



内质网 Ca^{2+} 释放介导盘基网柄菌细胞的趋电性迁移*

王一凡^{1)**} 袁淑琴^{1)**} 高润池^{1)***} 赵三军^{1,2)***}⁽¹⁾ 云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500; ⁽²⁾ 云南省生物资源持续开发利用国际联合研发中心, 昆明 650500

摘要 目的 Ca^{2+} 作为胞内信号转导的第二信使, 在细胞迁移中发挥重要作用。研究表明, 胞外 Ca^{2+} 内流能够促进细胞趋电性迁移, 但胞内 Ca^{2+} 流对细胞趋电性迁移的影响尚不清楚。因此, 本研究以盘基网柄菌为模型, 探究胞内外 Ca^{2+} 流对细胞趋电性迁移的影响及其作用机制。方法 应用模拟内源性电场的外源微直流电场和实时录像系统研究盘基网柄菌在电场中的趋电性迁移; 利用激光共聚焦显微镜、钙离子通道抑制剂、胞外 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 以及无 Ca^{2+} 的发育缓冲液 (development buffer, DB) 缓冲液、咖啡因等探究细胞内外 Ca^{2+} 流对细胞趋电性迁移的影响; 应用基因缺失突变株探究内质网 Ca^{2+} 释放调控细胞趋电性迁移的分子机制。结果 盘基网柄菌以电压依赖的方式向电场负极进行趋电性迁移; 电场刺激会增加细胞内 Ca^{2+} 浓度, 抑制胞外 Ca^{2+} 内流与胞内 Ca^{2+} 释放均会抑制细胞趋电性迁移; 咖啡因作用显著增加细胞内 Ca^{2+} 的浓度, 抑制内质网 Ca^{2+} 释放会抑制细胞的趋电性迁移; $G\alpha_s$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ 、 Erk2 缺失均导致细胞趋电性迁移能力显著降低, 咖啡因作用完全或部分恢复了 $G\alpha_s$ 、 $G\beta$ 、 Erk2 突变株的趋电性迁移, 但没有恢复 $G\gamma$ 突变株的趋电性迁移。结论 内质网 Ca^{2+} 释放介导盘基网柄菌细胞的趋电性迁移, 且参与 G 蛋白和细胞外信号调节激酶 2 (ERK2) 对细胞趋电性迁移的调控过程。

关键词 钙离子, 内质网, 趋电性, 细胞迁移, 盘基网柄菌

中图分类号 Q26, Q27

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0468

CSTR: 32369.14.pibb.20240468

细胞迁移是组织再生、血管生成、胚胎发育和伤口愈合等多种生物学过程的基础^[1]。细胞迁移的方向不仅受自身的调节, 还受到外界信号的指导。电信号是指导细胞发生定向迁移的重要信号之一, 细胞在电场中表现出朝向负极或正极定向迁移的行为, 被称为细胞趋电性^[2-3]。细胞趋电性迁移对个体发育、器官再生、伤口愈合以及肿瘤转移等过程具有重要意义^[4]。

Ca^{2+} 作为胞内信号转导的第二信使, 通过细胞骨架动力学重组、细胞黏附以及信号转导的协调, 影响包括细胞迁移在内的多种细胞活动^[5]。细胞迁移过程包括细胞前端的黏附和尾部的收缩, 这在时空上受胞质 Ca^{2+} 的调节, 迁移的细胞中 Ca^{2+} 是动态分布的, 细胞前缘 Ca^{2+} 浓度低, 但是会发生局部和短暂的高钙微区 (钙闪烁或称为钙火花), 并通过瞬时受体电势 (transient receptor potential, TRP) 通道或钙库操纵钙内流-基质相互作用分子 1 (store-operated Ca^{2+} entry-stromal interaction

molecule 1, SOCE-STIM1) /钙释放激活钙通道蛋白 1 (calcium release-activated calcium modulator 1, ORAI1) 依赖性机制控制的胞外 Ca^{2+} 进入和细胞前缘的质膜 Ca^{2+} -ATP 酶 (plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PMCA) 泵出, 引导细胞迁移的方向^[6-7]; 细胞尾部 Ca^{2+} 浓度相对较高, 能引起 Rho GTP 酶依赖性肌动蛋白收缩和黏着斑蛋白的组装与解聚^[8]。此外, 钙信号在肿瘤细胞的增殖和迁移、血管生成以及内皮修复等过程中也发挥重要作用^[9-10], 例如, 在 HepG2 细胞中, 胞外 Ca^{2+} 浓度增加可以通过黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 和钙/钙调素依赖性蛋白激酶 2 (calcium/

* 国家自然科学基金 (82060355, 81660519) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

高润池 Tel: 0871-65940143, E-mail: runchigao@163.com

赵三军 Tel: 0871-65941366, E-mail: sanjunzhao@163.com

收稿日期: 2024-11-12, 接受日期: 2025-01-06

calmodulin-dependent protein kinase II, CaMK II) 促进细胞增殖和迁移^[11]; 在乳腺癌细胞中, 胞外 Ca^{2+} 浓度的增加会通过激活钙感受受体 (calcium sensing receptor, CaSR) 促进细胞迁移^[12]; 在内皮细胞中, 促血管生成信号通过驱动胞内 Ca^{2+} 通过 1, 4, 5-三磷酸肌醇受体 (inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors, IP_3Rs) 介导的钙离子通道以及兰尼碱受体 (ryanodine receptors, RyRs) 介导的 Ca^{2+} 通道促进血管生成^[13]。因此, 探究 Ca^{2+} 对细胞迁移的影响及其作用机制对某些疾病和癌症的预防和治疗具有重要意义。

异源三聚体 G 蛋白作为 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 信号转导的关键组成部分, 由 $G\alpha$ 、 $G\beta$ 和 $G\gamma$ 三个亚基组成, 在多种细胞迁移的调控过程中发挥重要作用。例如, $G\alpha$ 在前列腺癌细胞的迁移和侵袭^[14-15] 以及中性粒细胞的跨内皮迁移^[16] 中发挥重要作用; $G\gamma$ 的中心部分是原始生殖细胞迁移所必需的^[17]; $G\beta$ 是斑马鱼中性粒细胞迁移所必需的^[18]; 在盘基网柄菌中, 研究发现 $G\beta$ 和 $G\alpha_2$ 均能调控其趋电性迁移^[19-20], 但对 $G\gamma$ 的作用至今未有报道。细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 作为丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族的成员之一, 是介导包括趋化性与趋电性迁移在内的多种细胞定向迁移的重要信号分子。例如, 在盘基网柄菌趋化性迁移中, G 蛋白的激活直接调控下游 ERK 信号通路^[21], 而磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinases, PI3Ks) 介导的 ERK 激活则会调控其趋电性迁移^[22]; 在 BV2 小胶质细胞中, 电场通过 ERK/ $\text{GSK3}\beta$ /cofilin 信号通路调控其趋电性迁移^[23]。此外, 还有研究表明 ERK 调控细胞迁移过程需要 Ca^{2+} 参与, 例如, 在血管收缩^[24-25]、人卵巢癌细胞增殖^[26] 以及 Kir2.1 通道调节巨噬细胞极化^[27] 的过程中, ERK 信号通路的激活都需要 Ca^{2+} 的参与, 但在细胞趋电性迁移中, G 蛋白与 ERK 对细胞迁移的调控过程是否涉及胞质 Ca^{2+} 的作用尚不清楚。

