

生理电场对早期胚胎发育的影响

王晓燕^{1,2} 王渝¹ 赵三军¹ 蒋文毅³ 蒋锐达¹ 施利民¹ 赵敏^{1,4}

(1. 云南师范大学 生命科学学院,昆明 650500;

2. 云南师范大学 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室,昆明 650500;

3. 西弗吉尼亚大学 动物及营养科学部,摩根敦 WV26506,USA;

4. 美国加州大学 戴维斯分校医学院,加州 95616,USA)

摘要 胚胎发育涉及一系列复杂的生理学、细胞生物学以及基因组学过程。已有研究表明,胚胎发育早期特别是原肠胚和神经胚时期存在着一定强度的内源生理电场,当存在类似内源生理电场强度的外源电场时,能引导细胞迁移、控制细胞极化、调节细胞增殖和分化,从而在一定程度上影响胚胎发育。本研究主要就内源生理及外源电场对胚胎发育的引导或干扰作用进行综述,以期对胚胎发育研究提供新思路。

关键词 胚胎发育;生理电场;外源电场

中图分类号 Q 132.4; Q 64

文章编号 1007-4333(2016)11-0070-07

文献标志码 A

The effect of physiological electrical field on early embryo development

WANG Xiao-yan^{1,2}, WANG Yu¹, ZHAO San-jun¹, JIANG Wen-tao³,
JIANG Rui-da¹, SHI Li-min¹, ZHAO Min^{1,4}

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

2. Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province,
Yunnan Normal University, Kunming 650500, China;

3. Division of Animal and Nutritional Sciences, West Virginia University, Morgantown WV26506, USA;

4. School of Medicine, University of California, Davis, California 95616, USA)

Abstract Embryo development is a complicated process, which involves diverse physiological, cell biological and genomic processes. Current studies have shown that there is certain strength of endogenous electric field existing in early embryo development, especially in gastrula and neurula period. Similar strength of applied electric fields directs cell migration, polarization, proliferation and differentiation, which affect the early embryo development. The guidance and interference effects on embryo development by endogenous or applied electric fields are reviewed in this paper, which may provide a novel perspective on future researches on embryo development.

Keywords embryo development; electric field; extracellular electrical field

脊椎动物胚胎早期发育过程包括:1)囊胚期,受精卵历经卵裂形成大量卵裂球构成的细胞团;2)原肠胚时期,由囊胚期继续发育,胚胎细胞发生大规模的、有规律的细胞运动,进行迁移和重排,由原始的细胞团发展成具有内、中、外3个胚层结构的胚胎,

内胚层和中胚层细胞被带入胚胎内部,而外胚层细胞在胚胎表面扩展延伸,未来发育为皮肤和神经组织;3)神经胚早期,位于外胚层背侧正中的细胞增厚形成神经板,神经板内陷继而合拢形成神经管,在神经板之下的为脊索原基、预定体节的位置^[1]。

收稿日期:2016-01-16

基金项目:国家重点基础研究发展973计划(2012CB518100);云南省高端科技人才引进项目(2009CI127)

第一作者:王晓燕,副教授,博士,主要从事发育生物学与细胞生物学专业研究,E-mail:wxy5837@163.com

王渝,硕士研究生,E-mail:wangyu20093728@163.com

脊索和神经管构成胚体的中轴,对早期胚胎形态建成具有重要意义^[1]。早期胚胎发育过程伴随着剧烈的细胞运动迁移^[2-3],已有研究证明趋化因子及激素对细胞运动迁移的影响,但引导细胞运动的电场因素对胚胎发育的影响还少有报导^[4]。

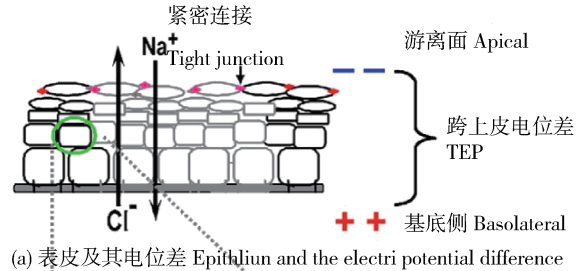
1843 年,德国生理学家 Du Bois-Reymond 等^[5-6]首次发现在受损皮肤周围存在内源性电场;1896 年,Verworn^[7]在体外模拟了内源电信号对细胞运动的指导作用,观察到了阿米巴虫在外源电场中朝向阴极运动的现象。这一系列重要现象的发现,引起了许多研究者们对生物电指导细胞行为的研究兴趣^[8-9]。研究表明,无论是低等的单细胞生物还是高等的多细胞动物细胞的运动,都受到电场的指导,即所谓的趋电反应^[10],例如细菌^[11-12]、阿米巴^[13]以及脊椎动物的神经细胞^[14-16]、角膜上皮细胞^[17]、晶状体上皮细胞^[18]等。内源性生物电信号在伤口愈合和组织细胞再生过程中的作用逐渐被认识并受到重视。人为机械损伤后所形成的伤口电场对伤口愈合过程中的细胞行为具有重要影响^[19-20],一些基因(如 *Pten* 基因)与信号因子(如肌醇磷脂)参与此反应过程^[21-22]。在鸡原肠胚的原条和蛙神经胚的胚孔探测到胚胎中的电流^[23-24]。电场对胚胎的发育甚至遗传具有重要影响^[25-26]。目前国内在这方面的研究很少,本研究主要就胚胎早期特别是原肠胚时期及神经胚时期电场作用方面的研究进行简要综述,拟为探究胚胎发育机理提供新思路。

