量分析,结果显示,饥饿3 h的细胞在NO EF、3 V/cm、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm的方向指数分别为 (0.04 ± 0.05) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.24 ± 0.04) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.46 ± 0.04) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.80 ± 0.03) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.86 ± 0.02) $\mu\text{m}/\text{min}$;饥饿4 h的细胞在NO EF、3 V/cm、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm的方向指数分别为 (0.07 ± 0.04) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.34 ± 0.04) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.62 ± 0.04) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.84 ± 0.03) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (0.90 ± 0.02) $\mu\text{m}/\text{min}$;从数据中可以看出,饥饿3 h时,细胞的方向性随着电压增加也随之增加,细胞朝向电场负极的运动轨迹更笔直(图3),表明细胞对电场的响应越强烈。对细胞运动能力的定量分析发现,饥饿3 h的细胞在NO EF、3 V/cm、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm的平均运动速度分别为 (3.72 ± 0.24) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (4.80 ± 0.29) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (4.69 ± 0.24) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (4.48 ± 0.19) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (5.07 ± 0.24) $\mu\text{m}/\text{min}$;

饥饿4 h的细胞在NO EF、3 V/cm、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm的平均运动速度分别为 (6.73 ± 0.23) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (6.55 ± 0.29) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (6.44 ± 0.28) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (6.50 ± 0.23) $\mu\text{m}/\text{min}$ 、 (7.37 ± 0.29) $\mu\text{m}/\text{min}$,这些结果表明细胞的极化有利于细胞的运动,同时与饥饿3 h的细胞相比,饥饿4 h的AX2细胞表现出更强的趋电性,具有更强的定向迁移能力。然而,饥饿4 h细胞的方向持续性 (0.45 ± 0.02) $\mu\text{m}/\text{min}$ 略低于饥饿3 h细胞的方向持续性 (0.48 ± 0.02) $\mu\text{m}/\text{min}$,这可能与细胞的极化状态过强,导致其发生聚集从而影响细胞的方向持续性。

统计结果表明,饥饿3 h和4 h的AX2细胞已经表现出良好的极化状态,并能够积极响应电场刺激,表现出较强的趋电性。饥饿3 h的AX2细胞在方向性、方向持续性、轨迹速度和位移速度等方面,与未加电条件下的细胞相比均表现出差异。饥饿4 h的AX2细胞与饥饿3 h的AX2细胞相比,表现出更明显的极化现象,轨迹速度与位移速度方面有显著差异。故选用12 V电场条件下饥饿4 h的AX2细胞模型来深入探讨电场对细胞伪足运动的影响。

2.2 电场刺激不改变盘基网柄菌细胞伪足类型

基于前面的研究结果,本项目对饥饿4 h的细胞伪足进行了定性和定量分析。项目首先对电场刺激与伪足类型的关系进行研究,发现伪足的类型并不随电场的有无和强度而变化,即在对照组和直流电刺激组的细胞伪足类型分析中,都观察到了裂生型伪足和原生型伪足,且细胞运动过程中也存在 Step