电信号作为指导伤口愈合的主导信号, 广泛存在于生物有机体中, 包括发育中的胚胎、发生发展中的肿瘤组织、正在愈合的伤口等^[28]。研究发现, Ca^{2+} 是影响细胞趋电性迁移的重要因素之一, 例如, 在肺癌细胞^[29] 和人乳腺癌细胞^[30] 中均观察到电场作用下细胞内 Ca^{2+} 浓度增加的现象; 在小鼠胚胎成纤维细胞^[31] 和人角质形成细胞^[32] 中, 发

现使用 Ca^{2+} 通道抑制剂或去除细胞外 Ca^{2+} 都会影响细胞的趋电性迁移; 此外, 在盘基网柄菌细胞趋电性迁移的机制研究中, 发现胞外 Ca^{2+} 内流导致胞内 Ca^{2+} 的浓度增加是其趋电性迁移所必需的^[33]。上述研究都发现电场刺激会导致细胞内 Ca^{2+} 浓度增加, 但这种作用是否涉及胞内内质网 Ca^{2+} 的释放尚不清楚, 因此, 本研究以模式生物盘基网柄菌为实验材料, 通过实时录像系统和激光共聚焦显微镜技术以及利用离子通道抑制剂、咖啡因和基因缺失突变株等方法探究内质网 Ca^{2+} 释放对细胞趋电性迁移的影响及其作用机制, 为进一步揭示电信号在哺乳动物细胞迁移相关的重大生理和病理事件中的分子机制提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

野生型 AX2 (美国加州大学戴维斯分校赵敏教授和约翰霍普金斯医学院 Peter N Devreotes 教授共同赠予); 突变株 $G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 、 $G\gamma^-$ 、 $\text{Erk}2^-$ (日本 NBRPNenkin (National BioResource Project Cellular slime molds) 机构惠赠)。

1.1.2 主要试剂及其配制

HL5 培养基、发育缓冲液 (development buffer, DB)、 $10\times\text{Steinberg}'s$ 溶液配制方法参考文献 [34]。

荧光染料配制: DMSO/Pluronic F127 (Solarbio, P6790) 溶解 0.1 mg 的钙荧光探针 Fluo-4, AM (Solarbio, F8500), 配制成浓度为 2 mmol/L 的母液, -20°C 保存, 实验前稀释至 2.2 $\mu\text{mol/L}$ 工作浓度。

无 Ca^{2+} 细胞发育缓冲液 (Ca^{2+} free): $10\times$ 磷酸缓冲液 100 ml, 2 mol/L MgSO_4 1 ml, 去离子水定容至 1 L。

乙二醇双 (2-氨基乙基醚) 四乙酸 (EGTA, 上海源叶生物科技有限公司): 使用 Ca^{2+} free 缓冲液稀释为 5 mmol/L 工作液。

咖啡因 (昆明理工大学许敏教授惠赠) 使用 DB 缓冲液稀释为 2 mmol/L 工作液浓度。

钿红 (北京酷来搏科技有限公司, CR9621) 和氯化钨 (上海跃龙有色金属有限公司) 使用 DB 缓冲液均稀释为 20 $\mu\text{mol/L}$ 工作液浓度。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

从-80℃冰箱中取出冻存的细胞, 室温使之融化, 用HL5培养基进行无菌培养, 22℃贴壁4 h, 更换新的HL5培养基, 22℃继续培养至细胞浓度达2~4×10⁶/ml后传代, 传3代后可用于实验。

1.2.2 细胞趋电性实验

细胞趋电性研究方法参考文献 [34]。简述如下: 取对数生长期的细胞接种于12孔板培养16 h后, 去除旧培养基, DB缓冲液清洗2次后, 加入2 ml DB缓冲液, 22℃饥饿处理3 h, 重悬后取适量细胞接种于自制的趋电小室, 贴壁5 min后, 根据实验需求, 在小室两端分别施加0、3、6、12 V/cm的直流电场, 用带有电荷耦合器件(charge coupled device, CCD)照相机的显微镜记录细胞运动情况, 每隔1 min拍摄1次, 连续拍摄30 min。拍照结束后, ImageJ软件绘制细胞运动轨迹图(最终位置落在电场负极方向的细胞运动轨迹用黑色表示, 落在电场正极方向的细胞运动轨迹则用红色表示), 定量分析细胞运动的方向性(directedness (cosθ))、方向持续性(persistency)、轨迹速度(track speed)、位移速度(displacement speed)四个参数, 每组实验至少重复3次, 每个视频分析30~50个细胞。

1.2.3 钙信号成像

取指数生长期的细胞, 在DB缓冲液中饥饿处理2 h后, 用含2.2 μmol/L Fluo-4的DB缓冲液避光处理60 min。用DB缓冲液离心洗涤2次以去除Fluo-4。取适量细胞接种于趋电小室并使之贴壁, 将小室置于激光共焦显微镜上, 然后对其施加6 V/cm的直流电场或2 mmol/L咖啡因处理, 利用494 nm波长激发荧光, 并收集516 nm的荧光波长, CCD相机每隔1 min拍摄1帧。

2 结果

2.1 盘基网柄菌以电压依赖的方式进行趋电性迁移

为探究Ca²⁺对盘基网柄菌趋电性迁移的影响, 本研究首先对盘基网柄菌野生型AX2细胞分别施加0、3、6、12 V/cm的直流电场30 min, 利用ImageJ软件对细胞在不同电压电场中的趋电性迁移进行定量分析, 结果显示(图1), 细胞在没有电场作用时呈随机迁移, 且运动缓慢, 施加直流电场后, 细胞朝向电场负极迁移。方向性结果分析显

示, 无电场作用时, 细胞的趋电性指数趋近于0, 方向持续性指数为0.21±0.01; 施加3 V/cm电场后, 细胞趋电性增强, 趋电性指数增加至0.39±0.07 ($P<0.001$), 方向持续性指数增加不显著; 随着电压强度的增加, 在6 V/cm和12 V/cm的电场作用下, 细胞迁移的趋电性指数显著增加, 分别为0.66±0.04和0.83±0.01 ($P<0.001$), 方向持续性也分别显著增加为0.36±0.01和0.47±0.01 ($P<0.001$), 说明随着电场强度的增加, 盘基网柄菌以电压依赖的方式逐渐增强细胞迁移的方向性。

细胞运动速度分析结果显示(图1), 没有电场作用时, 细胞的轨迹速度和位移速度分为2.85±0.20和0.62±0.04 μm/min; 对其施加3 V/cm电场后, 数值分别显著增加为4.01±0.16和0.94±0.07 μm/min ($P<0.01$); 当电场强度增加为6 V/cm和12 V/cm后, 细胞运动的轨迹速度分别显著增加为5.12±0.20和5.17±0.16 μm/min ($P<0.001$), 位移速度分别显著增加为1.99±0.13和2.25±0.12 μm/min ($P<0.001$), 说明随着电场强度的增加, 盘基网柄菌细胞趋电性迁移的运动速度逐渐增加, 且呈电压依赖型。综上表明, 盘基网柄菌细胞以电压依赖的方式响应直流电场刺激并进行趋电性迁移, 且在不同电压条件下, 6 V/cm电压获得的实验数据已较为显著, 而高电压容易造成实验细胞死亡, 因此, 本研究最终选择6 V/cm的电场条件进行研究。

2.2 细胞内外Ca²⁺浓度影响细胞趋电性迁移

有研究表明Ca²⁺流对细胞趋电性迁移至关重要, 本研究利用钙离子探针Fluo-4和激光共焦显微成像技术, 首先探究外源直流电场刺激对细胞内Ca²⁺浓度变化的影响, 结果显示(图2a、b), 饥饿处理的盘基网柄菌细胞中含有一定浓度的Ca²⁺, 用6 V/cm的直流电场刺激后, 发现细胞内Ca²⁺信号随电场作用时间的延长而逐渐增强, 且增强趋势较平缓, 表明电场刺激能够增加盘基网柄菌细胞内Ca²⁺的浓度。

