

凡纳滨对虾血蓝蛋白的细菌凝集活性

章跃陵^{1,2}, 林伯坤¹, 陈俊¹, 胡忠¹, 黄通旺¹, 严芳¹

(1. 汕头大学理学院生物学系, 广东汕头 515063; 2. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建厦门 361005)

摘要:以凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象,运用亲和层析、PAGE、SDS-PAGE、Western-blotting和细菌凝集实验等方法探索凡纳滨对虾血蓝蛋白的细菌凝集活性。结果发现,血蓝蛋白对副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、河弧菌(*Vibrio fluvialis*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等6种虾类致病菌具有凝集活性,其凝集活性大小为0.27~1.08 mg/L,其中对副溶血弧菌和溶藻弧菌凝集活性最大,是哈维氏弧菌的4倍。在此基础上,选取 α -D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-山梨糖、蔗糖、麦芽糖、 α -D-乳糖、甘露醇和N-乙酰神经氨酸等9种糖考察其对血蓝蛋白细菌凝集活性的影响。结果显示,血蓝蛋白的细菌凝集活性可被 α -D-葡萄糖和N-乙酰神经氨酸所部分抑制和全部抑制,其最低抑制浓度范围为50~100 mmol/L。由此推测,血蓝蛋白确实具有细菌凝集活性,这对进一步研究血蓝蛋白的抗菌机理具有重要意义。[中国水产科学,2006,13(6):1 006-1 011]

关键词:凡纳滨对虾;血蓝蛋白;细菌;凝集活性;免疫

中图分类号:Q71 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)06-1006-06

血蓝蛋白是存在于节肢动物和软体动物血淋巴中的含铜呼吸蛋白,脱氧状态为无色,结合氧状态为蓝色。一般认为,血蓝蛋白的主要生物学功能与机体内的输氧有关,它与血红蛋白(hemoglobins)和蚯蚓血红蛋白(hemerythreins)并称为动物界3种呼吸蛋白^[1]。近年来研究表明,血蓝蛋白不仅具有输氧功能,而且还与能量的贮存、渗透压的维持、蜕皮过程的调节、表皮的固化以及黑色素的合成有关^[2-5]。特别引起学术界重视的是,血蓝蛋白及其降解片段还具有酚氧化酶活性、抗病毒和抗菌等多种免疫学功能^[5-7],被认为是一种具有多种非特异性免疫活性的多功能蛋白。然而迄今为止,国内外尚无有关血蓝蛋白细菌凝集活性的报道。为此,本研究采用现代免疫学方法探索凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血蓝蛋白的细菌凝集活性,为进一步研究血蓝蛋白的抗菌机理和探索对虾疾病的免疫学防治途径提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)购于汕头鮑浦农贸市场,体长约10 cm。

实验菌副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)、河弧菌(*Vibrio fluvialis*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) and 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由厦门大学生物化学与分子生物学实验室馈赠。

凡纳滨对虾血蓝蛋白73 kD亚基抗血清由厦门大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室馈赠,羊抗兔IgG-HRP和Sepharose 4B购于SINO-AMERICAN公司。

1.2 实验方法

1.2.1 虾血清的制备 按王雷等报道的方法进行^[8]。选用1 mL注射器从对虾心脏抽取血淋巴,置

收稿日期:2004-12-21; 修订日期:2005-07-28.

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(博士启动基金,04300750);厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金项目(2004101)。

作者简介:章跃陵(1971-),男,博士,副教授,主要从事无脊椎动物分子免疫学研究。E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

通讯作者:章跃陵。E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

4 ℃过夜, 3 000 r/min 离心 20 min, -20 ℃保存备用。

1.2.2 亲和层析纯化血蓝蛋白 采用章跃陵等^[9]报道的方法进行。取血蓝蛋白 73 kD 亚基抗血清适量, 硫酸铵分级沉淀, 将纯化所得抗体与溴化脲活化的 Sepharase-4B 偶联(质量比 1: 100), 常规方法装柱, 将适量虾血清加入柱床, 依次进行孵育、洗脱、透析、浓缩和蛋白浓度测定, 小量分装保存备用。