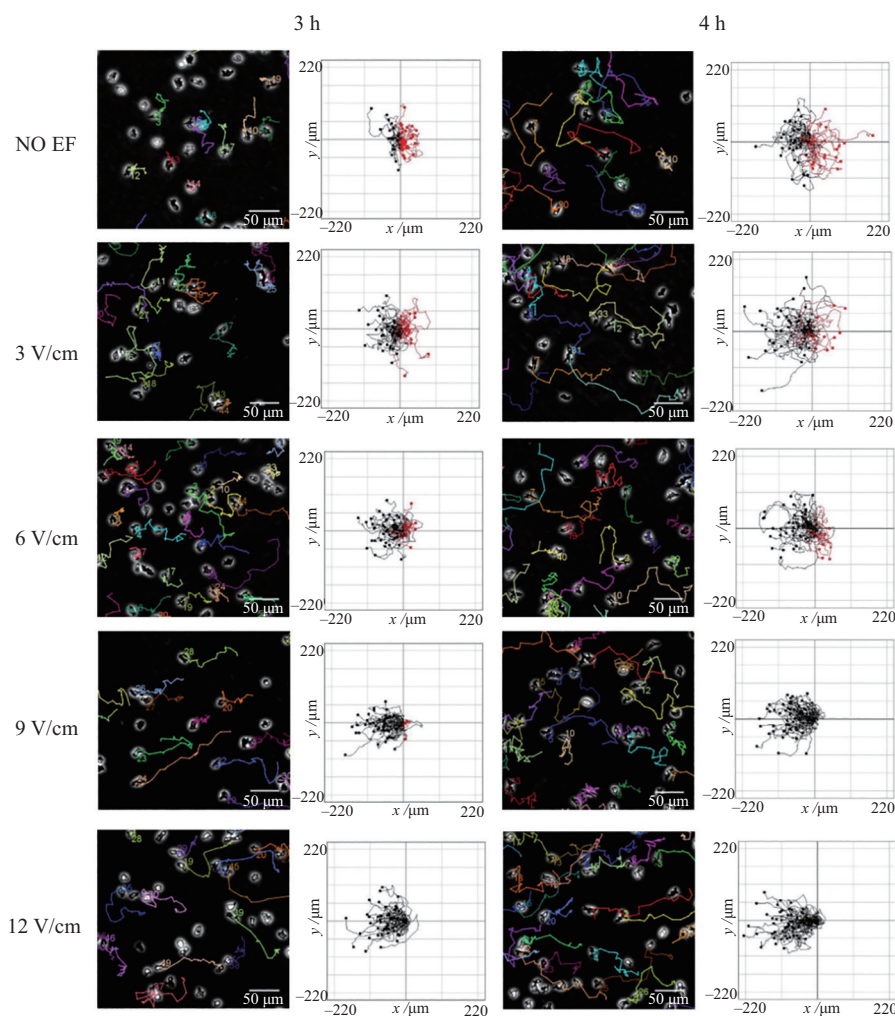


A: 盘基网柄菌细胞的营养状态和饥饿1~5 h的极化状态。B: 盘基网柄菌细胞在无电场环境(NO EF, 0 V/m)下1~5 h的运动轨迹速度。 $n=150$ 。
** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

A: the non-starvation state of *Dictyostelium discoideum* cells and the polarization state of starvation for 1-5 h. B: the trajectory velocity of *Dictyostelium discoideum* cells at NO EF (0 V/m) electric field intensity for 1-5 h. $n=150$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

图1 细胞形态变化图和细胞运动速度

Fig.1 Pictures of cell morphological changes and cell movement speed



盘基网柄菌细胞在NO EF(0 V/m)、3 V/m、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm电场中饥饿3 h和4 h后的运动情况, 电场负极位于左侧, 细胞像左迁移($n=50$)。The movement of *Dictyostelium discoideum* cells starved for 3 h and 4 h in NO EF (0 V/m), 3 V/cm, 6 V/cm, 9 V/m, 12 V/cm electric field. The negative pole of the electric field was located on the left side, and the cells migrated to the left side ($n=50$).

图2 盘基网柄菌细胞的运动轨迹

Fig. 2 Trajectory of *Dictyostelium discoideum* cells

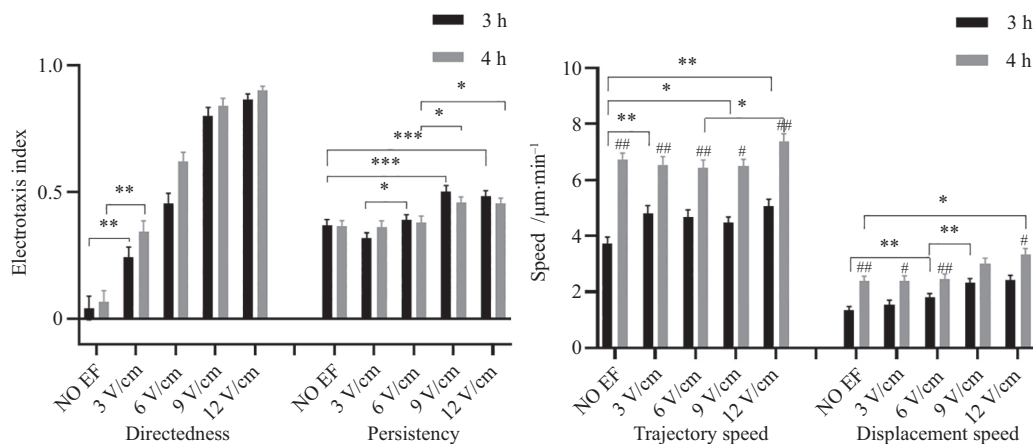
型伪足(母本伪足左右两侧间歇形成的两个裂生型伪足, 也被称为“左-右-左”型)和Hop型伪足(母本伪足在同一侧连续形成的两个裂生型的伪足, 也被称为“左-左”或“右-右”型)(图4A和表1)。这些伪足的存在保证了细胞既可以沿某一方向运动, 又可以在失去方向后得到重新调整。同时经ImageJ/Quimp3软件分析得到的细胞每一帧运动的轮廓图, 更精确地展示了细胞的运动轨迹以及伪足的延伸轨迹, 为我们分析伪足性状参数提供了保障(图4B)。