为进一步探究电场刺激增加细胞内Ca²⁺浓度的原因, 本研究利用内质网Ca²⁺通道抑制剂钆红、细胞膜Ca²⁺通道抑制剂氯化钡、Ca²⁺螯合剂EGTA以及无Ca²⁺free缓冲液分别处理盘基网柄菌30 min后, 对其施加6 V/cm直流电场30 min, 探究细胞内外Ca²⁺流对细胞趋电性迁移的影响。结果显示(图2c), 在6 V/cm电场作用下, 与对照组相比, 氯化钡和钆红处理组细胞的趋电性迁移能力均显著降低, 例如, 方向性指数分别降低为0.46±0.03 (P

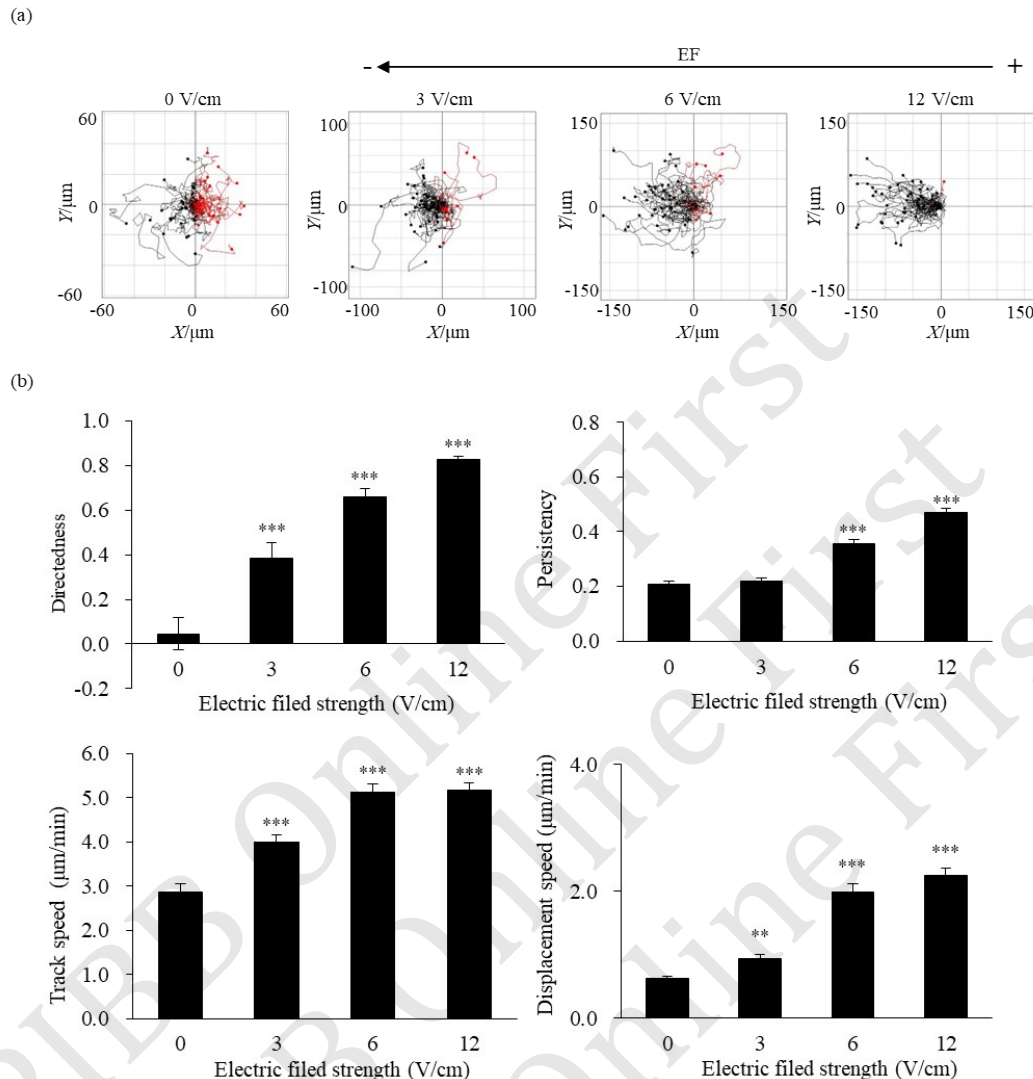


Fig.1 Electrotaxis migration of *Dictyostelium discoideum* under DC electric fields with different voltage strengths

(a) Electrotaxis trajectory plot of *Dictyostelium discoideum* under DC electric fields with different voltage strengths. (b) The migration directedness, persistency, track speed and displacement speed of electrotaxis migration in *Dictyostelium discoideum* under DC electric fields with different voltage strengths ($n=150$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$).

<0.01) 和 0.41 ± 0.02 ($P<0.001$); 轨迹速度分别降低为 2.35 ± 0.07 和 2.06 ± 0.06 $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P<0.001$), 说明抑制胞外 Ca^{2+} 内流与胞内 Ca^{2+} 释放均能抑制细胞趋电性迁移。

为减少化学试剂对细胞状态的影响, 本研究又用物理方式抑制胞外 Ca^{2+} 内流, 结果显示 (图 2c), 在 6 V/cm 的电场作用下, 无外钙处理组和 EGTA 处理组的细胞趋电性迁移均受到不同程度的抑制, 其中无外钙处理组与对照组相比, 细胞迁移的方向性和位移速度分别显著降低为 0.46 ± 0.03 ($P<0.01$) 和 1.43 ± 0.06 $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P<0.001$); 而 EGTA 组与对照组相比, 细胞趋电性迁移的位移速度显著下降为

1.48 ± 0.03 $\mu\text{m}/\text{min}$ ($P<0.001$), 方向性指数下降更为显著, 为 0.25 ± 0.04 ($P<0.001$), 说明减少胞外 Ca^{2+} 浓度, 抑制胞外 Ca^{2+} 内流会抑制细胞趋电性迁移。综上所述, 电场刺激诱导胞内 Ca^{2+} 浓度增加是胞外 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 释放共同作用的结果。

2.3 内质网 Ca^{2+} 释放影响细胞趋电性迁移

有研究发现, 咖啡因能够增加内质网 RyR2 通道的开放概率, 促进 Ca^{2+} 释放, 增加胞内 Ca^{2+} 浓度^[35], 为进一步探究电场作用下, 细胞内 Ca^{2+} 浓度增加是否涉及内质网 Ca^{2+} 释放, 本研究利用钙离子探针 Fluo-4 和激光共焦显微成像技术, 首先探究咖啡因对细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响。结果显示, 饥饿