1 胚胎内源性生理电场

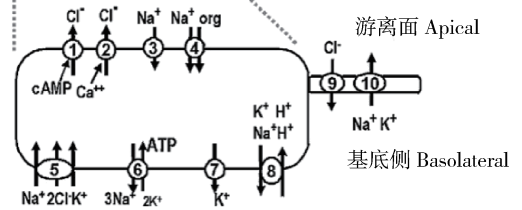
1976 年,Lindemann 等^[27]揭示了胚胎内源性生理电场是由源于胚胎上皮的阳离子(如 Na^+),形成离子流泵入胚胎,导致的跨膜电势梯度和电位差。

成年蛙皮肤存在稳定的跨上皮电位(Transepithelial potential, TEP),约为 100 mV;TEP 是由多种离子泵和转运通道维持的:离子的方向性转运形成电位差,相对于游离面,基底侧为正极,这个电位差是由离子泵和转运通道的净电流产生和维持的,同时,表皮也维持着跨越整个皮层的电位差(图 1)^[6]。蛙皮肤游离面和基底侧细胞膜的离子转运属性不同,顶端细胞膜有 1 个阿米洛利敏感的钠离子专门通道,允许钠离子进入细胞,基底侧膜有 1 个钠泵,乌本苷敏感的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 能将 3 个钠离子从细胞质泵出到细胞外,同时结合 2 个钾离子回到细胞内,造

成跨膜电势梯度和电位差^[28]。多数动物的上皮相邻细胞之间存在 1 个高电阻“闭锁堤”,每个上皮细胞近游离面都与相邻细胞间形成紧密连接,封闭了上皮表面带电离子进入细胞间组织液的通道,导致导电性大大降低^[6,29]。在蛙胚上皮存在组成转运通道、离子泵、紧密连接的基本元件,在胚胎早期发育阶段即已形成跨上皮电位^[30-31]。



(a) 表皮及其电位差 Epithelium and the electric potential difference



(b) 上皮细胞的离子转运 Transportation of ions in an epithelial cell

引自文献[6]

Adapted from reference [6]

图 1 离子转运形成跨上皮电位

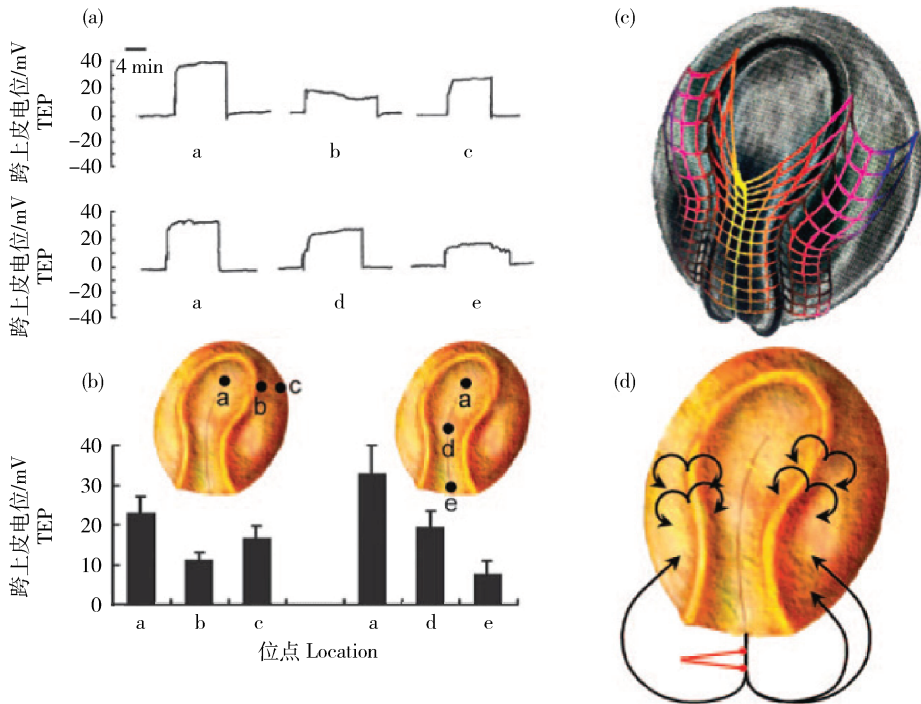
Fig. 1 Directional ion transportation generate electric potential difference