本研究还对不同电压条件下, 伪足的性状参数(伪足数量、原生比例、裂生比例、裂生方式、伪足大小、延伸时间、伪足延伸速率)进行了定量分析(表1)。结果发现, 在不同电压梯度下原生型伪足占比(*de novo* fraction)、裂生型伪足占比(split frac-

tion)、每分钟形成的伪足数、伪足大小和伪足延长时间均无显著差异。然而, 高强度的电场刺激, 能够增强伪足的延伸速率, 例如, 在无电场刺激时, 伪足延伸速率为 $(0.47 \pm 0.06) \mu\text{m/s}$, 而12 V/cm电场刺激下, 伪足延伸速率为增加至 $(0.61 \pm 0.06) \mu\text{m/s}$, 统计学分析发现二者之间存在差异, 该结果表明电场通过优化单个伪足的延伸效率而非增加伪足数量来提升细胞的迁移性能。此外, 电场的这种作用在高电压下才显示, 暗示了电信号刺激细胞引起相关信号通路的激活可能有一个阈值。

2.3 电场改变伪足的空间分布

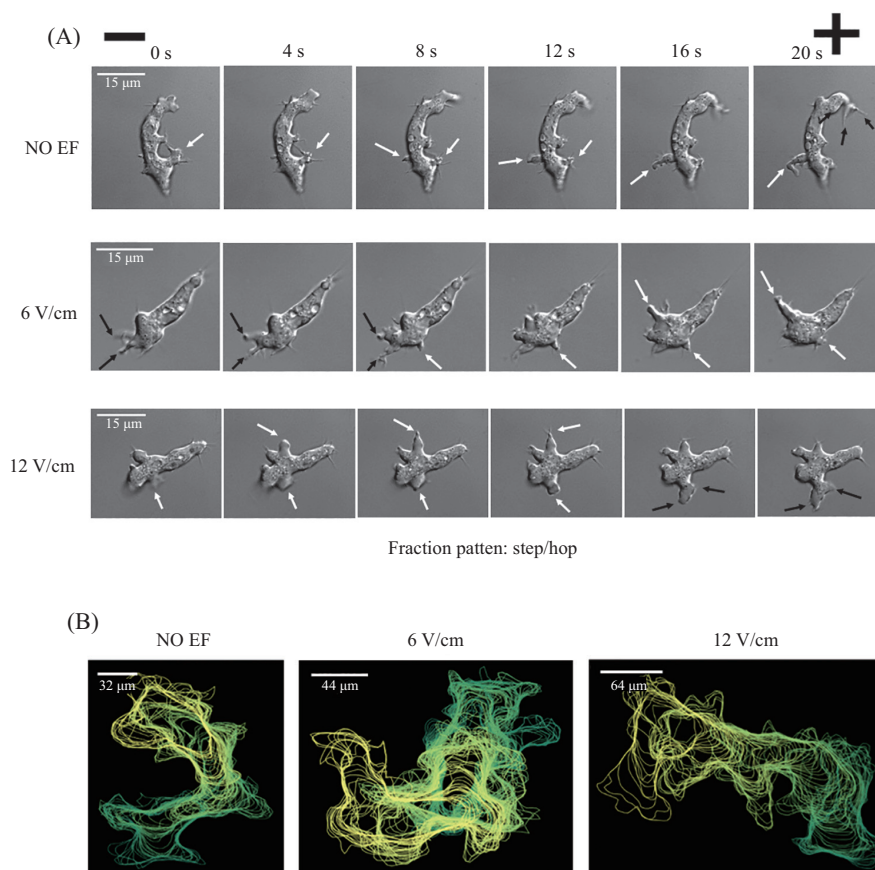
为了探究细胞伪足延伸方向与外加电场矢量间的空间分布规律, 本研究对10个细胞的所有伪足空间分布进行定量分析, 该方法是将细胞形态简化