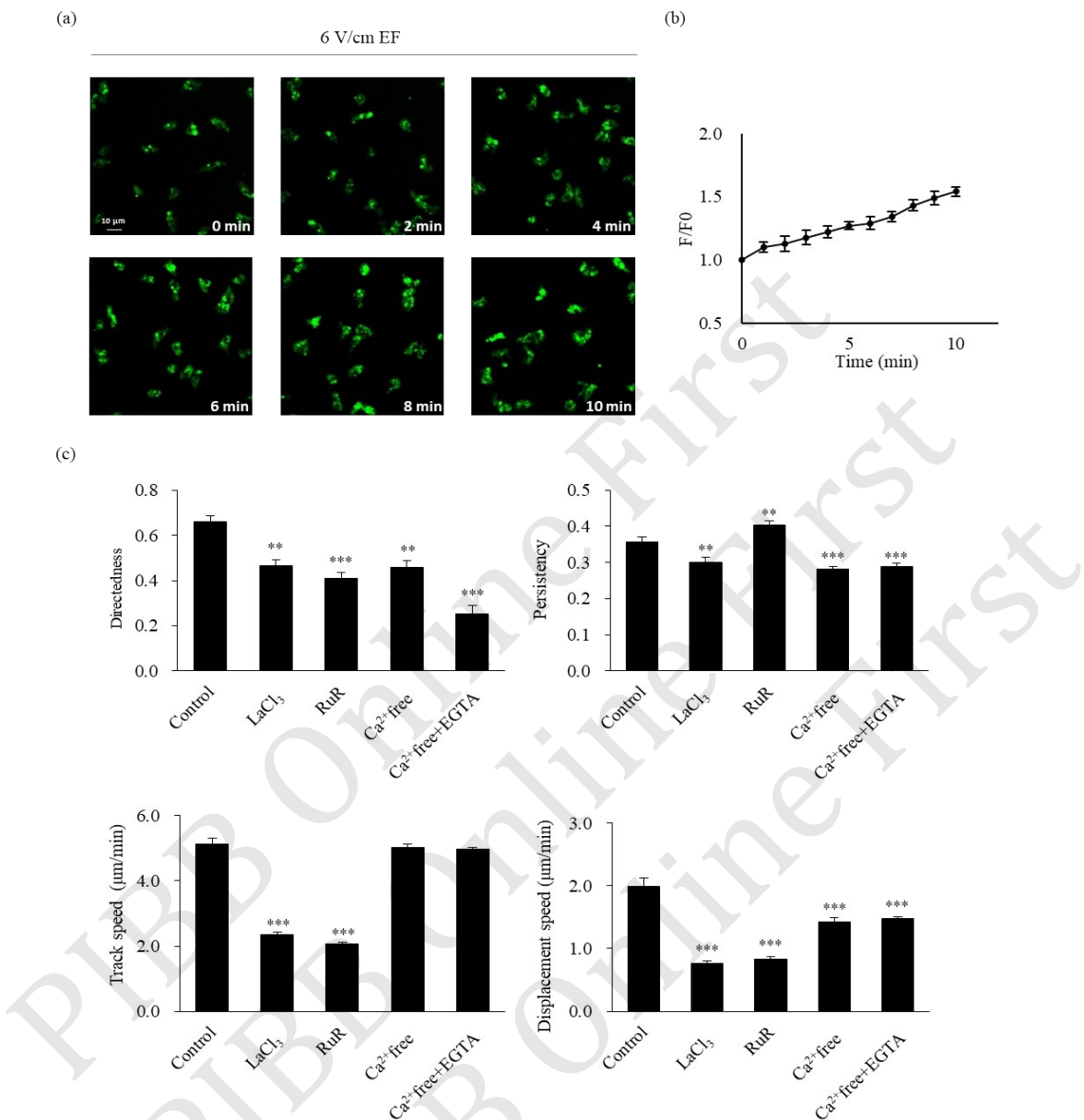


Fig.2 Intracellular and extracellular Ca²⁺ concentrations influences the electrotaxis of *Dictyostelium discoideum*
(a, b) Electric field stimulation increases intracellular Ca²⁺ concentration (n=15). (c) The migration directedness, persistency, track speed and displacement speed of electrotaxis migration in *Dictyostelium discoideum* after inhibition of intracellular and extracellular Ca²⁺ flux (n=150, **P<0.01, ***P<0.001).

处理的盘基网柄菌细胞内含有一定浓度的Ca²⁺ (图3a、b, 0 min), 咖啡因处理后, 细胞内Ca²⁺信号首先缓慢增强 (图3a、b, 1~5 min), 5 min后迅速增强, 并在10 min后达到最大荧光信号强度, 表明大量的Ca²⁺进入到细胞质基质中 (图3a、b, 5~10 min), 10 min后, 由于荧光猝灭的原因, 荧光信号开始减弱, 说明咖啡因作用能够促进盘基网柄菌细胞内Ca²⁺的释放, 增加胞内Ca²⁺的浓度。

为进一步探究内质网Ca²⁺释放对细胞趋电性迁移的影响, 本研究又对咖啡因或咖啡因和钌红共同处理的细胞趋电性迁移进行研究, 结果显示 (图3c), 在6 V/cm电场作用下, 咖啡因处理组细胞迁移的方向性指数为0.77±0.03, 轨迹速度为7.77±0.19 μm/min, 与对照组相比, 数值均显著增加 (P<0.001), 说明咖啡因可以通过增加胞内Ca²⁺浓度促进细胞趋电性迁移。而钌红和咖啡因共同处理组

的方向性指数为 0.49 ± 0.06 ，轨迹速度为 $3.66 \pm 0.15 \mu\text{m}/\text{min}$ ，与对照组或咖啡因处理组相比，数值均显著降低 ($P < 0.001$)，细胞趋电性迁移均被抑制，说明抑制内质网 Ca^{2+} 释放会抑制咖啡因对细胞趋电

性迁移的促进作用，即咖啡因是通过促进内质网 Ca^{2+} 释放增加细胞内 Ca^{2+} 浓度，也说明胞内 Ca^{2+} 流是通过内质网 Ca^{2+} 释放影响细胞趋电性迁移的。