在胚胎发育过程中,神经管周围电位梯度广泛存在,利用微振动电极在胚胎神经管周围可测量到非扩散电流^[32-33]。在非洲爪蟾胚胎发育的第 15~20 阶段(横跨神经管形成的时期),在胚胎上测出 $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 的电流^[34],相当于 $10 \text{ mV}/\text{mm}$ 的电压梯度,这与在中轴线及中线外侧测得的上皮电势差 TEP 梯度一致。在发育成为脑的神经褶前段也存在 $2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 的电流密度,电流流出的位点正是胚胎组织运动的重要部位胚孔^[11]。推断是由于组织运动迁移短暂破坏了上皮细胞之间的“闭锁堤”因此减小局部组织电阻率,在高电阻率密封的上皮(完整的闭锁堤)的区域形成平行电流而在低电阻率(闭锁堤被破坏)的区域形成跨上皮电流^[35]。

在发育阶段的不同部位,TEP 也存在差异^[21,36]。利用标准的玻璃电极技术,在蝶螈胚胎的神经胚形成阶段尤其在胚胎的胚孔发育阶段的神

经板区域,测量到沿着头部至尾部前-后轴逐渐降低的稳定电压梯度^[36]。在蝾螈胚胎形成神经管的早期发育第16阶段不仅测到由头至尾逐渐降低的电压,还测到了沿神经板左、右轴的变化,中线上的

电位较高,在神经嵴减小,在胚胎侧翼再次升高,即沿胚胎背侧面的任意一侧可以产生稳定的侧位排列的电压梯度(图2(a)、(b)),电流从神经嵴流出,在中线上和外侧区域向胚胎内流动图2(d)^[21]。



(a) 利用玻璃感应电极,在蝾螈胚胎神经管形成的早期(发育第16阶段),选取同一胚胎的3个位点测得跨上皮电位(TEP)值。(b)在8个胚胎的a,b和c位点测量得到的跨上皮电位,神经沟中点的跨上皮电位最高,在神经嵴的侧翼最低。(c)蝾螈胚胎第16发育阶段的跨上皮电位分布图示。线条颜色表示跨上皮电位的大小,黄色表示TEP最高,紫色为最低。线条斜率就现示了表皮组织的局部电场。(d)利用非损伤电极检测到的电流环路。根据(a)和(b)中阐述的跨上皮电位的空间变换情况同样可以推测得出这样的环路。电流从神经嵴侧流出,在神经沟中点和外侧区域向胚胎内流动,同时在胚孔有大量电流流出。引自文献^[21]。

(a) TEP measurements made using glass voltage-sensing electrodes. The TEP of axolotl embryos was measured at the time of early neural tube formation (stage 16) in three positions on the same embryo; (b) Measurement sites are shown. TEP measurements made at sites a, b, and c in 8 embryos demonstrating that the TEP is highest in the center of the neural groove and lowest at the lateral edge of the neural ridge. Measurements from 20 embryos at sites a, d, and e indicate a rostral to caudal TEP gradient. (c) an artist's impression of the spatial differences of TEP in a stage 16 axolotl embryo. Colors represent the magnitude of the TEP. Yellow is highest, and purple is lowest. The slope of the line indicates the magnitude of the resulting local electric field in the subepidermal tissues. (d) current loops detected using a noninvasive vibrating electrode. As would be predicted from the spatial variation of TEP illustrated in (a) and (b), there is outward current at the lateral edges of the neural ridges, inward current at the center of the neural groove, inward current at the lateral skin, and a large outward current at the blastopore. Adapted from reference ^[21]

图2 跨上皮电位(TEP)所形成电流在胚胎上的空间差异

Fig. 2 Spatial differences in the transepithelial potential difference (TEP) generate electric fields within intact embryos