1.2.3 PAGE 电泳 取 1.2.2 制备的浓缩样品 20 μL (60 mg/L), 与加样缓冲液等体积混合, 按常规方法电泳(3% 浓缩胶, 10% 分离胶)、染色和脱色。

1.2.4 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot 分析 取 1.2.2 制备的浓缩样品 20 μL (60 mg/L), 按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳(3% 浓缩胶, 8% 分离胶), 待电泳结束后, 50 V 恒压电转过夜, 丽春红 S (Ponceau S) 总蛋白显色, TBS (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4) 充分洗涤, 5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 1 h, 分别与兔抗血蓝蛋白 73 kD 亚基抗血清(1: 100)和羊抗兔 IgG-HRP(1: 500)室温孵育 2 h 和 1 h, TBS 洗涤 3 次, 每次 10 min, DAB 显色, GDS8000PC-凝胶成像及分析系统扫描和分析。

1.2.5 细菌悬液的制备 分别用肉汤培养基培养副溶血弧菌、溶藻酸弧菌、哈维氏弧菌、河弧菌、嗜水气单胞菌和金黄色葡萄球菌, 取其培养物室温 12 000 r/min 离心 1 min, 0.65% 生理盐水洗涤 3 次, 用 TBS-Ca²⁺ (50 mmol/L Tris, HCl, 0.75% NaCl, 50 mmol/L CaCl₂, pH 7.2) 制备细菌悬液(1 × 10⁸ CFU/mL)。

1.2.6 细菌凝集实验 细菌凝集实验采用玻片凝集法, 分对照组和实验组进行。对照组以 TBS-Ca²⁺ 代替血蓝蛋白, 实验组用 TBS-Ca²⁺ 将血蓝蛋白进行

2 倍梯度稀释。各取 20 μL 滴加在洁净的载玻片上, 并分别在其上滴加等量待测细菌悬液, 轻轻摇动 1 min, 置 37 ℃ 30 min, Olympus BH-2 型显微镜观察细菌凝集状态。以各样品发生凝集反应的最高稀释度为凝集效价, 样品蛋白含量与凝集效价的比值为凝集比活(mg/L)。

1.2.7 糖抑制实验 分别选取 9 种糖(α-D-葡萄糖、D-半乳糖、D-木糖、D-山梨糖、蔗糖、麦芽糖、α-D-乳糖、甘露醇和 N-乙酰神经氨酸)依次配成 4 种浓度梯度的溶液(25 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L)。取血蓝蛋白和糖溶液各 10 μL 于载玻片上轻轻震荡混匀 1 min, 加入待测细菌悬液并混匀, 置室温 15 ~ 30 min, 显微镜下观察结果。

2 结果

2.1 血蓝蛋白的纯化与鉴定

由图 1、2 可知, 亲和层析纯化蛋白 PAGE 电泳表现为单一条带, SDS-PAGE 表现为分子量分别为 73 kD 和 75 kD 的 2 条带, 与凡纳滨对虾血蓝蛋白的既往报道相符^[10]。其中, 分子量为 73 kD 的条带与兔抗血蓝蛋白 73 kD 亚基抗血清呈显著阳性, 说明其两者可以发生特异性的结合, 与预期结果一致。由此说明, 该纯化蛋白确实是凡纳滨对虾血蓝蛋白。

2.2 血蓝蛋白细菌凝集活性分析

选取副溶血弧菌等 6 种虾类致病菌探索凡纳滨对虾血蓝蛋白的细菌凝集活性, 结果发现, 血蓝蛋白与 6 种细菌均能发生凝集反应, 其凝集活性为 0.27 ~ 1.08 mg/L, 其中凝集活性最大的为副溶血弧菌和溶藻酸弧菌, 最小的为哈维氏弧菌, 前者是后者的 4 倍(表 1, 图 3)。

表 1 凡纳滨对虾血蓝蛋白细菌凝集比活分析(37 ℃)

Tab. 1 Bacterial agglutinative activity analysis of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin (37 ℃)

细菌 Bacteria	蛋白含量/(mg · L ⁻¹) Protein concentration	凝集效价 Agglutinative efficiency	凝集比活/(mg · L ⁻¹) ^① Agglutinative activity
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	10.8	40	0.27
溶藻酸弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	10.8	40	0.27
河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	10.8	20	0.54
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	10.8	10	1.08
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	10.8	20	0.54
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	10.8	20	0.54

注: ①蛋白质含量/凝集效价。

Note: ①Protein concentration/Agglutinative efficiency.