在NO EF(0 V/m)、3 V/m、6 V/cm、9 V/cm、12 V/cm直流电场下饥饿3 h和4 h的盘基网柄菌细胞的迁移方向和迁移速度($n=150$)。通过 t 检验从野生型细胞的数据中计算出显著差异。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

The migration direction and migration speed of *Dictyostelium discoideum* cells starved for 3 h and 4 h under NO EF (0 V/m), 3 V/cm, 6 V/cm, 9 V/cm, 12 V/cm DC electric fields ($n=150$). Significant differences were calculated from the data of wild-type cells by t -test. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

图3 盘基网柄菌细胞在直流电场中的趋电性
Fig.3 Electrotaxis of *Dictyostelium discoideum* cells in DC EF



A: 伪足在不同电压下20 s内的伸展和收缩。白色箭头代表step型伪足, 黑色箭头代表hop型伪足。“-”代表电场的阴极电极, “+”代表电场的阳极电极。B: 细胞在无电场和有电场情况下的运动轨迹。

A: the extension and contraction of the pseudopod within 20 seconds under different voltages. The white arrow represents the step-type pseudopod, and the black arrow represents the hop-type pseudopod. “-” represents the cathode electrode of the electric field, and “+” represents the anode electrode of the electric field. B: the trajectory of cells in the absence and presence of an electric field.

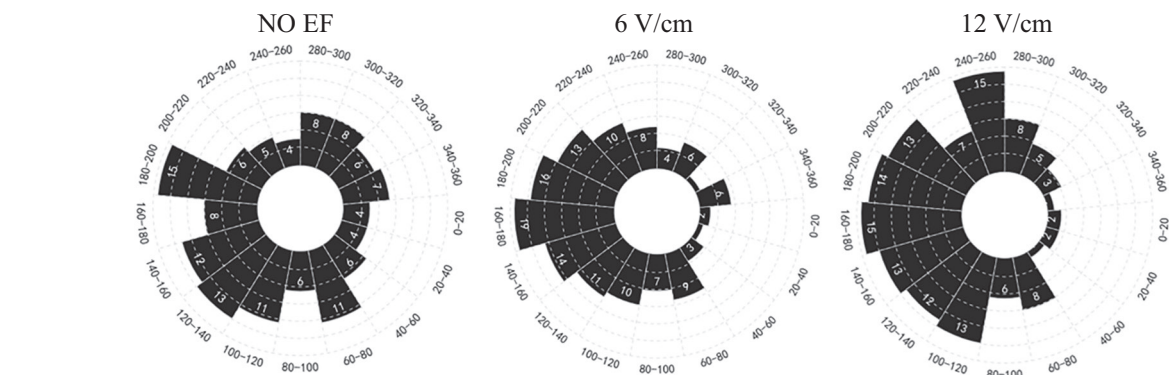
图4 伪足类型和细胞轨迹
Fig.4 Pseudopod type and cell track

表1 伪足性状参数
Table 1 Pseudopod trait parameters

组别 Group	伪足大小/ μm Size / μm	延伸时间/s Extension time /s	伪足延伸速率/ $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ Rate / $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	伪足数 Pseudopod counts	原生比例/% <i>De novo</i> fraction /%	裂生比例/% Split fraction /%	裂生方式/% Fraction patten /%	
							Step	Hop
AX ₂ NO EF	5.97±0.42	13.87±4.82	0.47±0.06	30.2±7.07	69.8±7.07	30.2±7.07	64.44	35.56
AX ₂ 6 V/cm	6.83±0.28	12.60±4.83	0.54±0.09	27.7±6.29	72.3±6.29	27.7±6.29	60.47	39.53
AX ₂ 12 V/cm	6.36±0.18	10.41±3.18	0.61±0.06*	25.5±5.13	74.5±5.13	25.5±5.13	56.82	43.18

不同电压梯度下, 原生比例、裂生比例、伪足数量、大小和延伸时间均无显著差异。0 V/cm和12 V/cm的伪足延伸速率之间有显著性差异(* $P<0.05$, 与AX₂ NO EF组比较。 $n=10$)。

Under different voltage gradients, there are no significant differences in the *de novo* fraction, split fraction, pseudopod counts, size and extended time. There was a significant difference in the rate of pseudopod elongation between 0 V and 12 V (* $P<0.05$ compared with AX₂ NO EF group. $n=10$).