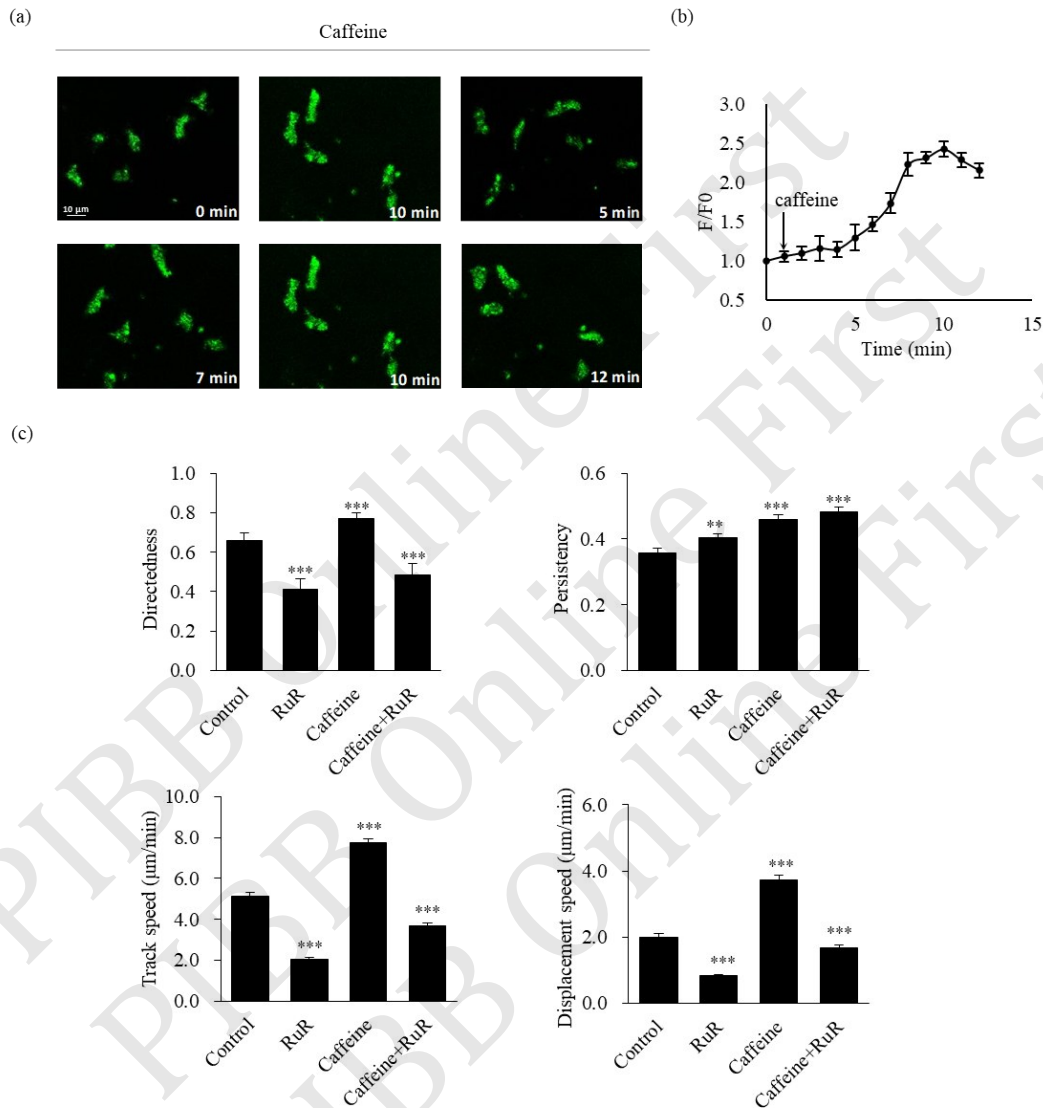


Fig.3 Release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum influences cell electrotaxis migration

(a, b) Caffeine promote the Ca^{2+} release ($n=15$). (c) The migration directedness, persistency, track speed and displacement speed of electrotaxis migration in *Dictyostelium discoideum* after inhibition of endoplasmic reticulum Ca^{2+} release by ruthenium red ($n=150$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

2.4 内质网 Ca^{2+} 释放参与G蛋白与ERK2对细胞趋电性迁移的调控

为进一步探究内质网 Ca^{2+} 释放影响细胞趋电性迁移的作用机制，本研究首先对分别敲除G蛋白的三个亚基突变株 ($G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 、 $G\gamma^-$) 的趋电性变化进行研究，探究G蛋白对细胞趋电性迁移的影响。

统计结果显示 (图 4a)，盘基网柄菌细胞缺失 $G\alpha_2$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ 亚基后，在 $6 \text{ V}/\text{cm}$ 直流电场刺激下，细胞趋电性迁移的方向性都有不同程度的降低，趋电性指数统计结果显示， $G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 、 $G\gamma^-$ 三个突变株的趋电性指数分别为 0.45 ± 0.05 、 0.32 ± 0.06 、 0.49 ± 0.05 ，与 AX2 对照组 0.66 ± 0.04 相比均显著降低 (P

<0.01)。另外, 三个突变株的运动能力也受到不同程度的影响, 由AX2对照组的 $5.12 \pm 0.20 \mu\text{m}/\text{min}$ 分别显著降低为 4.16 ± 0.13 、 3.88 ± 0.20 、 $4.04 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$ ($P < 0.001$), 以上结果说明, $G\alpha_2$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ 亚基均参与调控盘基网柄菌细胞的趋电性迁移。

进一步探究G蛋白介导细胞趋电性迁移是否涉及内质网Ca²⁺释放, 本研究又对咖啡因处理的 $G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 、 $G\gamma^-$ 突变株的趋电性运动情况进行探究, 统计分析结果显示 (图4a), 经咖啡因处理的 $G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 、 $G\gamma^-$ 突变株细胞在6 V/cm的直流电场刺激下, 趋电性指数分别为 0.74 ± 0.03 、 0.30 ± 0.05 、 0.32 ± 0.05 , 与对照组 0.78 ± 0.03 相比, 除 $G\alpha_2^-$ 突变株没有显著变化外, $G\beta^-$ 和 $G\gamma^-$ 突变株的趋电性指数均显著降低 ($P < 0.001$), 说明胞内Ca²⁺浓度增加能够恢复

$G\alpha_2$ 亚基缺失所造成的细胞趋电性迁移方向性受损, 但不能恢复 $G\beta$ 和 $G\gamma$ 亚基缺失造成的方向性受损。咖啡因处理的 $G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 、 $G\gamma^-$ 突变株细胞的平均轨迹速度分别为 8.07 ± 0.22 、 8.90 ± 0.25 、 $5.47 \pm 0.13 \mu\text{m}/\text{min}$, 与对照组 $7.77 \pm 0.19 \mu\text{m}/\text{min}$ 相比, 只有 $G\gamma^-$ 突变株数值显著降低 ($P < 0.001$), $G\alpha_2^-$ 和 $G\beta^-$ 突变株没有显著变化, 说明胞内Ca²⁺浓度增加能够恢复 $G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 突变株, 但不能恢复 $G\gamma^-$ 突变株趋电性迁移的运动速度。以上结果表明, 咖啡因诱导内质网Ca²⁺释放, 增加胞内Ca²⁺浓度, 能够完全或部分恢复 $G\alpha_2$ 和 $G\beta$ 亚基缺失所造成的细胞趋电性迁移受损, 但不能恢复 $G\gamma$ 亚基缺失造成的细胞趋电性迁移受损。

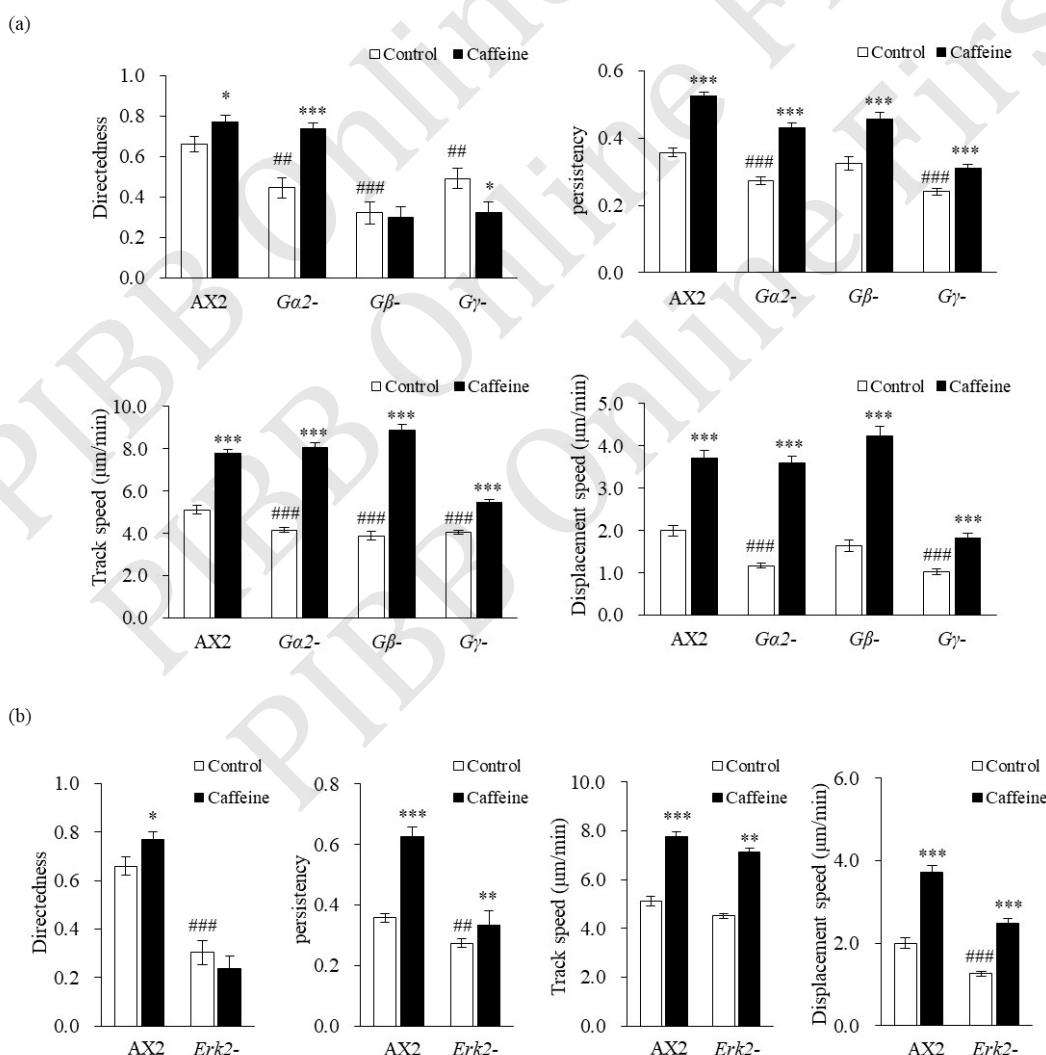


Fig.4 Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum is involved in G protein- or ERK-mediated cell electrotaxis.