尽管研究证实两栖动物神经胚形成过程中存在电信号,然而胚孔和神经褶处的电信号作用机制可能不同。因为胚孔的电流在神经管闭合后仍持续存在,但神经管闭合后,中轴线及中线外侧的电压梯度消失^[21]。可以推断,在神经胚形成时期,对局部直流电场开启-关闭的空间转换功能的研究是发育生物学领域具有里程碑意义的课题。

2 胚胎内源性电场对胚胎发育的重要作用

2.1 两栖动物胚胎发育中电场的作用

卵裂时期的非洲爪蟾胚胎暴露于 $20 \mu\text{A}$ 的直流电流将致畸;施加外源电场的胚胎发育相对于正常胚胎发育延缓 $1\sim 2$ d;施加 20 min 的电场,仅 70% 的胚胎可发育成正常的蝌蚪,畸形蝌蚪有轻

微水肿、颜色较浅、轴不对称(如尾弯曲)等表现^[37]。蝶螈胚从原肠胚时期到神经胚时期,施加生理强度的外源电场可破坏由 TEP 引起的内源性电场的分布模式和大小;而当没有生理电场作用的情况下,发育异常的胚胎占 17%;当施加没有特定方向的电场(75 mV/mm),发育异常的胚达 62%;施加电场(50 mV/mm),发育异常的胚占 43%^[38]。由于内源性电压梯度主要在神经板中轴线及中线两侧测得,所以该研究还将胚胎本身体轴与电场方向相结合进行了试验:在神经胚形成期胚胎前端的喙形成区,平行胚轴施加电场阴极,导致 95% 的胚发育畸形;当外源电场垂直于胚轴,胚胎畸形率占 75%;胚胎发育缺陷的类型包括颅骨缺失、眼睛缺少、头部丑陋畸形、四肢缺失或畸形以及神经褶不完全闭合;在另一部分胚胎中,来自胚胎神经板的细胞仍会继续自主发育^[38]。对原肠胚时期胚胎施加持续强度的电场,并在原肠胚结束时关闭电场,胚胎可持续发育至第 36 阶段,可以完全正常发育^[38]。因此推测:1)在两栖动物神经系统及其他组织正常发育中可能需要正常方向和强度的内源电场的支持;2)对蝶螈胚不同时期的胚胎施加电场并不产生绝对有害的效果,部分处于原肠胚期的胚胎施加电压后仍能正常发育;3)在蝶螈神经胚形成时期胚胎对被扰乱的内生电场有响应^[38]。

通过电场施加或电极穿刺这两种方式能扰乱胚胎内生电场的方向,常导致胚胎方向性的发育异常。通常 TEP 在上皮内部为正极,当施加 25~100 mV/mm 的外加电场时,上皮内部去极化甚至渐变为负极,导致外加电场点远端皮肤的 TEP 超极化并且渐变为阳极;由于 TEP 在外源电场作用下显著变化,皮肤下内生电压梯度会被外源电场所干扰,大多数显著的发育缺陷发生在阴极一边,且该处会伴随出现 TEP 的超极化,使胚胎喙端位于外加电场的阴极时,胚胎畸形以头部缺陷为主;而当胚胎尾部位于外加电场阴极时,胚胎畸形则以下腹部及尾部缺失为主^[38]。也可利用类似于测量 TEP 的玻璃微电极穿刺非洲爪蟾胚胎,外加电流通过电极使胚孔流出的内生电流减少或反转,在胚孔注射 100 nA 电流通过微振动电极测得胚孔电流为 0,注射 500 nA 电流可以反转胚孔电流;70%~80% 的 14~16 阶段胚胎在注射电流 9~11 h 后,出现明显发育异常;空白对照胚胎在相同部位无电流或施加低电流以及反向电流来增大胚孔电流的电极,可降低畸形率^[35]。

尽管上述 2 种可以扰乱两栖动物内生电场的方式不同,却都导致了显著的胚胎发育缺陷。扰乱内生电场对脑部和尾部结构发育的影响尤其显著,这些部位正是胚胎中有内生电流流出和能测得稳定直流电压梯度的区域。由此可见,胚胎中稳定存在的电压梯度为发育模式提供了基础,外源电流混乱往往引起发育异常,这些研究可以为胚胎整体排布和细胞迁移的研究提供线索。

2.2 鸡胚发育中电场的作用

在鸡胚中也测得了类似在两栖动物胚孔及神经褶处测量到的电流和电压梯度。在第 15~22 发育阶段的鸡胚中测得流经后肠门(Posterior intestinal portal, PIP)的电流大于 $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$,该阶段胚胎尾部大量细胞死亡,结构缩小,胚胎电流通过外胚层由头至尾产生 1 个 20 mV/mm 尾部为负的电压梯度^[39]。