扇形区域代表该角度下的伪足数量($n=10$)。
The fan-shaped region represents the number of pseudopods at this angle ($n=10$).

图5 电场对伪足空间分布的影响
Fig.5 The influence of electric field on the spatial distribution of pseudopods

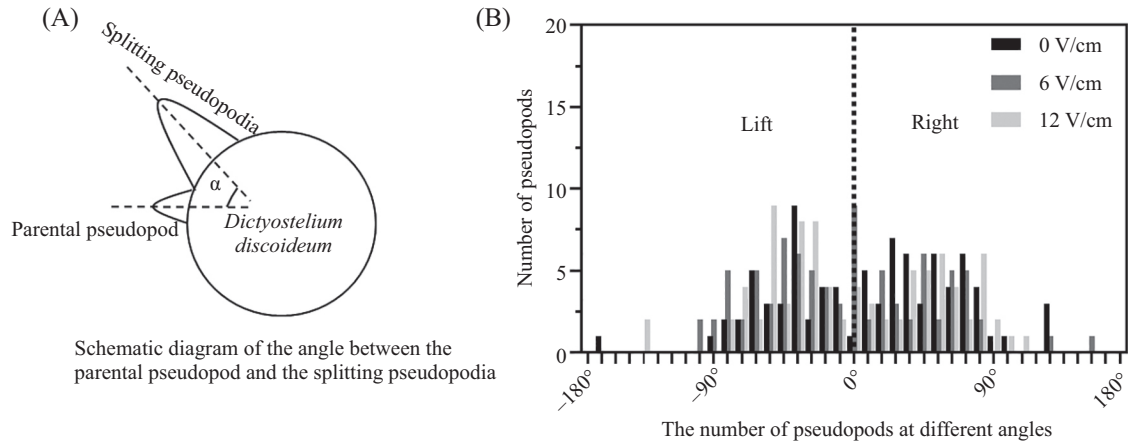
为近似球体模型, 以电场方向为参考轴建立极坐标系($0^{\circ}\sim 360^{\circ}$), 其中 180° 对应电场负极方向, $0^{\circ}/360^{\circ}$ 对应正极方向。将球体以 20° 为间隔进行等角度划分, 共生成17个扇形统计区间, 统计其各个角度中的伪足数量, 并绘制玫瑰图(图5)。结果发现, 在缺乏电场刺激时(NO EF), 盘基网柄菌细胞的伪足延伸方向呈均匀分布 $0^{\circ}\sim 360^{\circ}$ 的各个区间, 各角度区间伪足数量无显著差异, 表明细胞在无电场条件下, 伪足的空间分布缺乏方向性。在中等电场强度组(6 V/cm), 伪足分布呈现初步极性特征, 主要集中在 $80^{\circ}\sim 300^{\circ}$ 区间, 此时电场诱导的细胞极性尚未完全建立。在高强度电场组(12 V/cm), 伪足分布表现出强烈的方向性极化, 主要集中在 $100^{\circ}\sim 260^{\circ}$ 区间, 该结果暗示了高强度电场可显著增强细胞骨架的极性重组效率, 驱动伪足定向延伸。

2.4 电场影响裂生型伪足的延伸速率

除了伪足的空间分布影响细胞定向运动之外, 新生伪足与母本伪足之间的夹角大小也有可能是影

响因素之一。为此, 本研究对裂生型伪足(splitting pseudopodia)与母本伪足(parental pseudopod)之间夹角分布规律进行了定量分析, 以揭示细胞运动过程中伪足延伸的动力学特征。为了便于理解, 本研究将如图6A的模式图用于展示盘基网柄菌细胞在迁移过程中的母本伪足(即细胞表面随机延伸出一个伪足)和裂生型伪足(在母本伪足两侧延伸出的伪足), 二者之间的夹角便是指新生的裂生型伪足与母本伪足的夹角。以母本伪足延伸方向为参考轴建立极坐标系($-180^{\circ}\sim 180^{\circ}$), 以 10° 一个角度区间, 统计各个角度下新生的裂生型伪足的数量(图6B)。研究发现, 在不同电场条件下, 裂生型伪足的分布呈现出一定的规律性, 主要集中在与母本伪足夹角范围 -90° 到 90° 之间, 并且分布呈现双峰特征。这表明, 裂生型伪足的延伸方向通常会偏向母本伪足两侧, 并且夹角大多数集中在一个较为狭窄的范围内, 这对于控制细胞运动方向至关重要。