(a) The migration directedness, persistency, track speed and displacement speed of electrotaxis migration in wild-type cells and $G\alpha_2^-$ 、 $G\beta^-$ 、 $G\gamma^-$ mutant cells. (b) The migration directedness, persistency, track speed and displacement speed of electrotaxis migration in wild-type cells and $Erk2^-$ mutant cells ($n=150$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$).

为探究内质网 Ca^{2+} 释放是否参与 ERK 对细胞趋电性的调控,本研究首先对 *Erk2* 突变株的趋电性进行研究,探究 ERK2 对细胞趋电性迁移的影响,统计分析结果显示(图 4b),缺失 *ERK2* 基因的细胞在 6 V/cm 直流电场中,与野生型相比,趋电性指数降低为 0.30 ± 0.05 ,位移速度降低为 $1.26 \pm 0.07 \mu\text{m}/\text{min}$,二者存在显著差异 ($P < 0.001$),说明 ERK2 参与调控盘基网柄菌细胞的趋电性迁移。进一步探究内质网 Ca^{2+} 释放与 ERK2 调控细胞趋电性迁移的关系,本研究用咖啡因处理细胞,促进内质网释放 Ca^{2+} ,探究 *Erk2* 突变株趋电性迁移的变化情况,统计分析结果显示(图 4b),咖啡因处理后, *ERK2* 突变株的趋电性指数为 0.24 ± 0.05 ,与未施加咖啡因组相比没有显著变化,而细胞平均轨迹速度显著增加为 4.51 ± 0.10 ($P < 0.01$),说明内质网 Ca^{2+} 释放会恢复 *ERK2* 基因缺失所造成的细胞运动速度降低,但不能恢复细胞方向性受损。综上表明,内质网 Ca^{2+} 释放参与 G 蛋白与 ERK2 介导的细胞趋电性迁移的调控过程。

3 讨论

研究发现, Ca^{2+} 是影响细胞趋电性迁移的重要因素之一,在肺癌细胞中,直流电场刺激会促进肌动蛋白重组以及激活牵张激活性阳离子通道(stretch-activated cation channels, SACCs)增加胞内 Ca^{2+} 浓度,抑制该通道的开放会抑制细胞趋电性迁移^[29];在人乳腺癌细胞迁移过程中,也发现电刺激会导致乳腺癌胞内 Ca^{2+} 浓度增加^[30]。本研究发现,在盘基网柄菌中,6 V/cm 电场刺激会诱导胞内 Ca^{2+} 浓度增加,且当用 EGTA 或 Ca^{2+} -free 缓冲液去除胞外 Ca^{2+} 后,细胞趋电性迁移能力降低,表现为细胞迁移的方向性受损,而轨迹速度未受影响,这与 Zhao^[33] 的研究结果一致,而 Zhao 所用的电场条件为 20 V/cm,说明胞外 Ca^{2+} 内流对细胞趋电性迁移的促进作用不受电压强度的影响。已有研究表明,细胞迁移与胞外 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 释放都有关^[33, 36-38],前人研究发现胞外 Ca^{2+} 内流显著影响盘基网柄菌的趋电性迁移,而胞内内质网 Ca^{2+} 释放对其趋电性迁移的影响尚不清晰,本研究发现电场诱导胞内 Ca^{2+} 浓度增加的原因,除胞外 Ca^{2+} 内流外,还有胞内内质网钙库的释放。此外,在盘基网柄菌趋化性迁移的研究中,发现胞外 Ca^{2+} 内流会影响细胞迁移的轨迹速度;而本研究发现,在趋电性迁移中,胞外 Ca^{2+} 内流不会影响细胞迁移的轨迹

速度,说明介导细胞趋电性迁移与趋化性迁移的信号通路有所不同,揭示它们之间的差异有助于理解和认识细胞对环境适应的生物学过程。

G 蛋白介导的信号通路在细胞迁移中发挥重要作用。盘基网柄菌中含有 11 个 $G\alpha$ 亚基、1 个 $G\beta$ 亚基以及 1 个 $G\gamma$ 亚基,有研究发现 G 蛋白参与调控盘基网柄菌的趋电性迁移,具体为,在高电压电场(20 V/cm)刺激下, $G\alpha_2$ 亚基和 $G\beta$ 亚基都只影响细胞运动的速度但不影响方向^[19-20],而对 $G\gamma$ 的研究暂无文献报道。本研究发现,在低电压电场(6 V/cm)刺激下,盘基网柄菌中的三个 G 蛋白亚基 $G\alpha_2$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ 分别缺失后,细胞的趋电性迁移能力均不同程度的降低,三个亚基对细胞迁移的方向和速度都有影响,说明 $G\alpha_2$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ 三个亚基在细胞趋电性迁移中均发挥一定的作用,且在不同电压电场下的调控作用有所不同,补充了盘基网柄菌趋电性迁移中 $G\gamma$ 亚基的作用,为 G 蛋白在细胞趋电性迁移中的分子机制研究提供新的理论基础。

还有研究发现,咖啡因可以激活内质网兰尼碱受体(RyRs)介导的 Ca^{2+} 通道,促进内质网释放 Ca^{2+} ,例如,在骨骼肌细胞^[39]、心肌细胞^[40-41]以及小鼠神经母细胞瘤^[35]中,均发现咖啡因可以作为 RyR 受体激活剂,促进 Ca^{2+} 释放,增加胞内 Ca^{2+} 浓度^[42]。本研究发现,在盘基网柄菌中,咖啡因会通过促进内质网 Ca^{2+} 释放,增加胞内 Ca^{2+} 浓度,为盘基网柄菌趋电性迁移分子机制研究中,咖啡因作为其内质网 Ca^{2+} 通道激活剂提供了直接证据支持。此外,对 $G\alpha_2$ 、 $G\beta$ 、 $G\gamma$ 突变株分别施加咖啡因处理,促进内质网 Ca^{2+} 释放会完全或部分恢复 $G\alpha_2$ 亚基和 $G\beta$ 亚基缺失所造成的趋电性迁移受损,说明内质网 Ca^{2+} 释放参与 G 蛋白对细胞趋电性迁移的调控。MAPK 是细胞定向迁移的重要信号分子,ERK 是其家族的成员,在细胞趋电性迁移中发挥重要作用。大量研究发现,ERK 的磷酸化水平变化可以调控细胞趋电性迁移,例如在上皮细胞^[43-44]、纤维肉瘤细胞^[45]、角质形成细胞^[46]和人星形胶质细胞^[47]中,电场都通过促进 ERK 的磷酸化进而促进细胞趋电性迁移;盘基网柄菌只含有两种 ERK, ERK1 和 ERK2,最新研究发现 IPK3s 介导的 ERK1/2 的激活参与调控盘基网柄菌细胞的趋电性^[22],而 ERK 缺失对其趋电性迁移的方向和速度的具体影响尚不清晰。本研究发现, *ERK2* 基因缺失的盘基网柄菌细胞的趋电性迁移能力降低,主要表现为方向性和位移速度显著降低;咖啡因处理