已有研究通过创造 1 个备用通路的方法来扰乱电场,检验电场被扰乱后的胚胎发育是否受到影响^[40]。具体过程如下:通过在第 11~15 阶段的鸡胚背侧中轴中点植入导电性的中空微管,形成 1 个低电阻率的异常区域,这个中空微管植入的目的是为了分流胚胎自身流出的内源性电流,空管(导电性中空微管)减少了内源性电场而改变其模式,这些外径约为 $100 \mu\text{m}$ 长内径 1 mm 空管注满了盐溶液,同时,向空管中加入 2% 的琼脂糖来调整对抗胚胎和外部环境之间的液体运输;将空管植于垂直于神经管的长约为 $250 \mu\text{m}$ 的人造裂缝中,平行于神经轴插入外胚层上皮 $500 \mu\text{m}$,发现胚胎原有内源电流中约有 $18 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 被分流,这些胚胎的 PIP 的电流减少了 30%,结果导致 92% 的胚胎发育异常,其中大多数发育异常是尾部、神经管或者脊索的缺失或者是尾部区域的缩短,也存在少部分四肢及头部的发育缺陷,胚胎发育异常的缺陷频率沿胚胎中轴线由头至尾升高,并且有 44% 的胚胎显示出了多种发育缺陷;而空白组仅有 11% 的胚胎发育异常^[40]。试验组中尾部畸形的胚胎与由基因突变导致尾部结构缺失的无尾鸡十分类似,用震动探针测量基因突变的无尾鸡胚,显示其 PIP 的电流比正常鸡胚少 41%,说明在某种程度上,电信号的不足会对尾部结构缺失造成影响^[40-41]。结果表明:1)内源性电流及电压梯度存在于鸡胚发育中,特别是存在于尾部区域;2)PIP 的电流被分流减少,会在尾部区域产生极大扰乱发育的效果;3)电流分流点设置在重要发育部

位仅几毫米远,试验组中仍存在正常发育的胚胎,证明电流分流对胚胎发育并没有绝对的局部有害效应;4)自然发生突变导致的尾部畸形可能与电信号的异常有关^[40]。

2.3 哺乳动物神经系统发育中的电场作用

稳定直流电场在哺乳动物中枢神经系统发育中也扮演着重要作用。从小鼠胚胎干细胞分离得到的预定运动神经元和胚体细胞,会在电场刺激下向阴极迁移,该现象在 50 至 100 mV/mm 的电场下尤为显著,但其迁移速度不受电场强度影响^[43]。人类的神经干细胞(Human neural stem cells, hNSCs),在 16 mV/mm 的电压下表现出向阴极显著移动的能力,其趋电性依赖于通电时间及电场强度,迁移方向性和距离随电场强度增强而增大;当使用能抑制胚胎干细胞运动能力的抑制剂 Y27632,导致 hNSCs 的运动能力丧失,其趋电性也随即消失;然而阻断趋化因子受体(C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4)对细胞趋电性并不造成影响,该趋化因子受体是神经干细胞趋化性的重要部件,这说明趋电性和趋化性是两个独立的事件^[44]。说明施加电场可以指导神经干细胞的迁移,进一步深化研究其机理,有可能在修复中枢神经系统损伤、治疗各种疾病的研究中得到应用。

3 跨神经管的电压梯度保证神经管的正常发育

在脊椎动物发育早期的神经胚背部中线上,神经板两侧经过加厚、上升、折叠、融合,最终形成神经管,神经管会进一步发育形成大脑和骨髓,神经管腔面与胚胎表皮都是由上皮组织构成且具有相同的性质,所以神经管腔面也存在上皮电位^[45]。

存在于两栖动物神经管周围的电位梯度,称为跨神经管电位(Transneural tube potential, TNTP),蝾螈胚胎在第 28 发育阶段, TNTP 可达到 90 mV,并且其腔内静电荷为负,其胚胎神经管壁厚约 50 μm ,电位梯度为 1 800 mV/mm,即存在于神经管壁上的神经元前体细胞在迁移分化的同时,就已经持续地暴露于高生理电场下^[45]。但是由于神经管上皮组织存在着高电阻率的“闭锁堤”区域,使得穿过神经管壁的电位并非稳定均一的,而是随神经管腔结构急剧变化的^[48]。TNTP 主要由 Na^+ 从神经管腔转运出神经管而形成,如果在蝾螈胚胎神经管腔内注射钠离子通道阻滞剂苯扎明或咪吡