图 1 亲和层析纯化蛋白 10% PAGE 分析
1: 牛血清白蛋白(蛋白质标准); 2: 亲和层析纯化蛋白。
Fig. 1 10% PAGE analysis of protein purified by affinity chromatography from *Litopenaeus vannamei* serum
1: Bovine serum albumin(Protein marker); 2: Protein purified by affinity chromatography from *Litopenaeus vannamei* serum.

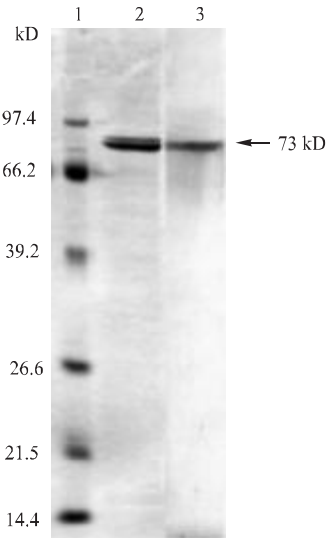


图 2 亲和层析纯化蛋白 SDS-PAGE 和 Western-blot 分析。
1: 标准蛋白质; 2: 亲和层析纯化蛋白 SDS-PAGE 分析; 3: 亲和层析纯化蛋白 Western-blot 分析。
Fig. 2 SDS-PAGE and Western-blot analysis of protein purified by affinity chromatograph from *Litopenaeus vannamei* serum
1: Protein markers; 2: SDS-PAGE analysis of protein purified by affinity chromatography; 3: Western-blot analysis of protein purified by affinity chromatography.

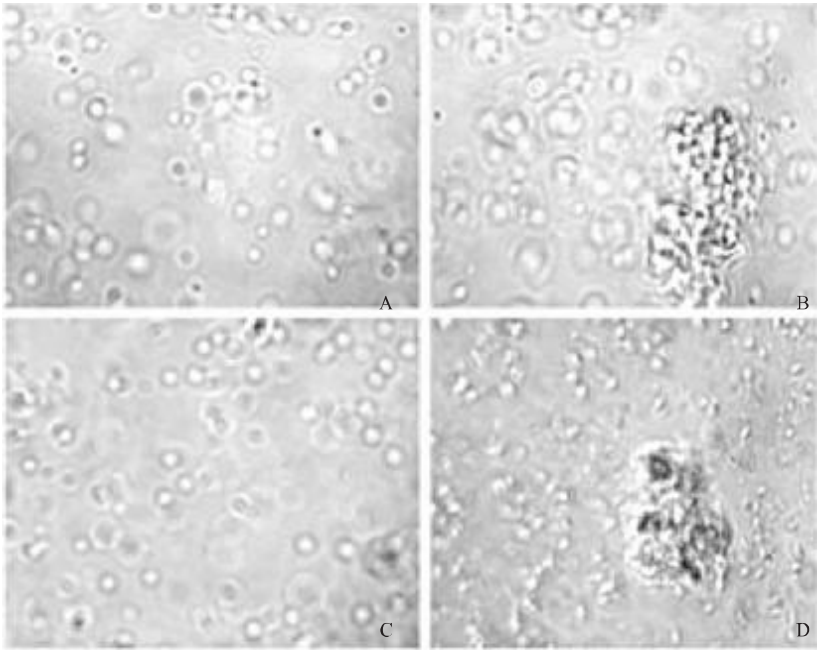


图 3 凡纳滨对虾血蓝蛋白细菌凝集反应图
A: 副溶血弧菌凝集反应阴性对照($\times 3\ 280$); B: 副溶血弧菌凝集反应($\times 3\ 280$); C: 嗜水气单胞菌凝集反应阴性对照($\times 3\ 280$); D: 嗜水气单胞菌凝集反应($\times 3\ 280$).
Fig. 3 Bacterial agglutinative activity analysis of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin
A: Negative control group of agglutinative reactivity in *V. parahaemolyticus*($\times 3\ 280$). B: Agglutinative reactivity of hemocyanin in *V. parahaemolyticus*($\times 3\ 280$). C: Negative control group of agglutinative reactivity in *A. hydrophila*($\times 3\ 280$). D: Agglutinative reactivity of hemocyanin in *A. hydrophila*($\times 3\ 280$).