为了展示裂生型伪足在不同角度区间内分布



A: 裂生型伪足与母本伪足之间的夹角模式。B: 在NO EF、6 V/cm和12 V/cm电压下, 不同角度的裂生型伪足的分布。n=10。
A: the pattern of the angle between the fissile pseudopod and the maternal pseudopod. B: the distribution of fissile pseudopods at different angles under NO EF, 6 V/cm and 12 V/cm voltages. n=10.

图6 裂生型伪足与母本伪足之间的角度模式图及角度分布数量
Fig.6 The angle pattern diagram and the number of angle distribution between the splitting pseudopodia and the parental pseudopod

表2 裂生型伪足的伪足性状参数

Table 2 Pseudopodia trait parameters of splitting pseudopodia

细胞朝向 Cell orientation	延伸时间/s Time in extension /s			裂生型伪足数量 Total of split pseudopods			速率/s·ps ⁻¹ Rate s·ps ⁻¹		
	NO EF	6 V/cm	12 V/cm	NO EF	6 V/cm	12 V/cm	NO EF	6 V/cm	12 V/cm
Angle (<60°)	724	623	631	55	48	57	13.16	12.98	11.07
Angle (60°-120°)	400	305	365	26	28	24	15.38	10.89	15.21
Angle (>120°)	58	17	39	4	2	2	14.50	8.50	19.50
Total	1 182	945	1 035	85	78	83			

在NO EF、6 V/cm和12 V/cm三种电场强度下, 角度范围小于60°的伪足数量和伸展时间占比最大。其中, 在12 V/cm的电场条件下, 可以在较短的延伸时间内延伸出更多的伪足, 且延伸速率较快(n=10)。
Under the three electric field strengths of NO EF, 6 V/cm and 12 V/cm, the number and extension time of pseudopods with an angle range of less than 60° account for the largest proportion. Among them, under the electric field condition of 12 V/cm, more pseudopods can be extended in a shorter extension time, and the extension rate is faster (n=10).

情况的更多细节, 本研究还对不同电压下裂生型伪足的数量、延伸速率和延伸时间进行了统计。结果如表2所示, 在NO EF、6 V/cm、12 V/cm三种的电场强度下, 夹角范围小于60°的伪足数量与延伸时间均占比最多, 其中12 V/cm电场条件下可以在更短延伸时间内延伸更多的伪足, 延伸速率更快。

通过对本项目的研究, 发现裂生型伪足通过严格控制角度来维持细胞运动, 而母本伪足的随机性延伸为细胞提供方向探索能力, 与VAN HAAS-TERT^[15]的研究结论相似。

3 讨论

本研究揭示了直流电场对饥饿状态下盘基网

柄菌趋电性行为的协同调控作用, 并结合饥饿时间与电场强度探讨其对伪足动态分布的影响。观察到饥饿4 h的细胞较3 h表现出更强的趋电性响应, 表明饥饿时间梯度对细胞迁移行为具有动态调控作用, 其主要取决于细胞极性的建立, 并通过调控迁移方向性与聚集模式增强其环境适应性^[16]。而饥饿5 h的细胞对电信号敏感性降低, 其机制可能与细胞内环腺苷3',5'-单磷酸(cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, cAMP)信号通路的激活有关。在这一过程中, cAMP信号转导与钙离子信号系统协同作用, 促使细胞表现出高度协调的集体迁移行为, 并最终引发细胞聚集现象。这种信号通路的同步激活可能是导致细胞电敏感性下降的关键