嗪,则可在短时间内抑制 TNTP 的形成,若在第 21~23 阶段注射, TNTP 则会在接下来几小时内急剧减少,胚胎仅会继续发育 36~52 h,而未被注射的胚胎将会正常发育至第 34~36 阶段^[46]。

在发育过程中扰乱 TNTP 会导致胚胎发育畸形,这些畸形的发育缺陷主要集中在胚胎颅骨及中枢神经系统(Central nervous system, CNS),由于 TNTP 的混乱使大多数胚胎的组织器官原基细胞出现了去分化现象,表现为已经开始成型的器官原基(如眼睛、耳原基、大脑、神经管以及脊索)发生解聚,同时新的内部器官结构无法形成^[47]。

CNS 的神经元的分裂是从神经管内腔开始的,该过程受到多种蛋白质的影响,而这些蛋白质分子的分布是由 TNTP 决定的^[47]。神经管不同区域的厚度存在差异,神经管壁最薄区域的 TNTP 始终处于最高的状态,这恰是 CNS 发育最关键的区域。试验证明:给从这些区域提取的神经细胞施加 1 个小强度的直流电场,可以使得这些细胞的发育数量在体外培养的条件下显著增加,可能是因为外加的微弱电压梯度模拟了其在体环境^[47]。另外,利用外源或内源电场降低跨神经管的电场强度,也可达到控制神经管上细胞分裂的效果^[48-49]。总之,脊椎动物胚胎尤其是在与细胞运动和分裂相关的重要发育元件上,存在具有空间分布特征的稳定电压梯度,扰乱其电场会导致胚胎发育障碍。

4 胚胎内源性电信号时空特点

胚胎内源性电信号具有空间分布和时间变化的特点,细胞内或跨细胞的电信号可以调控与胚胎器官左右对称性发育的相关基因,使得这些基因能在特定的空间和时间进行有序表达^[50-51]。 $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ mRNA 虽然在非洲爪蟾受精卵中均一表达,但在第一次卵裂之后即改为局部表达^[50]。鸡胚中 $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ mRNA 亚基虽然是对称分布的,而存在于鸡胚原条左右两侧依赖 $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的膜电势存在差异^[50]。基因 *Shh* 的突变会引起神经管的缺失^[52]。*Shh* 基因在鸡胚发育早期围绕原条一端的亨氏结呈对称表达,但到第 4 发育阶段后仅在左侧中胚层基板表达,而接下来 *Shh* 基因仅在 Hensen 结左侧局部表达,这与原条左右两侧依赖 $\text{H}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的膜电势变化很相似^[51]。据 Michael 等^[51]推测,右侧活化蛋白的激活抑制了 *Shh* 基因的表达,导致 *Shh* 呈不对称分布;

利用药理学替代物如抗体、反转录的寡聚核苷酸类,抑制离子信号通路,会使 *Shh* 基因均匀分布;机械干扰胚胎原条,也会导致 *Shh* 基因的统一分布。尽管目前对作用于非对称性基因表达的上游信号还不是很清楚,但可以确定的是,在胚胎建立左、右器官不对称分布过程中,内源性生物电信号参与了信号交流^[53]。此外,一些带电小分子物质也在胚胎中轴两侧呈不对称分布,并介导不对称基因表达下游信号^[54]。

5 研究与应用前景

关于内源性电场及模拟内源性电场的外源电场的研究目前已有一定基础,并且在组织、细胞、分子层面都取得了一定的进展。大量证据表明,胚胎中不仅存在着内源性的生理电场,而且原肠胚和神经胚时期的内源性生理电场与胚胎的正常生长发育息息相关。生理电场对细胞的生物学行为(如细胞迁移、分裂、增殖、极化和排列等)具有重要的影响,而这些生物学效应对复杂的胚胎发育和再生过程至关重要。然而,目前对于细胞如何感知外源电场并作出相应应答的分子机制还不甚了解,因此,有必要进一步研究细胞感知胞外电信号的可能机制。