2.3 血蓝蛋白凝集抑制分析

选取 9 种糖考察血蓝蛋白细菌凝集活性的影响因素, 结果如表 2 和图 4 所示。 α -D-葡萄糖和 N-乙酰神经氨酸可以部分抑制和全部抑制血蓝蛋白的细菌凝集活性, 而其余糖对血蓝蛋白细菌凝集活性无明显影响。其中, α -D-葡萄糖可抑制血蓝蛋白对金

黄色葡萄球菌的凝集反应, 但对其他细菌的凝集反应无明显的抑制效果。而 N-乙酰神经氨酸可以全部抑制血蓝蛋白对 6 种细菌的凝集反应, 其中对金黄色葡萄球菌和哈维氏弧菌的抑制作用最强, 其最低抑制浓度可低至 50 mmol/L。

表 2 凡纳滨对虾血蓝蛋白细菌凝集抑制分析(37 °C)

Tab. 2 Saccharide inhibition analysis of bacterial agglutinative activities of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin(37 °C)

细菌 Bacteria	α -D-葡萄糖浓度/(mmol · L ⁻¹) Concentration of α -D- glucose				N-乙酰神经氨酸浓度/(mmol · L ⁻¹) Concentration of N-acetylneuraminic acid			
	25	50	100	200	25	50	100	200
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
溶藻酸弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
河弧菌 <i>V. fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	-	-	-	+	-	+	+	+

注:“-”糖抑制反应阴性;“+”糖抑制反应阳性。

Note:“-”Negative reaction of saccharide inhibition analysis;“+”Positive reaction of saccharide inhibition analysis.

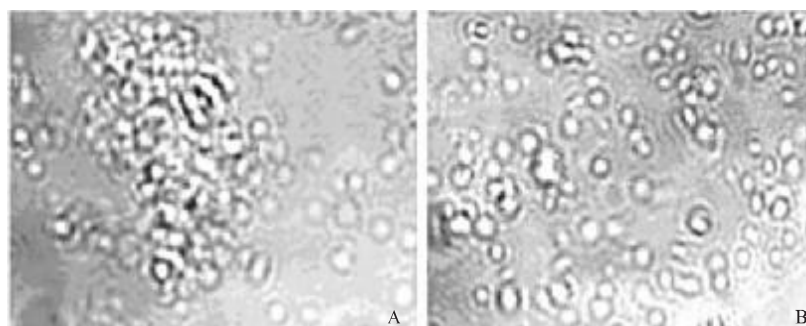


图 4 凡纳滨对虾血蓝蛋白细菌凝集抑制反应图

A: 副溶血弧菌凝集抑制反应阴性对照($\times 3280$); B: 副溶血弧菌凝集抑制反应(N-乙酰神经氨酸, 50 mmol/L)($\times 3280$).

Fig. 4 Bacterial agglutinative inhibition analysis of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin

A: Negative control group of agglutinative inhibition reactivity in *V. parahaemolyticus*($\times 3280$). B: Agglutinative inhibition reactivity of *Litopenaeus vannamei* hemocyanin in *V. parahaemolyticus* by N-acetylneuraminic acid(50 mmol/L)($\times 3280$).