因素^[17-18]。并且细胞内ATP水平是影响盘基网柄菌细胞命运的关键因素,高ATP促进柄细胞分化,低ATP促进孢子形成^[19]。细胞极化对盘基网柄菌发育的单细胞和多细胞阶段至关重要^[20]。为了响应环境线索,单个细胞和集体迁移的细胞将其信号转导和肌动蛋白机制从前向后移动,以建立前后细胞极性^[21-22]。并有遗传学研究表明,当受体酪氨酸激酶(RTK)信号丢失时,会出现严重的迁移缺陷^[23-24]。RTK通过局部增加磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸酯,并激活迁移细胞前部的Cdc42和Rac小GTP酶,使细胞膜向外突出,从而指导细胞迁移。近期也有研究表明,电压门控离子通道超家族成员双孔通道蛋白TPC2对盘基网柄菌的正常发育、分化、自噬性细胞死亡和细胞类型模式形成至关重要。TPC2缺失导致的钙信号减少会抑制自噬流,影响细胞发育和细胞命运选择^[25]。

本研究还发现电场刺激导致伪足向细胞前缘(负极方向)显著富集,这一现象与趋化反应中细胞迁移类似,所有伪足初始方向呈随机分布,但整体偏向趋化源方向^[4,26]。但新的伪足通常以左-右-左-右的交替方向产生,而与引诱剂梯度的方向无关^[27]。并且在趋化梯度和缓冲液中的细胞运动期间,Ras-GTP是具有强烈局部激活的上游信号^[28],而在细胞趋电性中,伪足主要涉及离子通道,RhoA以及Cdc42蛋白^[29-30]。有研究表明,在趋化运动中,与梯度方向高度对齐的伪足更易被保留,而方向偏离较大的伪足则会主动缩回^[4],这也进一步说明裂生型伪足与母本伪足夹角为何处于一个相对较小的范围内。并且盘基网柄菌细胞通常能够以5~8 $\mu\text{m}/\text{min}$ 的速度移动,而成纤维细胞或间充质迁移通常慢得多,以0.2~1.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ 的速度前进^[31]。其原因可能是盘基网柄菌细胞伪足前缘瞬时黏附可能通过Rac1介导的肌动蛋白动态重组实现,无需像成纤维细胞在细胞外基质上建立成熟黏着斑,从而使运动更为快速,更适合进行伪足研究。

4 结论

研究表明,电场强度与饥饿时间协同增强了盘基网柄菌细胞对胞外直流电场的响应,电场不改变细胞的伪足类型、数量等,但能够使伪足偏向分布,同时裂生型伪足通过控制与母本伪足的夹角来维持细胞运动,从而指导细胞的定向迁移。

参考文献 (References)

- [1] FU R, ZHU K, LI Z, et al. Type III collagen promotes pseudopodium-driven cell migration [J]. Chem Bio Engineering, 2024, 2(2): 97-109.
- [2] RIDLEY A J. Life at the leading edge [J]. Cell, 2011, 145(7): 1012-22.
- [3] VAN HAASTERT P J M. Symmetry breaking during cell movement in the context of excitability, kinetic fine-tuning and memory of pseudopod formation [J]. Cells, 2020, 9(8): 1809.
- [4] ANDREW N, INSALL R H. Chemotaxis in shallow gradients is mediated independently of PtdIns 3-kinase by biased choices between random protrusions [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(2): 193-200.
- [5] VAN HAASTERT P J. How cells use pseudopods for persistent movement and navigation [J]. Sci Signal, 2011, 4(159): pe6.
- [6] LIU C, CHEN S, ZHANG Y, et al. Mechanisms of Rho GTPases in regulating tumor proliferation, migration and invasion [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2024, 80: 168-74.
- [7] HWANG I Y, KIM J S, HARRISON K A, et al. Chemokine-mediated F-actin dynamics, polarity, and migration in B lymphocytes depend on WNK1 signaling [J]. Sci Signal, 2024, 17(851): eade1119.
- [8] BEAR J E, HAUGH J M. Directed migration of mesenchymal cells: where signaling and the cytoskeleton meet [J]. Curr Opin Cell Biol, 2014, 30: 74-82.
- [9] ZHAO M, SONG B, PU J, et al. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN [J]. Nature, 2006, 442(7101): 457-60.
- [10] CHISHOLM R L, GAUDET P, JUST E M, et al. dictyBase, the model organism database for *Dictyostelium discoideum* [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(Database issue): D423-7.
- [11] EICHINGER L N A. Crawling into a new era-the *Dictyostelium* genome project [J]. EMBO J, 2003, 22(9): 1941-6.
- [12] ANNESLEY S J, FISHER P R. *Dictyostelium discoideum*: a model for many reasons [J]. Mol Cell Biochem, 2009, 329(1/2): 73-91.
- [13] 高润池, 吴雪, 倪娟, 等. 将盘基网柄菌用于本科细胞生物学综合性实验教学初探——电穿孔转化绿色荧光蛋白[J]. 中国细胞生物学学报(GAO R C, WU X, NI J, et al. Preliminary study on the use of *Dictyostelium discoideum* in comprehensive undergraduate laboratory course of cell biology: transformation of lifeact-green fluorescent protein by electroporation [J]. Chinese Journal of Cell Biology), 2020, 42(3): 493-8.
- [14] BOSGRAAF L, VAN HAASTERT P J M. Quimp3, an automated pseudopod-tracking algorithm [J]. Cell Adh Migr, 2014, 4(1): 46-55.
- [15] VAN HAASTERT P J M. A model for a correlated random walk based on the ordered extension of pseudopodia [J]. PLoS Comput Biol, 2010, 6(8): e1000874.
- [16] ETIENNE-MANNEVILLE S, HALL A. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk [J]. Cur Opin Cell Biol, 2003, 15(1): 67-72.
- [17] HASHIMURA H, MORIMOTO Y V, YASUI M, et al. Collective cell migration of *Dictyostelium* without cAMP oscillations at multicellular stages [J]. Commun Biol, 2019, 2: 34.
- [18] MORIMOTO Y V. Ion signaling in cell motility and development in *Dictyostelium discoideum* [J]. Biomolecules, 2024, 14(7): 830.