参 考 文 献

- [1] Stern C D. *Gastrulation Form Cell to Embryo*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2004
- [2] Keller R,Davidson L A, Shook D R. How we are shaped:The biomechanics of gastrulation[J]. *Differentiation*, 2003, 71(3):171-205
- [3] Solnica-Krezel L. Conserved patterns of cell movements during vertebrate gastrulation[J]. *Current Biology*, 2005, 15(6):213-228
- [4] Erickson C A, Nuccitelli R. Embryonic fibroblast motility and orientation can be influenced by physiological electric fields[J]. *Journal of Cell Biology*, 1984, 98(1):296-307
- [5] Du Bois-Reymond E. Vorläufiger Abriss einer Untersuchung über den sogenannten Froschstrom und die electromotorischen Fische[J]. *Annalen der Physik und Chemie*, 1843, 58:1-30
- [6] Zhao M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20(6):674-682
- [7] Verworn M. Untersuchungen über die polare Erregung der lebendigen Substanz durch den konstanten Strom. III [J]. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere*, 1896(69):9415
- [8] Anderson J D. Galvanotaxis of slime mold. *Journal of general physiology*, 1951, 35(1):1-16
- [9] Ogawa N, Oku H, Hashimoto K, Ishikawa M. A physical model for galvanotaxis of Paramecium cell[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2006, 242(2):314-328
- [10] Robinson K R. The responses of cells to electrical fields; A review[J]. *Journal of Cell Biology*, 1985, 101(6):2023-2027
- [11] Shi W, Stocker B A, Adler J. Effect of the surface composition of motile Escherichia coli and motile Salmonella species on the direction of galvanotaxis[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(4):1113-1119
- [12] Zhao M, Jin T, McCaig C D, Forrester J V, Devreotes P N. Genetic analysis of the role of G protein-coupled receptor signaling in electrotaxis[J]. *Journal of Cell Biology*, 2002, 157(6):921-927
- [13] Korohoda W, Mycielska M, Janda E, Madeja Z. Immediate and long-term galvanotactic responses of Amoeba proteus to dc electric fields[J]. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2000, 45(1):10-26
- [14] Cork R J, McGinnis M E, Tsai J, Robinson K R. The growth of PC12 neurites is biased towards the anode of an applied electrical field[J]. *Journal of Neurobiology*, 1994, 25(12):1509-1516
- [15] Rajnicek A M, Robinson K R, McCaig C D. The direction of neurite growth in a weak DC electric field depends on the substratum:contributions of adhesivity and net surface charge [J]. *Developmental Biology*, 1998, 203(2):412-423
- [16] Stern C D. Behaviour and motility of cultured chick mesoderm cells in steady electrical fields [J]. *Experimental Cell Research*, 1981, 136(2):343-350
- [17] Gaffney E A, Maini P K, McCaig C D, Zhao M, Forrester J V. Modelling corneal epithelial wound closure in the presence of physiological electric fields via a moving boundary formalism [J]. *Ima Journal of Mathematics Applied in Medicine & Biology*, 1999, 16(4):369-393
- [18] Wang E, Zhao M, Forrester J V, McCaig C D. Re-orientation and faster, directed migration of lens epithelial cells in a physiological electric field [J]. *Experimental Eye Research*, 2000, 71(1):91-98
- [19] Rouabhia M, Park H, Meng S, Derbali H, Zhang Z. Electrical stimulation promotes wound healing by enhancing dermal fibroblast activity and promoting myofibroblast transdifferentiation [J]. *PloS One*, 2013, 8(8):e71660
- [20] Thakral G, Lafontaine J, Najafi B, Talal T K, Kim P, Lavery L A. Electrical stimulation to accelerate wound healing [J]. *Diabetic Foot & Ankle*, 2013, 4(16):1-9
- [21] McCaig C D, Rajnicek A M, Song B, Zhao M. Controlling cell behavior electrically: Current views and future potential [J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(3):943-978
- [22] Zhao M, Song B, Pu J, Wada T, Reid B, Tai G, Wang F, Guo A, Walczysko P, Gu Y, Sasaki T, Suzuki A, Forrester J V, Bourne H R, Devreotes P N, McCaig C D, Penninger J M. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN [J]. *Nature*, 2006, 442(7101):457-460
- [23] Jaffe L F, Stern C D. Strong electrical currents leave the primitive streak of chick embryos [J]. *Science*, 1979, 206(4418):569-571