3 讨论

近年来, 国内、外研究表明, 血蓝蛋白是一种多功能蛋白, 在免疫反应中具有多种免疫学活性, 尤其是在抵抗病原菌感染中其降解片段发挥重要作用。Lee 等^[11]发现淡水小龙虾(*Pacifastacus leniusculus*)被感染时, 其血淋巴中可新增 1 种源于血蓝蛋白 C-末端的抗菌肽 astacidin 1。Destoumieux-Garzon 等^[12]从南美白对虾和南美兰对虾(*Penaeus styliro-*

tris)的血浆中分离出 PvHCt(2.7 kD, 南美白对虾), PsHCt 1(7.9 kD, 南美兰对虾), PsHCt 2(8.3 kD, 南美兰对虾)等 3 种具有抗真菌活性的多肽, 其与血蓝蛋白 C-末端的相似性为 95% ~ 100%^[12]。但迄今为止, 血蓝蛋白全蛋白是否具有抗菌活性, 国内外未见报道, 因此积极探索其抗菌功能对进一步阐明血蓝蛋白这一多功能蛋白的非特异性免疫机理具有重要意义。

在本课题组既往研究中发现, 血蓝蛋白的肽质

量谱峰值可以与流感病毒 *Influenza A virus* 的血凝素(hemagglutinin, gi|221338)相匹配,其序列覆盖率为 37%^[13]。Alpuche 等^[14]从白滨对虾(*Litopenaeus setiferus*)中分离纯化出 1 种分子量为 291 kD 的凝集素,其 2 个亚基与凡纳滨对虾血蓝蛋白前体肽质量谱峰值的匹配率分别为 23% 和 22%。这些研究结果提示,血蓝蛋白也可能具有凝集活性。据此,本研究运用玻片凝集法探索血蓝蛋白的细菌凝集活性。结果发现,血蓝蛋白与副溶血弧菌等 6 种细菌均能发生凝集反应,而且其凝集活性可被 α -D-葡萄糖和 N-乙酰神经氨酸所部分抑制和全部抑制。由此推断,南美白对虾血蓝蛋白确实具有细菌凝集活性。不过,与一般凝集素相比,其凝集活性大概低 1~2 个数量级^[15-16],但其在虾血清中含量上的丰富也许可以弥补其凝集活性上的不足。这一发现为进一步探索血蓝蛋白的抗菌机理奠定重要基础。

据报道,血蓝蛋白可能由酚氧化酶进化而来^[17-18],酚氧化酶的激活又与甲壳动物体内凝血蛋白的凝血机制密切相关^[19],而本研究发现血蓝蛋白同样具有凝集活性。由此推测,血蓝蛋白、酚氧化酶及凝血蛋白可能是由同一起源蛋白进化而来,而血蓝蛋白这一多功能分子保留了发挥其全部免疫学活性的潜能。

综上所述,凡纳滨对虾血蓝蛋白确实具有细菌凝集活性,其凝集活性可被 α -D-葡萄糖和 N-乙酰神经氨酸所部分抑制和全部抑制。但其作用机理尚不明确,相信,随着对血蓝蛋白抗菌功能研究的深入,其确实情况必将被彻底揭示。

参考文献:

- [1] Terwilliger N B. Function adaptations of oxygen-transport proteins [J]. *J Exp Biol*, 1998, 201: 1 085 - 1 098.
- [2] Jaenicke E, Föll R, Decker H. Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(26): 34 267 - 34 271.
- [3] Paul R J, Pirow R. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates [J]. *Zoology*, 1998, 100: 319 - 327.
- [4] Adachi K, Wakamatsu K, Ito S, et al. An oxygen transporter hemocyanin can act on the late pathway of melanin synthesis [J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18(3): 214 - 219.
- [5] Adachi K, Endo H, Watanabe T, et al. Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: enzymatic properties and immunolocalization [J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18(2): 136 - 143.
- [6] Decker H, Jaenicke E. Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins [J]. *Dev Comp Immunol*, 2004, 28: 673 - 687.
- [7] Zhang X B, Huang C H, Qin Q W. Antiviral properties of hemocyanin isolated from *Penaeus monodon* [J]. *Antiviral Res*, 2004, 61: 93 - 99.
- [8] 王雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(1): 34 - 41.
- [9] Zhang Y L, Wang S Y, Peng X X. Identification of a type of human IgG-like protein in shrimp *Penaeus vannamei* by mass spectrometry [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 301: 39 - 54.
- [10] Sellos D, Lemoine S, Wormhoudt A V. Molecular cloning of hemocyanin cDNA from *Penaeus vannamei* (Crustacea, Decapoda): structure, evolution and physiological aspects [J]. *FEBS Letters*, 1997, 407: 153 - 158.
- [11] Lee SY, Lee B L, Sørderhall K. Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 7 927 - 7 933.
- [12] Destoumieux-Garzon D, Saulnier D, Garnier J, et al. Crustacean Immunity: antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 47 070 - 47 077.
- [13] 章跃陵. 南美白对虾类 Ig 的定性、功能和免疫分子进化的研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2003. 72 - 77.
- [14] Alpuche J, Pereyra A, Agundis C, et al. Purification and characterization of a lectin from the white shrimp *Litopenaeus setiferus* (Crustacea decapoda) hemolymph [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1724(1-2): 86 - 93.
- [15] Zenteno R, Vazquez L, Sierra C, et al. Chemical characterization of the lectin from the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) by MALDI-TOF [J]. *Comp Biochem Physiol Part B*, 2000, 127: 243 - 250.
- [16] Savan R, Endo M, Sakai M. Characterization of a new C-type lectin from common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Mol Immunol*, 2004, 41(9): 891 - 899.
- [17] Burmester T. Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins [J]. *Micron*, 2004, 35: 121 - 122.
- [18] Immesberger A, Burmester T. Putative phenoloxidases in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily [J]. *J Comp Physiol*, 2004, 174(2): 169 - 180.
- [19] Nagai T, Kawabata S. A link between blood coagulation and phenol oxidase activation in arthropod host defense [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 29 264 - 29 267.

Bacterial agglutinative activity of hemocyanin in shrimp *Litopenaeus vannamei*

ZHANG Yue-ling^{1,2}, LIN Bo-kun¹, CHEN Jun¹, HU Zhong¹, HUANG Tong-wang¹, YAN Fang¹

(1. Department of Biology, School of Science, Shantou University, Shantou 515063, China; 2. The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, College of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Hemocyanin is a kind of important multifunctional protein found in the hemolymph of both arthropod and mollusk, although this copper-containing pigment is generally accepted as an oxygen carrier. Particularly, recent reports have demonstrated that hemocyanin was probably an important type of defense molecule, which not only could be functionally converted into a phenoloxidase-like enzyme by some reagents, but also could produce C-terminal fragments with broad antifungal and antibacterial activities. However, up to date no research about hemocyanin's bacterial agglutinative activity was reported. Thus, in the paper, an attempt was made to testify whether *Litopenaeus vannamei* hemocyanin possesses bacterial agglutinative function. The methods of affinity chromatography, PAGE, SDS-PAGE, Western-blotting, bacterial agglutinative test and saccharide agglutinating-inhibition test were used. In the experiment, six kinds of bacteria including *Vibrio parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. harveyi*, *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* were selected to react with *Litopenaeus vannamei* hemocyanin. The results showed that hemocyanin could aggregate with the six types of bacteria respectively, whose agglutinative activity was from 0.27 to 1.08 mg/L. Then saccharide specificity of hemocyanin was analyzed by nine types of saccharide including α -D-Glucose, D-Galactose, D-Xylose, D-Sorbitol, Sucrose, Maltose, α -D-Lactose, Mannitol and N-Acetylneuraminic acid. The results indicated that the agglutinative activity of hemocyanin could be partly inhibited by α -D-Glucose at the concentration of 200 mmol/L in the presence of *S. aureus*, and completely inhibited by N-Acetylneuraminic acid, whose minimum concentration was from 50 to 100 mmol/L, in the presence of the six types of bacteria respectively. But the results can't be obtained by the other saccharides, even at the concentration of 200 mmol/L. Thus, these results indicate that *Litopenaeus vannamei* hemocyanin indeed possesses bacterial agglutinative function, which is the newest discovery in the field of immune function of hemocyanin and will be helpful for its further research and practical application. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 1006–1011]

Key words: *Litopenaeus vannamei*; hemocyanin; bacterium; agglutinative activity; immunity

Corresponding author: ZHANG Yue-ling. E-mail: zhangyl@stu.edu.cn

This work was supported by grants from Guangdong Natural Science Fund (PhD's Startup Fund) (04300750); Open Fund of Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University (2004101).