- [19] HIRAOKA H, NAKANO T, KUWANA S, et al. Intracellular ATP levels influence cell fates in *Dictyostelium discoideum* differentiation [J]. *Genes Cells*, 2020, 25(5): 312-26.
- [20] WILLIAMS H P, HARWOOD A J. Cell polarity and *Dictyostelium* development [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2003, 6(6): 621-7.
- [21] MAYOR R, ETIENNE-MANNEVILLE S. The front and rear of collective cell migration [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(2): 97-109.
- [22] RIDLEY A J, SCHWARTZ M A, BURRIDGE K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back [J]. *Science*, 2003, 302(5651): 1704-9.
- [23] CASALETTO J B, MCCLATCHEY A I. Spatial regulation of receptor tyrosine kinases in development and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(6): 387-400.
- [24] JÉKELY G, SUNG H H, LUQUE C M, et al. Regulators of endocytosis maintain localized receptor tyrosine kinase signaling in guided migration [J]. *Dev Cell*, 2005, 9(2): 197-207.
- [25] RATHORE M, THAKUR A, SARAN S. Deletion of *Dictyostelium* *tpc2* gene forms multi-tipped structures, regulates autophagy and cell-type patterning [J]. *Biol Cell*, 2024, 116(5): e2300067.
- [26] VAN HAASTERT P J M, BOSGRAAF L. The local cell curvature guides pseudopodia towards chemoattractants [J]. *HFSP J*, 2010, 3(4): 282-6.
- [27] MEANS T, BOSGRAAF L, VAN HAASTERT P J M. Navigation of chemotactic cells by parallel signaling to pseudopod persistence and orientation [J]. *PLoS One*, 2009, 4(8): e6842.
- [28] VAN HAASTERT P J M, KEIZER-GUNNINK I, KORTHOLT A. The cytoskeleton regulates symmetry transitions in moving amoeboid cells [J]. *J Cell Sci*, 2018, 131(7): jcs208892.
- [29] NAITO A, KAMAKURA S, HAYASE J, et al. The protein kinase aPKC as well as the small GTPases RhoA and Cdc42 regulates neutrophil chemotaxis partly by recruiting the ROCK kinase to the leading edge [J]. *Genes Cells*, 2025, 30(2): e70002.
- [30] HIEPEN C, BENAMAR M, BARRASA-FANO J, et al. Endothelial tip-cell position, filopodia formation and biomechanics require BMPR2 expression and signaling [J]. *Commun Biol*, 2025, 8(1): 21.
- [31] HOU Y H S, SCHNEIDER I C. Differences in adhesion and protrusion properties correlate with differences in migration speed under EGF stimulation [J]. *BMC Biophys*, 2012, 5: 8.