- [24] Robinson K R, Stump R F. Self-generated electrical currents through *Xenopus* neurulae[J]. *Journal of Physiology*, 1984, 352(1):339-352
- [25] Makarov V I, Khmelinskii I. External control of the *Drosophila melanogaster* egg to imago development period by specific combinations of 3D low-frequency electric and magnetic fields[J]. *Electromagnetic Biology & Medicine*, 2014, 35(1):15-29
- [26] He J, Cao Z, Yang J, Zhao H Y, Pan W D. Effects of static electric fields on growth and development of wheat aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) through multiple generations[J]. *Electromagnetic Biology & Medicine*, 2014, 35(1):1-7
- [27] Lindemann B, Voûte C. *Structure and Function of the Epidermis* [M]. Frog Neurobiology. Bertin; Springer Bertin Heidelberg, 1976
- [28] Koefoed-Johnsen V, Ussing H H. The nature of the frog skin potential[J]. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1958, 42(3-4):298-308
- [29] Anderson J M. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport [J]. *News in Physiological Sciences*, 2001, 16(3):126-130
- [30] McCaig C D, Robinson K R. The ontogeny of the transepidermal potential difference in frog embryos [J]. *Developmental Biology*, 1982, 90(2):335-339
- [31] Rajniecek A M, Stump R F, Robinson K R. An endogenous sodium current may mediate wound healing in *Xenopus* neurulae[J]. *Developmental Biology*, 1988, 128(2):290-299
- [32] Jaffe L F. Extracellular current measurements with a vibrating probe[J]. *Trends in Neurosciences*, 1985, 8(12):517-521
- [33] Jaffe L F, Nuccitelli R. An ultrasensitive vibrating probe for measuring steady extracellular currents[J]. *Journal of Cell Biology*, 1974, 63(1):614-628
- [34] Hotary K B, Robinson K R. Endogenous electrical currents and voltage gradients in *Xenopus* embryos and the consequences of their disruption [J]. *Developmental Biology*, 1994, 166(2):789-800
- [35] Decker R S. Disassembly of the zonula occludens during amphibian neurulation [J]. *Developmental Biology*, 1981, 81(1):12-22
- [36] Shi R, Borgens R B. Three-dimensional gradients of voltage during development of the nervous system as invisible coordinates for the establishment of embryonic pattern [J]. *Developmental Dynamics*, 1995, 202(2):101-114
- [37] Boga A, Binokay S, Emre M, Sertdemir Y. The embryonic development of *Xenopus laevis* under a low frequency electric field[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2012, 48(6):385-391
- [38] Metcalf M E M, Borgens R B. Weak applied voltages interfere with amphibian morphogenesis and pattern [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics*, 1994, 268(4):322-338
- [39] Hotary K B, Robinson K R. Endogenous electrical currents and the resultant voltage gradients in the chick embryo [J]. *Developmental Biology*, 1990, 140(1):149-160
- [40] Hotary K B, Robinson K R. Evidence of a role for endogenous electrical fields in chick embryo development [J]. *Development*, 1992, 114(4):985-996
- [41] Zwilling E. The embryogeny of a recessive rumpless condition in chick embryos [J]. *Journal of Experimental Zoology Part A-Ecological Genetics*, 1945, 99(2):79-91
- [42] McKasson M J, Huang L, Robinson K R. Chick embryonic Schwann cells migrate anodally in small electrical fields [J]. *Experimental Neurology*, 2008, 211(2):585-587
- [43] Li Y, Weiss M, Yao L. Directed migration of embryonic stem cell-derived neural cells in an applied electric field [J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2014, 10(5):653-662
- [44] Feng J F, Liu J, Zhang X Z, Zhang L, Jiang J Y, Nolta J, Zhao M. Guided migration of neural stem cells derived from human embryonic stem cells by an electric field [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(2):349-355
- [45] Hotary K B, Robinson K R. The neural tube of the *Xenopus* embryo maintains a potential difference across itself [J]. *Brain Research Developmental Brain Research*, 1991, 59(1):65-73
- [46] Shi R, Borgens R B. Embryonic neuroepithelial sodium transport, the resulting physiological potential, and cranial development [J]. *Developmental Biology*, 1994, 165(1):105-116
- [47] Richard B, Borgens R S. Uncoupling histogenesis from morphogenesis in the vertebrate embryo by collapse of the transneural tube potential [J]. *Developmental Dynamics*, 1995, 203(4):456-467
- [48] Zhao M, Forrester J V, McCaig C D. A small, physiological electric field orients cell division [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(9):4942-4946
- [49] Song B, Zhao M, Forrester J V, McCaig C D. Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing *in vivo* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(21):13577-13582
- [50] Levin M, Thorlin T, Robinson K R, Nogi T, Mercola M. Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning [J]. *Cell*, 2002, 111(1):77-89
- [51] Michael L, Randy L J, Claudio D S, Michael K, Cliff T. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis [J]. *Cell*, 1995, 82(5):803-814
- [52] Copp A J, Greene N D, Murdoch J N. The genetic basis of mammalian neurulation [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2003, 4(10):784-793
- [53] Levin M, Mercola M. Gap junctions are involved in the early generation of left-right asymmetry [J]. *Developmental Biology*, 1998, 203(1):90-105
- [54] Robinson K R, Messerli M A. Left/right, up/down: The role of endogenous electrical fields as directional signals in development, repair and invasion [J]. *BioEssays*, 2003, 25(8):759-766