促进细胞内质网Ca²⁺释放后, 部分恢复了*Erk2*突变株的趋电性, 说明*EKR2*介导盘基网柄菌细胞的趋电性迁移, 且调控过程中可能涉及内质网Ca²⁺释放, 并且推测后者可能通过调控ERK磷酸化进而影响细胞趋电性迁移。综上, 本研究为Ca²⁺、G蛋白以及ERK在细胞趋电性迁移中的影响及作用机制提供了新的参考, 但对于内质网Ca²⁺释放在G蛋白和ERK2介导的细胞趋电性迁移中的具体作用还需进一步的实验研究。

4 结论

内质网Ca²⁺释放介导细胞趋电性迁移, 且参与G蛋白和ERK2对细胞趋电性迁移的调控过程。

5 致谢

感谢感谢日本NBRP*Neurokin* (National BioResource Project Cellular slime molds) 惠赠的突变株; 感谢昆明理工大学许敏教授赠送的咖啡因试剂。

参考文献

- [1] Ghilardi S J, O'Reilly B M, Sgro A E. Intracellular signaling dynamics and their role in coordinating tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2020, **12**(3): e1479
- [2] Li X, Miao Y, Pal D S, *et al.* Excitable networks controlling cell migration during development and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 2020, **100**: 133-142
- [3] Li Y, Gu Y, Wang H, *et al.* Electric pulses can influence galvanotaxis of *Dictyostelium discoideum*. *Biomed Res Int*, 2018, **2018**: 2534625
- [4] Funk R H W. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration. *Front Physiol*, 2015, **6**: 143
- [5] Tsai F C, Kuo G H, Chang S W, *et al.* Ca²⁺ signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *Biomed Res Int*, 2015, **2015**: 409245
- [6] Kim J M, Lee M, Kim N, *et al.* Optogenetic toolkit reveals the role of Ca²⁺ sparklets in coordinated cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(21): 5952-5957
- [7] Wei C, Wang X, Zheng M, *et al.* Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 2012, **24**(2): 254-261
- [8] Prudent J, Popgeorgiev N, Gadet R, *et al.* Mitochondrial Ca²⁺ uptake controls actin cytoskeleton dynamics during cell migration. *Sci Rep*, 2016, **6**: 36570
- [9] Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer*, 2011, **11**(8): 609-618
- [10] Zhao Z, Walczysko P, Zhao M. Intracellular Ca²⁺ stores are essential for injury induced Ca²⁺ signaling and re-endothelialization. *J Cell Physiol*, 2008, **214**(3): 595-603
- [11] Xu H, Zhou Y, Guo J, *et al.* Elevated extracellular calcium ions accelerate the proliferation and migration of HepG2 cells and decrease cisplatin sensitivity. *J Biomed Res*, 2023, **37**(5): 340-354
- [12] Saidak Z, Boudot C, Abdoune R, *et al.* Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp Cell Res*, 2009, **315**(12): 2072-2080
- [13] Moccia F, Negri S, Shekha M, *et al.* Endothelial Ca²⁺ signaling, angiogenesis and vasculogenesis: just what it takes to make a blood vessel. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(16): 3962
- [14] Caggia S, Johnston A, Walunj D T, *et al.* Ga₂ protein inhibition blocks chemotherapy- and anti-androgen-induced prostate cancer cell migration. *Cancers*, 2024, **16**(2): 296
- [15] Caggia S, Chunduri H, Millena A C, *et al.* Novel role of Gα₂ in cell migration: downstream of PI₃ kinase - AKT and Rac1 in prostate cancer cells. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(1): 802-815
- [16] Chang C W, Cheng N, Bai Y, *et al.* Gα₁₃ mediates transendothelial migration of neutrophils by promoting integrin-dependent motility without affecting directionality. *J Immunol*, 2021, **207**(12): 3038-3049
- [17] Mulligan T, Farber S A. Central and C-terminal domains of heterotrimeric G protein gamma subunits differentially influence the signaling necessary for primordial germ cell migration. *Cell Signal*, 2011, **23**(10): 1617-1624
- [18] Ke W, Ye D, Mersch K, *et al.* Gβ1 is required for neutrophil migration in zebrafish. *Dev Biol*, 2017, **428**(1): 135-147
- [19] Jeon T J, Gao R, Kim H, *et al.* Cell migration directionality and speed are independently regulated by RasG and Gβ in *Dictyostelium* cells in electrotaxis. *Biol Open*, 2019, **8**(7): bio042457
- [20] Zhao M, Jin T, McCaig C D, *et al.* Genetic analysis of the role of G protein-coupled receptor signaling in electrotaxis. *J Cell Biol*, 2002, **157**(6): 921-927
- [21] Schwebs D J, Pan M, Adhikari N, *et al.* *Dictyostelium* Erk2 is an atypical MAPK required for chemotaxis. *Cell Signal*, 2018, **46**: 154-165
- [22] 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. *生物化学与生物物理进展*, 2024, **51**(3): 685-695
- [23] Ge X X, Jiang R D, Wang X Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2024, **51**(3): 685-695
- [24] Ma Y, Yang C, Liang Q, *et al.* Direct current electric field coordinates the migration of BV2 microglia via ERK/GSK3β/cofilin signaling pathway. *Mol Neurobiol*, 2022, **59**(6): 3665-3677
- [25] Mehta P K, Griendling K K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, **292**(1): C82-C97
- [26] Wu M, Wu X, Cheng Y, *et al.* Qingda granule attenuates angiotensin II-induced blood pressure and inhibits Ca²⁺/ERK signaling pathway. *Front Pharmacol*, 2021, **12**: 688877
- [27] Dong L L, Liu L, Ma C H, *et al.* E-cadherin promotes proliferation of human ovarian cancer cells *in vitro* via activating MEK/ERK

- pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, **33**(6): 817-822
- [27] Chen K, Man Q, Miao J, *et al.* Kir2.1 channel regulates macrophage polarization via the Ca^{2+} /CaMK II/ERK/NF- κ B signaling pathway. *J Cell Sci*, 2022, **135**(13): jcs259544
- [28] Zhao M, Song B, Pu J, *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature*, 2006, **442**(7101): 457-460
- [29] Li Y, Yu W K, Chen L, *et al.* Electrotaxis of tumor-initiating cells of H1975 lung adenocarcinoma cells is associated with both activation of stretch-activated cation channels (SACCs) and internal calcium release. *Bioelectrochemistry*, 2018, 124: 80-92
- [30] Wu D, Ma X, Lin F. DC electric fields direct breast cancer cell migration, induce EGFR polarization, and increase the intracellular level of calcium ions. *Cell Biochem Biophys*, 2013, **67**(3): 1115-1125
- [31] Onuma E K, Hui S W. A calcium requirement for electric field-induced cell shape changes and preferential orientation. *Cell Calcium*, 1985, **6**(3): 281-292
- [32] Trollinger D R, Rivkah Isseroff R, Nuccitelli R. Calcium channel blockers inhibit galvanotaxis in human keratinocytes. *J Cell Physiol*, 2002, **193**(1): 1-9
- [33] Shanley L J, Walczysko P, Bain M, *et al.* Influx of extracellular Ca^{2+} is necessary for electrotaxis in *Dictyostelium*. *J Cell Sci*, 2006, **119**(22): 4741-4748
- [34] 蒋锐达, 王家, 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. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(8): 1520-1529
Jiang R D, Wang J J, Zhao S J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(8): 1520-1529
- [35] Liu B, Zhu X, Zhou Q, *et al.* Activating ryanodine receptor improves isoflurane-induced cognitive dysfunction. *Brain Res Bull*, 2023, **204**: 110790
- [36] Yang S, Huang X Y. Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem*, 2005, **280**(29): 27130-27137
- [37] Agle K A, Vongsa R A, Dwinell M B. Calcium mobilization triggered by the chemokine CXCL12 regulates migration in wounded intestinal epithelial monolayers. *J Biol Chem*, 2010, **285**(21): 16066-16075
- [38] Yang Z, Yue Z, Ma X, *et al.* Calcium homeostasis: a potential vicious cycle of bone metastasis in breast cancers. *Front Oncol*, 2020, **10**: 293
- [39] Talmon M, Massara E, Pruonto G, *et al.* Characterization of a functional Ca^{2+} toolkit in urine-derived stem cells and derived skeletal muscle cells. *Cell Calcium*, 2022, **103**: 102548
- [40] Mariángelo J I E, Di Marzio G D, Gonano L A, *et al.* Prolonged Ca^{2+} release refractoriness and T-tubule disruption as determinants of increased propensity to cardiac alternans in the hypertensive heart disease. *Acta Physiol*, 2023, **238**(2): e13969
- [41] Fernández-Morales J C, Toth N, Bayram P, *et al.* Loss-of-function W4645R mutation in the RyR2-caffeine binding site: implications for synchrony and arrhythmogenesis. *Cell Calcium*, 2024, **123**: 102925
- [42] Das T, Yoo Y S, Rhim H, *et al.* Potential role of Hsp25 in calcium-modulated cardiomyocytes. *Proteomics*, 2012, **12**(3): 411-420
- [43] Zhao M, Pu J, Forrester J V, *et al.* Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *FASEB J*, 2002, **16**(8): 857-859
- [44] Wang E, Zhao M, Forrester J V, *et al.* Electric fields and MAP kinase signaling can regulate early wound healing in lens epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, **44**(1): 244-249
- [45] Li F, Wang H, Li L, *et al.* Superoxide plays critical roles in electrotaxis of fibrosarcoma cells via activation of ERK and reorganization of the cytoskeleton. *Free Radic Biol Med*, 2012, **52**(9): 1888-1896
- [46] Ren X, Sun H, Liu J, *et al.* Keratinocyte electrotaxis induced by physiological pulsed direct current electric fields. *Bioelectrochemistry*, 2019, 127: 113-124
- [47] Yang C, Wang L, Weng W, *et al.* Steered migration and changed morphology of human astrocytes by an applied electric field. *Exp Cell Res*, 2019, **374**(2): 282-289

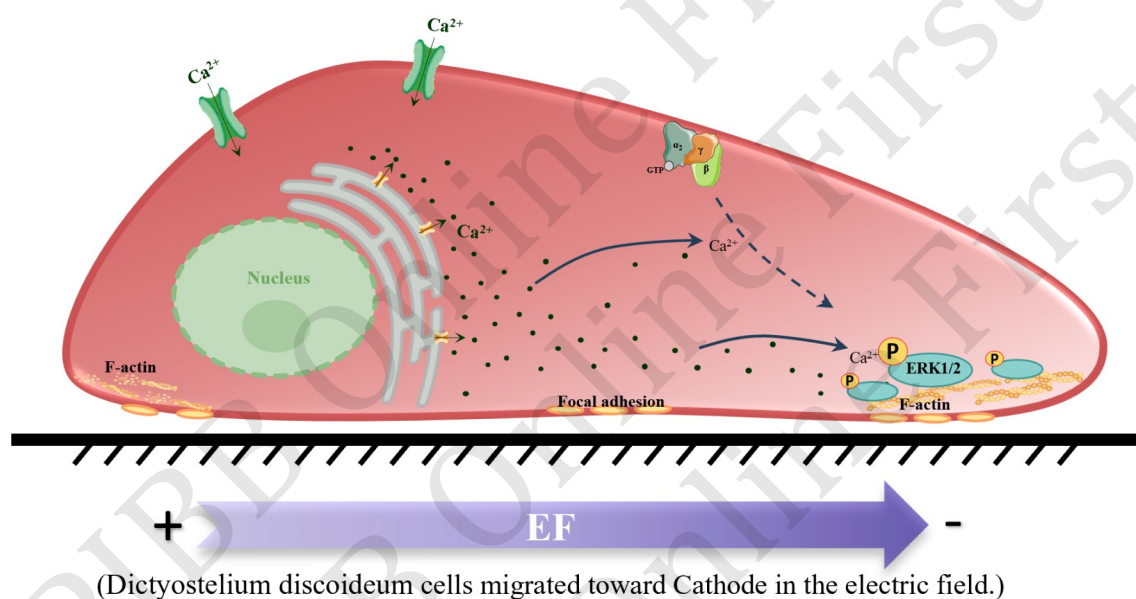
Ca²⁺ Release From The Endoplasmic Reticulum Mediates Electric Field Guided Cell Migration of *Dictyostelium discoideum**

WANG Yi-Fan^{1)**}, YUAN Shu-Qin^{1)**}, GAO Run-Chi^{1)***}, ZHAO San-Jun^{1,2)***}

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

²⁾Yunnan International Joint R&D Center for Sustainable Development and Utilization of Biological Resources, Kunming 650500, China)

Graphical abstract



Abstract Objective As a second messenger in intracellular signal transduction, Ca²⁺ plays an important role in cell migration. Previous studies have demonstrated that extracellular Ca²⁺ influx can promote electric field-guided cell migration, known as electrotaxis. However, the effect of intracellular Ca²⁺ flow on electrotaxis is unclear. Therefore, in this study, we investigate the effect of Ca²⁺ flux on the electrotaxis of *Dictyostelium discoideum*. Methods The electrotaxis of *Dictyostelium discoideum* was investigated by applying a direct current (DC) electric field. Cell migration was recorded using a real-time imaging system. Calcium channel inhibitors, the extracellular Ca²⁺ chelator EGTA, Ca²⁺-free DB buffer, and caffeine were applied to investigate the impact of intra- and extracellular Ca²⁺ flow on electrotaxis. The involvement of G proteins and ERK2 in directed cell migration mediated by endoplasmic reticulum Ca²⁺ release was explored using mutants. Results *Dictyostelium discoideum* migrated toward the cathode in the electric field in a voltage-dependent manner. The intracellular Ca²⁺ concentration of the cells was significantly increased in the electric field. Inhibition of both extracellular Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release suppressed cell electrotaxis migration. Inhibition of endoplasmic reticulum Ca²⁺ release induced by caffeine significantly impaired the electrotaxis of *Dictyostelium discoideum*. Deletion of *Ga2*, *Gβ*, *Gγ*, and *Erk2* notably reduced the electrotaxis of the cells. Enhancing Ca²⁺ release mediated by caffeine restored the electrotaxis of the *Ga2*⁻, *Gβ*⁻, and *Erk2*⁻ mutant cells partially or completely, but did not restore electrotaxis in the *Gγ* mutant cells. Conclusion Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum regulates electrotaxis

migration in *Dictyostelium discoideum* and is involved in the regulation of cell electrotaxis by G proteins and ERK2.

Key words calcium flux, endoplasmic reticulum, electrotaxis, cell migration, *Dictyostelium discoideum*

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0468

CSTR: 32369.14.pibb.20240468

PIBB Online First
PIBB Online First
PIBB Online First